ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELEKTROKİMYASAL FENOL BİYOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

Şakir KAMAÇ

KİMYA ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2021

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Şakir KAMAÇ tarafından hazırlanan "**ELEKTROKİMYASAL FENOL BİYOSENSÖRÜ GELİŞTİRİLMESİ"** adlı tez çalışması 25.06.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Muhammed ALTUN

Jüri Üyeleri :

Başkan **:** Dr. Öğr. Üyesi Muhammed ALTUN
Çankırı Karatekin Üniversitesi
Biyokimya Anabilim Dalı

Üye **:** Dr. Öğr. Üyesi Erdin DALKILIÇ
Çankırı Karatekin Üniversitesi
Organik Kimya Anabilim Dalı

Üye **:** Dr. Öğr. Üyesi Burçak DEMİRBAKAN
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmenliğine göre hazırlamış olduğum "ELEKTROKİMYASAL FENOL BİYOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programıyla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmenliğine ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

(25/06/2021)

Şakir KAMAÇ

(imza)

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ELEKTROKİMYASAL FENOL BİYOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

Şakir KAMAÇ

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Muhammed ALTUN

Bu çalışmanın amacı, atık sularda fenol tayini için enzim temelli amperometrik fenol biyosensörü geliştirmektir. Bu amaçla ilk olarak yüzey baskılı karbon elektrotlar (SPCE) elektrokimyasal olarak indirgenmiş grafen oksit (ERGO) ile modifiye edilmiş (SPCE/ERGO), ardından elektropolimerizasyon tekniği ile polinötral kırmızı (PNR) filmi SPCE/ERGO'lar üzerinde oluşturulmuştur (SPCE/ERGO/PNR). Son olarak SPCE/ERGO/PNR elektrotları üzerinde elektrodepozisyon metodu ile altın nanopartiküller (AuNP) oluşturulmuştur. SPCE/ERGO/PNR/AuNP elektrotlarının her bir hazırlanma basamağının elektrokimyasal karakterizasyonları dönüşümlü voltametri (CV) tekniği ile yapılmıştır. SPCE/ERGO/PNR/AuNP elektrotları üzerinde tirozinaz enziminin immobilizasyonu gluteraldehit çapraz bağlayıcısı ile gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan fenol biyosensörünün optimum pH, optimum enzim miktarı ve optimum çalışma potansiyeliamperometrik metot ile belirlenmiştir. Optimum şartlarda fenol biyosensörünün elektrokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır. Geliştirilen fenol biyosensörünün analitiksel karakterizasyonları olan doğrusal çalışma aralığı, tespit limiti, tayin sınırı, uygulama kararlılığı, depolama kararlılığı, tekrarlanabilirliği amperometrik yöntemle tayin edilmiştir.

Analitiksel karakterizasyonlar sonucunda fenol biyosensörünün tekrarlanabilirliği 10 µM fenol için bağıl standart sapma (R.S.D.) %4,36 (n=5), duyarlığı 0,326 µA. mM^{-1}, tespit limiti ve tayin sınırı ise sırasıyla 2,36 µA.mM^{-1}ve 7,86 µA.mM^{-1}, doğrusal aralık 5 µM - 150 µM olarak bulunmuştur. Geliştirilen amperometrik fenol biyosensörünün uygulaması atık sulardaki fenolün tayininde gerçekleştirilmiştir.

2021, 59 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Elektrokimyasal olarak indirgenmiş grafen oksit, polinötral kırmızı, fenol, biyosensör, yüzey baskılı karbon elektrot

ABSTRACT

Master of Science Thesis

DEVELOPMENT OF THE ELECTROCHEMICAL PHENOL BIOSENSORS

Şakir KAMAÇ

Cankiri Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Muhammed ALTUN

The aim of this study is to develop an enzyme-based amperometric phenol biosensor for phenol determination in wastewater. Firstly, screen printed electrodes (SPCE) were modified with electrochemical reduced graphene oxide (ERGO). The, polyneutral red films was prepared SPCE/ERGO electrodes by electropolymerization technique. Finally gold nanoparticles (AuNP) were formed on SPCE/ERGO/PNR electrodes by electrodeposition methods. Electrochemical characterization of each preparation step of the SPCE/ERGO/PNR/AuNP electrodes were performed by cyclic voltammetry (CV) methods. Immobilization of tyrosinase enzyme on SPCE/ERGO/PNR/AuNP electrodes was done with glutaraldehyde crosslinker. Optimum pH, optimum enzyme amount and optimum vorking potentiols of the prepared phenol biosensors were determined by amperometric method. Electrochemical characterization of the phenol biosensors was carried out under optimum conditions. The results of analytical characterizations, repeatability for 10 µM phenol, sensitivity, the limit of detection and the limit of quantification and the linear range were found to be 4.36% (n = 5) as relative standard deviation (R.S.D.), 0.326 µA. mM^{-1}; 2.36 µA.mM^{-1} and 7.86 µA.mM^{-1} and was 5 µM - 150 µM respectively. The application of the prepared phenol amperometric biosensors was carried out fort he determination of phenol in wastewater.

2021, 59 pages

KEY WORDS: Electrochemical reduced graphene oxide, polyneutral red, phenol, biosensor, screen-printed carbon electrode

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışma döneminde, mesleki bilgi ve birikimlerinin çalışmama yapmış olduğu katkılardan dolayı danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Muhammed ALTUN'a,

Tezimin laboratuvar çalışmaları sırasında bana yardımcı olan Merve YILMAZ'a,

Bölümümüzün her türlü imkanından faydalanmamı sağlayan Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümüne,

EYO080120L09 nolu projemin desteklenmesi ile çalışmama katıda bulunan Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine,

Her zaman varlığını ve desteğini esirgemeyen sevgili eşime ve oğluma teşekkürlerimi sunarım.

Şakir KAMAÇ
Çankırı, Haziran 2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR iiiii
İÇİNDEKİLER iv
SİMGELER DİZİNİ vii
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
ÇİZELGELER DİZİNİ x
1. KURAMSAL TEMELLER 1
1.1 Fenol 1
1.2 Biyosensör nedir? 3
1.2.1 Biyosensörlerin yapısı 3
1.2.2 Enzim immobilizasyonu 5
1.2.3 Polinötral kırmızı (PNR) 8
1.2.4 Altın nanopartikül (AuNP) 8
1.2.5 Grafen, grafen oksit, indirgenmiş grafen oksit 9
1.2.6 Tirozinaz (TYR) 10
2. LİTERATÜR ÖZETİ. 12
3. MATERYAL ve METOT 15
3.1 Materyal 15
3.1.1 Kimyasallar 15
3.1.2 Cihazlar 15
3.1.3 Elektrokimyasal ölçüm sistemi 15
3.2 Metot 17
3.2.1 Elektrot yüzeylerinin temizlenmesi 17
3.2.2 Tampon çözeltilerin hazırlanması 17
3.2.3 SPCE'lerin ERGO ile modifikasyonu 17
3.2.4 SPCE/ERGO PNR elektrodunun hazırlanması 18
3.2.5 SPCE/ERGO/PNR üzerinde AuNP'nin hazırlanması 18
3.2.6 Fenol biyosensörünün hazırlanması 18
4. BULGULAR 20
4.1 SPCE'ler Üzerinde ERGO'nun Hazırlanması 20

4.2 SPCE/ERGO/PNR/AuNP'nin Morfolojik Karakterizasyonu 28
4.3 SPCE/ERGO/PNR/AuNP Elektrotlarının Elektrokimyasal karakterizasyonu……. 29
4.4 SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA Fenol Biyosensörünün Elektrokimyasal Karakterizasyonu…….…….31
4.5 SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA Fenol Biyosensörünün Optimum Çalışma Parametrelerinin Belirlenmesi 35
4.5.1 pH optimizasyonu 35
4.5.2 Enzim miktar optimizasyonu 36
4.5.3 Çalışma potansiyelinin optimizasyonu 38
4.6 Amperometrik Fenol Biyosensörünün Analitiksel Karakterizasyonları 40
4.6.1 Doğrusal çalışma aralığı, tespit limiti ve tekrarlanabilirliğin belirlenmesi 40
4.6.2 Uygulama ve depolama kararlılığı 43
4.6.3 Girişim testi 45
4.6.4 Gerçek numune (atık su) analizi 46
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 48
KAYNAKLAR 52
ÖZGEÇMİŞ 59

SİMGELER DİZİNİ

A	Elektrot yüzey alanı
AuNP	Altın nanoparçacık
CV	Dönüşümlü voltametri
D	Difüzyon katsayısı
ERGO	Elektrokimyasal olarak indirgenmiş grafen oksit
Epa	Anodik pik potansiyeli
Epc	Katodik pik potansiyeli
GO	Grafen oksit
μA	Mikroamper
mV	Milivolt
n	Alınan verilen elektron sayısı
PNR	Polinötral kırmızı
RGO	İndirgenmiş grafen oksit
SPCE	Yüzey baskılı karbon elektrot
TYR	Tirozinaz
v	Tarama hızı
V	Potansiyel

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Biyosensörlerin yapısının şematik gösterimi 4
Şekil 1.2 Biyosensörlerin sınıflandırılması 5
Şekil 1.3 Enzim immobilizasyon yöntemleri 6
Şekil 1.4 Nötral kırmızı molekül formülü 8
Şekil 1.5 Grafen ve grafen oksitin bal peteği görüntüsü 10
Şekil 3.1 Yüzey baskılı karbon elektrotlar (SPCE) 16
Şekil 3.2 Sensör konnektör çeşitleri 16
Şekil 3.3 Elektrokimyasal hücre 16
Şekil 3.4 Dropsens µStat 400 Bipotentiostat/Galvanostat 17
Şekil 4.1 SPCE üzerindeki 5 döngü ERGO'nun hazırlanmasıyla elde edilen dönüşümlü voltamogramlar 20
Şekil 4.2 SPCE üzerindeki 10 döngü ERGO'nun hazırlanmasıyla elde edilen dönüşümlü voltamogramları 21
Şekil 4.3 SPCE üzerindeki 15 döngü ERGO'nun hazırlanmasıyla elde edilen dönüşümlü voltamogramları 21
Şekil 4.4 SPCE üzerindeki 20 döngü ERGO'nun hazırlanmasıyla elde edilen dönüşümlü voltamogramları (0,0 V ile -1,5 V potansiyel aralığında, 50 $mV.s^{-1}$ ..... tarama hızında, 20 döngü) 22
Şekil 4.5 SPCE/$(ERGO)_{5n}$ elektrodunun farklı tarama hızlarında (10, 25, 50, 75, 100, 125 $mV.s^{-1}$) edilen dönüşümlü voltamogramlardan elde edilen A)pik akımı-tarama hızı ve B) tarama hızının karekökü grafikleri 24
Şekil 4.6 SPCE/$(ERGO)_{10n}$ elektrodunun farklı tarama hızlarında (10, 25, 50, 75, 100, 125 $mV.s^{-1}$) edilen dönüşümlü voltamogramlardan elde edilen A)pik akımı-tarama hızı ve B) tarama hızının karekökü grafikleri 25
Şekil 4.7 SPCE/$(ERGO)_{15n}$ elektrodunun farklı tarama hızlarında (10, 25, 50, 75, 100, 125 $mV.s^{-1}$) edilen dönüşümlü voltamogramlardan elde edilen A)pik akımı-tarama hızı ve B) tarama hızının karekökü grafikleri 26
Şekil 4.8 SPCE/$(ERGO)_{20n}$ elektrodunun farklı tarama hızlarında (10, 25, 50, 75, 100, 125 $mV.s^{-1}$) edilen dönüşümlü voltamogramlardan elde edilen A) pik akımı-tarama hızı ve B) tarama hızının karekökü grafikleri 27
Şekil 4.9.A) Yalın SPCE, B) SPCE/ERGO C)SPCE/ERGO/PNR ve D) SPCE/ERGO/PNR /AuNP elektrotlarının SEM görüntüleri 28
Şekil 4.10 SPCE/ERGO/PNR/AuNP elektrodunun SEM-EDX analizi sonuçları 29
Şekil 4.11 SPCE, SPCE/ERGO, SPCE/ERGO/PNR, SPCE/ERGO/PNR/AuNP ve SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA elektrotlarının $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (1 M KCl içinde) çözeltisinde elde edilen dönüşümlü voltamogramları 30
Şekil 4.12 SPCE/ERGO/PNR/AuNP elektrodunun 0,5 mM fenol varlığında ve yokluğundaki dönüşümlü voltamogramları 31
Şekil 4.13 SPCE/ERGO/PNR/AuNP elektrodunun 0,5 mM katekol varlığında ve yokluğundaki dönüşümlü voltamogramları 32
Şekil 4.14 SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörünün 0,5 mM fenol varlığında ve yokluğundaki dönüşümlü voltamogramları 33
Şekil 4.15 SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörünün 0,5 mM katekol varlığında ve yokluğundaki dönüşümlü voltamogramları 34
Şekil 4.16 Farklı pH'larda hazırlanan 1mM fenol çözeltisinin, SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörleri kullanılarak elde edilen

akım-pH grafiği 35
Şekil 4.17 Farklı konsantrasyonlardaki enzim miktarı (100 U, 200U, 300 U, 400 U ve 500 U) ile hazırlanan fenol biyosensörlerinin 10 µM fenol ilavesiyle elde edilen kronoamperogramları 36
Şekil 4.18 SPCE/ERGO/PNR/AuNP'nın farklı konsantrasyonlardaki enzim miktarı (100 U, 200U, 300 U, 400 U ve 500 U) ile hazırlanan biyosensörlerinin 10 µM fenol ilavesine karşı elde edilen akım farkı-konsantrasyon grafikleri 37
Şekil 4.19 SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörlerinin farklı çalışma potansiyellerinde (-0,10 V, -0,15 V, -0,20 V ve -0,25 V) 10 µM fenol ilavesine karşı elde edilen akım farkı-konsantrasyon grafikleri 39
Şekil 4.20 SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörleri ile farklı çalışma potansiyellerinde (-0,10 V, -0,15 V ve -0,20 V) 5 µM fenol ilavesine karşı elde edilen akım farkı grafikleri 40
Şekil 4.21 SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensöründe 10 µM fenolün ardışık katımı ile elde edilen örnek bir amperogram 41
Şekil 4.22 SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörleri ile 10 µM fenol konsantrasyonuna karşı elde edilen akım farkı grafiği 42
Şekil 4.23 SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörlerinin 10 µM fenol derişimine karşı elde edilen yüzde bağıl akım değerleri-gün sayısı grafiği... 43
Şekil 4.24 SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörünün farklı depolama sürelerinde 10 µM fenol konsantrasyonuna karşı elde edilen akım farkı grafikleri.. 44
Şekil 4.25 SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörlerine 1 mM NO^{3-}, K^{+}, Ca^{+2}, Mg^{+2}, $CO3^{-2}$, $SO4^{-2}$ ve 10 µM fenol eklenmesiyle elde edilen kronoamperogramı 46
Şekil 4.26 SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörleri ile dört farklı atık su numunelerine 10 µM fenol eklenmesiyle elde edilen amperogramları..... 47

ÇİZELGELER DİZİNİ

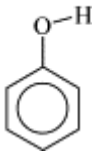
Çizelge 1.1 Fenolün bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri.....1
Çizelge 4.1 Şekil 4.11'de verilen dönüşümlü voltamogramlardan elde edilen Ep ve Ip değerleri.....30
Çizelge 4.2 Şekil 4.18'de verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayıları değerleri.....38
Çizelge 4.3 Şekil 4.20'de verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayıları değerleri.....40
Çizelge 4.4 Geliştirilen amperometrik fenol biyosensörünün analitiksel parametreleri. 42

1. KURAMSAL TEMELLER

1.1 Fenol

Kimyasal formülü C_6H_5OH olan ve monohidroksibenzen olarak da adlandırılan fenol, fenil halkasına bağlı bir hidroksil grubundan meydana gelmiş aromatik bir bileşiktir. Fenol kelimesi aynı zamanda, 6 üyeli aromatik halkaya doğrudan bağlanmış hidroksil gruplu bileşenlerin genel adıdır. Fenol, bu organik bileşikler içinde en basit yapılı olanıdır (Othmer 1982). Fenol ilk olarak 1834'te Alman kimyager Runge tarafından kömür katranından izole edilmiştir. Ortam sıcaklığında ve basıncında higroskopik kristal bir katıdır. Saf olduğunda, katı fenol beyazdır ancak çoğunlukla içerdikleri safsızlıklardan dolayı renklidir. Fenol, benzen gibi hidrokarbonların yanı sıra, etil alkol, eter ve birkaç polar çözücü içinde çok çözünür. Suda sınırlı bir çözünürlüğe sahiptir ve zayıf bir asit gibi davranır. Yanıcı bir bileşiktir. Tipik keskin tatlı, tıbbi veya katran benzeri bir koku ile karakterizedir (Amore and Hautala 1983). Fenik asit veya karbolik asit olarak da adlandırılan fenolün bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri Çizelge 1.1'de verilmiştir (Busca 2008).

Çizelge 1.1 Fenolün bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri

Formül	C_6H_5OH 
Moleküler ağırlık (g / mol)	94.11
T_{eriyik} (° C)	40.9
T_{eb} (° C)	181,75
Suda çözünürlük (rt)	9.3 g fenol/100 mL $H_2Ö$
pK_{a}	9,89
Havada tutuşabilirlik sınırları (hacimce %)	1.7 (daha düşük)
	8.6 (daha yüksek)
Parlama noktası (° C)	79 (kapalı kap)
Kendiliğinden tutuşma sıcaklığı (° C)	715

Fenolün dünyadaki yıllık üretimi 6 milyon tondan fazladır. Fenolün %95'i üç aşamalı kümen sentezi ile üretilir. Benzen ve propilen reaksiyonundan kümen sentezlenir. Elde edilen kümen hidrojen peroksit ile oksitlenerek kümen peroksiti oluşturur. Asit ile kümen peroksitler fenol ve asetona parçalanır (Busca 2008).

Fenol pek çok endüstriyel ürün ve kimyasalın ham maddesi olup, 1-7000 mg/L arasındaki derişimlerde petrokimya, kâğıt, tekstil, dezenfektan, antioksidan endüstrileri, yağ rafinerileri, kimyasal tesisler, patlayıcı ve fotoğrafçılıkta kullanılan bazı kimyasalların üretimi, kâğıt hamuru ve kâğıt ağartma tesisleri, reçine, pestisit, insektisid, çözücü endüstrileri, uçak bakım ve dökümhane işletmeleri, azot çalışmaları, cam elyafı fabrikaları, demir-çelik, ve eczacılık alanında kullanılmaktadır (Jianlong *et al*. 2000). En fazla kullanımı (%35), inşaat, otomotiv ve beyaz eşya endüstrilerinde kontrplak yapıştırıcısı olarak uygulanan düşük maliyetli bakalit (fenol-formaldehit) reçinesi üretimidir (Busca 2008).

Fenoller insanlarla doğrudan temas halinde bulunduklarında, deri ve akciğer yoluyla solunarak hızla emilirler. Bu durum genetik hasara neden olabilir, solunum ve sindirim sistemlerini, gözleri, deriyi, beyni, böbrekleri, kalbi ve karaciğeri tehlikeye atabilir (Damjanovic *et al*. 2010). Orta miktarlarda maruz kalma meydana geldiğinde, vücut idrar yoluyla dışarı atabilir, ancak yüksek miktarlarda fenol insanlar için ölümcül olabilir (Babich *et al*. 1981). Fenoller ayrıca algler, protozoa, omurgasızlar ve omurgalılar dahil olmak üzere doğal biyotaya, örneğin doğurganlığın azalması ve büyümenin engellenmesine neden olabilir. Ayrıca deri ve hücre zarlarına kolayca nüfuz ettikleri için solunum ve fotosentez süreçlerinde biyokataliz reaksiyonlarının hızlarını da etkilerler (Babich *et al*. 1981).

Fenol, insan sağlığı ve su yaşamı için ciddi bir potansiyel tehlike oluşturan toksik bir kirleticidir. Geniş endüstriyel uygulaması nedeniyle genellikle su ortamlarına salınır. Toksisitesi nedeniyle, ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA) ve Avrupa Birliği (AB) fenolü öncelikli toksik kirletici olarak listelemiştir ve içme suyunda 0,5 ppb'lik standart bir geçirgen toplam sınır belirlemiştir. Gaz kromatografisi / kütle spektrometrisi (Bosch *et al*. 1987), sıvı kromatografi (Huang *et al*. 2008), kapiler

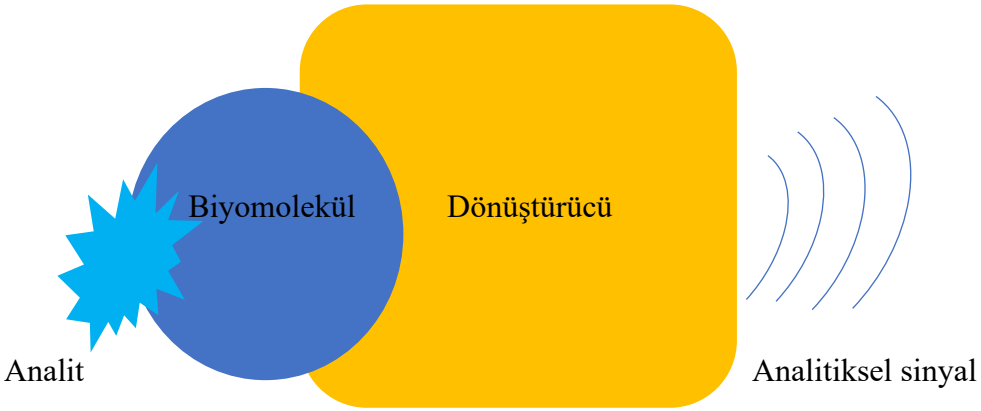
elektroforez (Wei *et al*. 2008) ve UV/VIS spektrofotometre (Meng *et al*. 2011) fenolün kantitatif analizi için kullanılan metotlardır. Bu yöntemler genellikle karmaşık numune ön işlemlerini gerektirir sahada veya yerinde izleme uygulamaları için elverişsizdir. Amperometrik biyosensörler, kompakt yapı, hızlı yanıt, düşük maliyet, düşük güç tüketimi ve saha uygulamalarında kolay kullanım gibi çeşitli avantajları nedeniyle mükemmel bir alternatiftir (Hanrahan *et al*. 2004).

1.2 Biyosensör nedir?

Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) biyosensörü, "biyolojik bir tanıma elemanı kullanarak seçici kantitatif veya yarı kantitatif analitik bilgi sağlayabilen, bağımsız bütünleşmiş bir cihaz olarak" açıklamaktadır.

1.2.1 Biyosensörlerin yapısı

Örnek içinde bulunan analitin konsantrasyonunu ya da aktivitesini belirlemek için transduserle biyobileşenin birleşimini içeren cihazlara biyosensörler denir (Rustagi and Pravesh Kumar 2013). Biyosensörler genellikle üç elemanlı bir sistem olarak tanımlanır (Goode *et al*. 2015). Bunlar, seçici tanıma mekanizmasına sahip biyobileşen (biyomolekül, biyoreseptör), biyobileşenin analit ile etkileşimi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştüren dönüştürücüler (transducer, çevirici) ve sinyali görüntüleyen elektronik bölümler olarak sıralanabilir. Genel olarak bir biyosensörün ana elamanları Şekil 1.1'de gösterilmiştir.

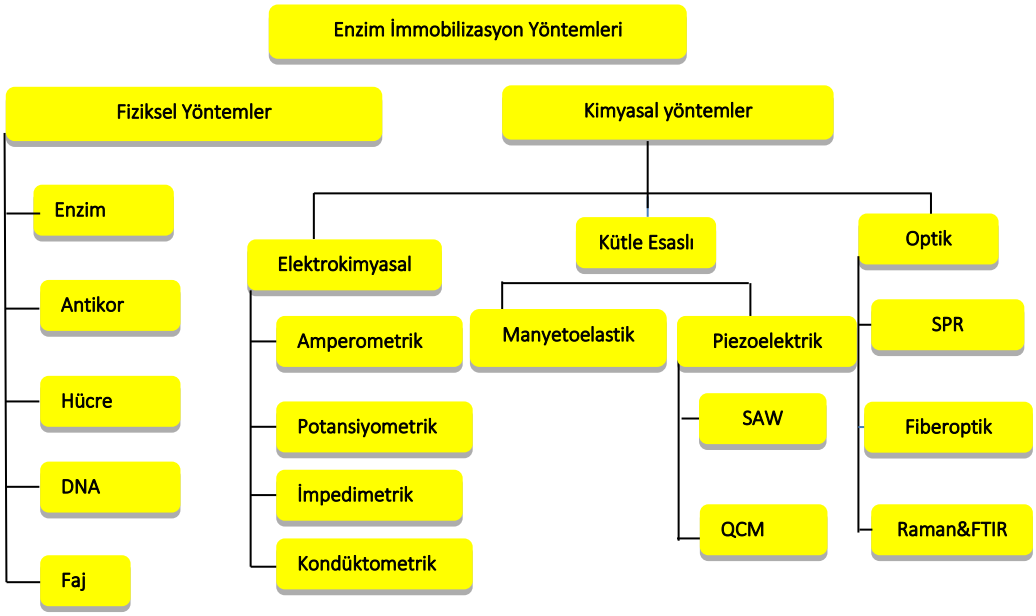


Şekil 1.1 Biyosensörlerin yapısının şematik gösterimi

Biyomolekül, sensör performansını etkileyen en önemli bileşendir. Analite karşı yüksek hassasiyet ve seçicilik gibi özelliklere sahip olmalıdır (Mehrotra 2016). Enzimler hedef moleküllerine karşı oldukça özgül oldukları için biyobileşen olarak en çok kullanılan moleküllerdir (Mello and Kubota 2002). Biyosensörlerde biyobileşen olarak enzimlerin yanı sıra antikorlar, nükleik asitler, doku kültürleri, mikroorganizmalar ve organeller de kullanılabilmektedir (Telefoncu 1999).

Dönüştürücüler ise biyoreseptörün analiti fark ettiği esnada ürettiği kimyasal veya fiziksel sinyali elektrik sinyallerine dönüştüren yapılardır (Zhang *et al*. 2014). Elektrokimyasal (amperometrik, potansiyometrik, kondüktometrik), akustik, optik, mekanik, piezoelektrik, kalorimetrik ve manyetik özellikte olabilir (Castillo *et al*. 2004, Mao *et al*. 2008).

Biyosensörler, biyobileşenlere veya dönüştürücü türlerine göre sınıflandırılabilir (Velusamy *et al*. 2010). Şekil 1.2 biyosensörlerin sınıflandırılmasını göstermektedir.

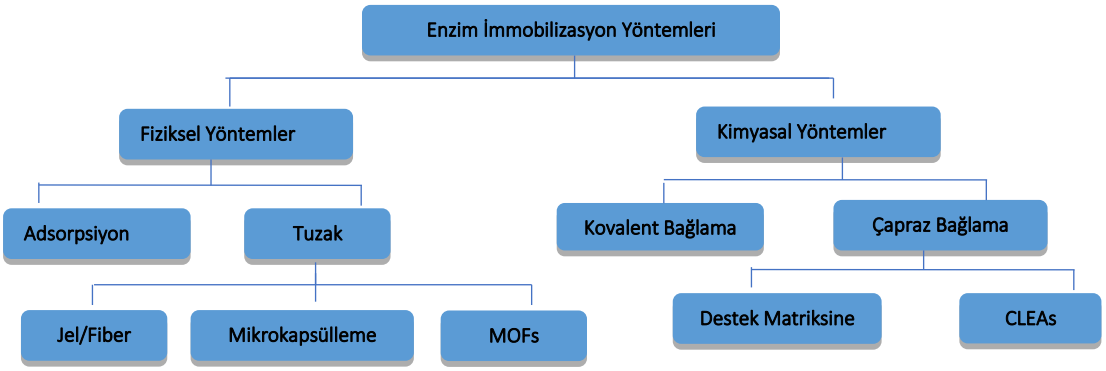


Şekil 1.2 Biyosensörlerin sınıflandırılması (Velusamy *et al*. 2010)

1.2.2 Enzim immobilizasyonu

Bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan enzimler, biyokimyasal ve kimyasal reaksiyonları katalize eden proteinlerdir. Yüksek katalitik aktivite, seçicilik, özgüllük ve biyolojik olarak parçalanabilirlik gibi avantajlara sahip katalizörlerdir (Liu *et al*. 2018). Enzimler, düşük pH, sıcaklık ve basınçta çalışabilirler (Koeller and Wong 2001). Ancak enzimler reaksiyona girdikten sonra geri kazanılamaz ve tekrar kullanılamazlar (Datta *et al*. 2013). Bu dezavantaj, immobilizasyon yöntemleriyle giderilebilir. İmmobilize enzim ilk olarak 1916'da rapor edilmiştir. Bu çalışmada, kömür üzerinde fiziksel olarak adsorbe edilen invertazın katalitik aktivitesini mükemmel şekilde koruduğunu gözlemlemiştir (Nelson and Griffin 1916). İmmobilizasyon, enzimin kolayca geri kazanılmasını ve enzim analizinin hızlıca sonlandırılmasını sağlayarak enzim analiz maliyetini düşürmektedir. Ayrıca immobilizasyondan sonra, depolama stabilitesi, pH ve termal dirençler genellikle iyileşir. Bu avantajlara dayanarak immobilize enzimler, ilaç endüstrisi, gıda endüstrisi, atık su arıtma ve tekstil endüstrisi gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak uygulanmaktadır (Liu *et al*. 2018).

Enzim immobilizasyonu, suda çözünen enzimleri faydalı bir şekilde çözünmez hale getiren kolaylaştırıcı bir yöntemdir. Enzimin, farklı bir faza (matris/destek) tutuklanması olarak tanımlanır (Wahap *et al*. 2020). Enzimler ve destek (taşıyıcı) materyal arasındaki etkileşimlere göre enzim immobilizasyon yöntemleri fiziksel ve kimyasal yöntemler olarak sınıflandırılabilir. Adsorpsiyon ve tutuklama, enzimler ve destek taşıyıcıları arasında kovalent etkileşimlerin olmadığı fiziksel; kovalent bağlanma ve çapraz bağlanma ise kimyasal yöntemlerdir. Bazı durumlarda, enzimlerin immobilizasyonu için çoklu enzim-destek etkileşimlerinden yararlanılır. Yukarıda belirtilen enzim immobilizasyon yöntemleri Şekil 1.3'te gösterilmektedir (Liu *et al*. 2018). Adsorpsiyon (Junior *et al*. 2016), kovalent bağlanma (Zhu *et al*. 2014), çapraz bağlama (Sahutoglu and Akgul 2015) ve tutuklama (Bilal and Asgher 2015) yaygın olarak kullanılan immobilizasyon yöntemleridir. İmmobilizasyon yöntemlerinin yanı sıra, destek materyalleri de enzimlerin immobilizasyonu için hayati öneme sahiptir. İnert polimerler ve inorganik malzemeler genellikle enzimlerin immobilizasyonu için taşıyıcı matrisler olarak kullanılır (Datha *et al*. 2013).



Şekil 1.3 Enzim immobilizasyon yöntemleri (Liu *et al*. 2018)

Adsorpsiyon: Adsorpsiyon, enzimlerin immobilizasyonu için basit ve uygun bir yöntemdir. Fiziksel adsorpsiyon genellikle iyon adsorpsiyonu ve afinite adsorpsiyonunu içerir. Bu immobilizasyon yönteminde yaygın olarak kullanılan destekler iyon değiştirici reçineler, aktif kömür, silika jel, alümina, gözenekli cam ve seramiklerdir. Hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri, elektrostatik etkileşimler veya hidrofobik etkileşimlerle destek taşıyıcılarının yüzeylerine adsorbe edilir (Bastida *et al*. 1998, Rezwan *et al*. 2004, Junior *et al*. 2016) veya mezogözenekli malzemelerin

gözeneklerine immobilize edilir (Fan *et al*. 2003, Pang *et al*. 2016). Enzimlerin destek matrislerine adsorpsiyonu, yalnızca belirli bir inkübasyon süresi boyunca karıştırılarak düşük maliyetle gerçekleştirilebilir. Bu yöntemde, enzimlerin immobilizasyonu için modifikasyon aşamalarına gerek yoktur ve destek matrisleri yeniden oluşturulabilir. Ancak fiziksel adsorpsiyonda, enzimler ve destek taşıyıcıları arasındaki etkileşimler zayıftır ve tersine çevrilebilir. Bağlanma kuvvetleri pH, sıcaklık ve iyonik güçteki değişikliklere karşı hassastır, bu da immobilize edilmiş enzimlerin zayıf kararlılığına neden olur (Liu *et al*. 2018).

Kovalent Bağlama: Kovalent bağlama, enzimlerin immobilizasyonu için kullanılan geleneksel yöntemlerden biridir. Bu yöntemde kovalent bağlar, destek materyalleri ile enzimlerin lizin, sistein ve glutamik asit gibi yan zincir amino asitleri arasındaki kimyasal reaksiyonlarla oluşur (Cirillo *et al*. 2014). Amino, karboksilik, imidazol, indolil ve fenolik hidroksil gruplarının işlevsel grupları kovalent bağların oluşumu için uygundur (D'Souza 1999). Kovalent bağlar, destek matrislerinden enzimlerin yüzeyden ayrılmasını önlemek için kararlıdır. Bu durum immobilize edilmiş enzimlerin kararlılığını artırır. Ancak, enzim molekülleri ile destek matrisleri arasındaki kimyasal reaksiyonlar nedeniyle, enzimin aktif bölgeleri inaktive olabilir ve bu da katalitik aktivitelerde azalmalara neden olur (Liu *et al*. 2018).

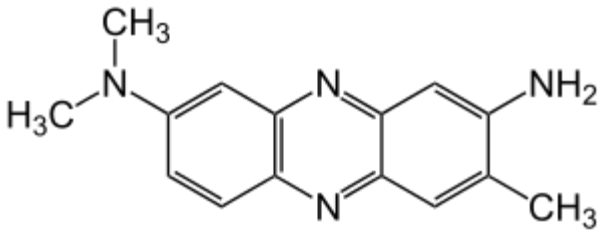
Hapsetme: Enzimler kümeleşme eğilimindedir ve bu durum enzimlerin katalitik aktivitelerini azaltır. Hapsetme, enzimlerin polimerik ağlarda tutulduğu düşük maliyetli bir immobilizasyon yöntemidir. Bu yöntem enzimlerin toplanmasını önlemek için pratik bir yöntemdir. Hapsetme için kitosan, kalsiyum aljinat, kolajen, selüloz triasetat, poli akrilamid, jelatin, agar, silikon kauçuk, polivinil alkol ve poliüretan gibi çeşitli matrisler kullanılabilir (Liu *et al*. 2018).

Çapraz Bağlama: Moleküller arası reaksiyonlarla, enzimler iki işlevli reaktifler kullanılarak destek matrislerine çapraz bağlanır. Bu immobilizasyon yönteminde, kovalent bağlarla enzimler, yeniden kullanılabilirliği ve kararlılığı artırmak için sıkı bir şekilde hareketsiz hale getirilir. Ancak, enzimler çapraz bağlama işlemi sırasında katalitik aktivitelerini kaybedebilirler (Liu *et al*. 2018). İki işlevli reaktif olarak;

glutaraldehit, kloroformat ve karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsülfonlar, benzokinon, transizyon metal iyonları ve epiklorhidrinlerdir kullanılmaktadır (Wang 1999).

1.2.3 Polinötral kırmızı (PNR)

Nötral kırmızı (NR; N8, N8, 3-trimetil-fenazin-2,8,-diamin klorür), optik veya elektrokimyasal metotlar kullanarak DNA'nın tayini, biyolojik materyalleri incelemek için bir renklendirici ve pH indikatörü gibi çeşitli amaçlarla kullanılan bir fenazin boyasıdır. Fenazinler elektrokimyasal olarak polimerleştirilerek sensör ve biyosensörlerde iletkeliği artırıcı ve redoks medyatörü olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Pauliukaite and Brett 2008). Nötral kırmızının molekül formülü Şekil 1.4'te gösterilmiştir.



Şekil 1.4 Nötral kırmızı molekül formülü

1.2.4 Altın nanopartikül (AuNP)

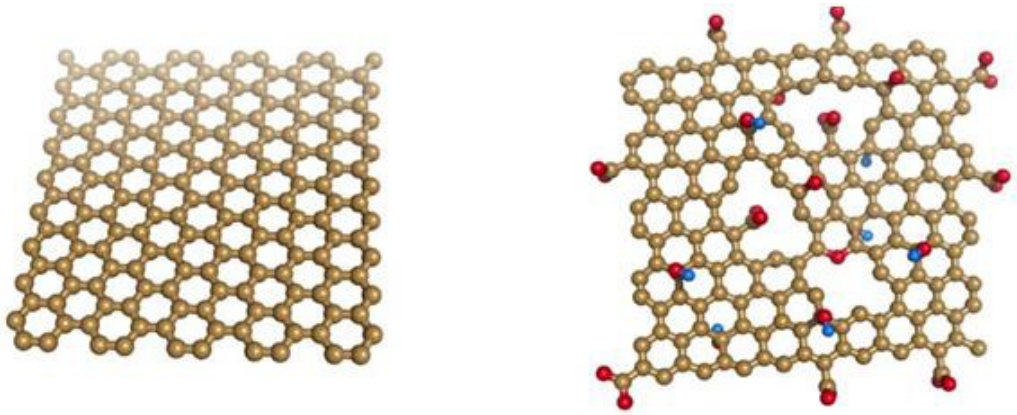
Nano boyutlu materyaller biyosensörlere yüksek duyarlılık ve seri analit tespiti gibi özellikler kazandırmıştır (Kumar *et al*. 2015). Altın nanopartiküllerin inert yapıda olması, iletkenliğinin, yüzey alanının ve yüzey enerjisinin yüksek olması biyosensörde kullanılması için iyi bir seçenektir. (Godoy-Reyes *et al*. 2019). Yalın elektrot kullanımı biyosensörlerin performansını kısıtlarken altın nanopartiküller elektrot yüzey alanını güçlendirir ve biyosensörün performansını arttırır (Ahmad *et al*. 2018).

Altın nanopartiküllerin biyosensör tasarımında, elektrot modifikasyonu ya da elektrotun temel metaryali olarak kullanılması, analitik sinyalde ve yapılan çalışmanın

hassasiyetinde önemli bir artış sağlamaktadır. Ayrıca enzimatik, DNA veya immüno esaslı biyosensörlerin immobilizasyon için ideal bir destek metaryal görevi üstlenmektedir (Trojanowicz 2006).

1.2.5 Grafen, grafen oksit, indirgenmiş grafen oksit

Grafen (G), grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksit (RGO), biyo-uyumlulukları nedeniyle biyosensörlerin üretimi için kullanılan nanomalzemelerdir (Taniselass *et al*. 2019). Fiziksel olarak bu nanomalzemeler, biyoalgılama işlemlerinde biyoalgılayıcı immobilizasyonunu artıran yüksek bir yüzey alanı/hacim oranı sergilemektedir (Dong *et al*. 2017). Grafen, sp^2 hibritleşmesi yapmış karbon atomlarının 2 boyutlu tek tabaka ve bal peteği örgüsü halinde paketlenmiş formu olarak tanımlanmaktadır. Geniş spesifik yüzey alanına, yüksek elektriksel termal iletkenliğe sahiptir. Grafenin türevi olarak bilinen grafen oksit, hidroksil, karbonil, karboksil ve epoksi grupları gibi fonksiyonel grupların varlığına bağlı olarak hidrofiliktir. Bu durum grafen oksitin yapısının kolayca değiştirilebilmesini sağlamaktadır. GO, ağırlıklı olarak alkoller ve epoksi gruplarını içeren sayısız oksit fonksiyonel gruplar içermektedir. Bu fonksiyonel gruplar GO esaslı kompozit malzemelerin sentezi için birçok materyal ile kolaylıkla fiziksel ya da kimyasal etkileşime girebilmesini sağlamaktadır. Ancak bozulmuş sp^2 bağ yapıları nedeniyle elektriksel olarak yalıtkan malzeme olması uygulamalarda büyük dezavantaj oluşturmaktadır. Özellikle elektrokimyasal işlemlerde kullanılacak olan GO kompozitlerinin iletken hale getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla kimyasal, termal ve elektrokimyasal yöntemlerle indirgenerek indirgenmiş grafen oksit sentezlenmektedir. Bu yöntemlerle sentezlenen RGO, özellikle elektriksel, termal ve mekanik özellikleri ile yüzey morfolojileri bakımından grafene oldukça benzer fiziksel ve kimyasal özellik sergilemektedir (Dreyer *et al*. 2010). Grafen ve grafen oksidin bal peteği görüntüsü Şekil 1.5'te gösterilmiştir.



Grafen Grafen Oksit

Şekil 1.5 Grafen ve grafen oksitin bal peteği görüntüsü

GO'nun elektrokimyasal olarak indirgenmiş grafen oksite (ERGO) elektrokimyasal indirgenmesi, sıcaklık ve basınç gibi ortam koşullarında çalışan ve elektrot potansiyelini ayarlayarak oksijen işlevlerinin kontrollü olarak azaltılmasını sağlayan basit ve ekonomik bir yöntemdir (Dogan *et al*. 2013).

Ayrıca grafen filmler, elektroanalitik uygulamalar için başka herhangi bir işleme gerek kalmadan doğrudan elektrotlar üzerinde elektrokimyasal olarak biriktirilebilir (Haque *et al*. 2012). Elektrokimyasal indirgeme iki yöntemden biriyle gerçekleştirilmiştir. İlki en yaygın olanıdır; modifiye edilmiş elektrot yüzeylerinde adsorbe edilen GO'nun elektrokimyasal indirgenmesini içerir (Wang *et al*. 2009). İkincisi, GO'nun sulu dispersiyonundan elektrot yüzeyindeki GO'nun doğrudan elektrokimyasal indirgenmesidir (Ambrosi *et al*. 2011).

1.2.6 Tirozinaz (TYR)

Fenol oksidaz, katekolaz, fenolaz, katekol oksidaz veya polifenol oksidaz olarak da bilinen tirozinaz (EC 1.14.18.1), 1856'da Schoenbein tarafından yenilebilir mantarlarda keşfedilmiştir (Casanola-Martin *et al*. 2014). Tirozinaz (Tyr) mikroorganizmalarda, hayvanlarda ve bitkilerde yaygın olarak bulunur ve bakır içeren çok işlevli bir enzimdir (Seo *et al*. 2003). Tirozinaz enziminin sistematik adı; 1,2-benzendiol:oksijen oksidoredüktaz'dır.

Tirozinaz, fenol biyosensörlerinde kullanılan ve fenolü katalizleyen bir enzimdir. Tirozinaz, moleküler oksijeni kullanarak, monofenollerin, o-difenollere hidroksilizasyonunu ve o-difenollerinde o-kinonlara oksidasyonunu katalizler (Liu *et al*. 2018).

Fenol+ tirozinaz(O_2) ⟶ katekol (1)

Katekol+ tirozinaz(O_2) ⟶ o-kinon (2)

o- kinonlar, herhangi bir elektron transfer aracısı olmaksızın aşağıda verilen eşitliğe göre düşük potansiyellerde o-difenollere indirgenebilirler.

o-kinon + $2H^+$ + 2e- ⟶ katekol (3)

Tirozinazın substratı olan katekol, melanin sentezinin iki farklı reaksiyonunu katalize eder. İlk reaksiyona monofenolaz aktivitesi denir. Bu reaksiyon, monofenollerin o-difenollere hidroksilasyondur (Penalver *et al*. 2002). İkinci reaksiyon ise difenolaz aktivitesi olarak adlandırılır. Bu reaksiyona göre, o-difenoller oksidize edilerek o- kinonlara dönüştürülür. Her iki reaksiyonda da moleküler oksijen kullanılır ve katekol okside olduğunda o-kinon ortaya çıkar (Toussaint and Lerch 1987).

Tirozinaz nötr tampon ve oda sıcaklığında oldukça kararlıdır. pH>8, pH<5 ve yüksek sıcaklıkta kararsızdır. Tirozinaz enzimi fenol dönüşümünü, pH=7'de katalizler (Ikehata and Nicell 2000).

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Serra ve arkadaşları, grafit-teflon, grafit-etilen 1 propilen dien (EPD) ve ağsı camsı karbon (RVC)-epoksi reçine kompozitleri üzerinde tirozinaz enziminin immobilizasyonuyla farklı fenolik bileşiklerin (fenol, katekol, 4-kloro-3-metilfenol, 4-kloro-2-metilfenol, 4-klorofenol, 2,4-dimetilfenol, 2,3-dimetilfenol ve 3,4-dimetilfenol) tayini için 3 farklı amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Fenol için lineer aralıkları sırasıyla (0,1-25)x10^{-6} mol.L^{-1}, (0,05-6)x10^{-6} mol.L^{-1} , (0,02-4)x10^{-6} mol.L^{-1} duyarlıkları sırasıyla (2,79±0.09)x105 μA.mol.L^{-1}, (6,2±0.2)x105 μA.mol.L^{-1} , (3,4±3)x103 μA. mol.L^{-1} ve tespit limitlerini sırasıyla 9,9x10^{-8} mol.L^{-1}, 2,63x10^{-8} mol.L^{-1} ve 1,1 x10^{-7} mol.L^{-1} olarak bulmuşlardır (Serra *et al*. 2002).

Campuzano ve arkadaşları, 3-merkaptopropiyonik asit (MPA) ve kendinden birleştirilmiş tek katmanları (SAM) ile modifiye edilmiş bir altın disk elektrot üzerinde tirozinaz enziminin çapraz bağlanarak immobilizasyonuna dayalı, birkaç fenolik bileşiğin (fenol, katekol, m-kresol, p-kresol, 4-kloro-3-metilfenol, 3-klorofenol, 4-klorofenol, 2,4-dimetilfenol, 3,4-dimetilfenol) ve 2-aminofenol) amperometrik tayini için biyosensör geliştirmişlerdir. Fenol için lineer aralık, duyarlık ve tespit limitinin sırasıyla (2-2000)x10^{-7} M, (1,39 ± 0,03) ×10^{-2} A.M^{-1} ve 8,8x10^{-8} M olduğu bildirilmiştir (Campuzano *et al*. 2003).

Dempsey ve arkadaşları, camsı karbon elektrot üzerinde politiyoninin elektropolimerizasyonunu gerçekleştirerek elde ettikleri modifiye elektrot üzerinde tirozinaz enzimini immobilize ederek endokrin bozucu 17α-Etinilöstradiol ve 17β-Oestradiol ile birkaç fenolik bileşiğin (fenol, nonilfenol ve Bisfenol) amperometrik tayini için bir amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Çalışma sonucunda fenol için duyarlık 4,47x10^{-5} A.mM^{-1}, lineer aralık 0,08 mM ve tespit sınırı 1,0 μM olarak bildirilmiştir (Dempsey *et al*. 2004).

Gutés ve arkadaşları, grafit-eposi kompozit elektrot ile tirozinaz enziminin immobilizayonuna dayalı fenol biyosensörü geliştirmişlerdir. Biyosensörle fenol, katekol ve m-kresolü amperometrik yöntemle tayin etmişlerdir. Üç analit için çeşitli

konsantrasyon aralıklarında çalışılmış fenol için lineer aralığı 0-130 μM olarak bulmuşlardır (Gutés *et al*. 2005).

Perez ve arkadaşları, poliakrilamid mikrojelleri içerisine hapsedilmiş tirozinaz enzimi ile fenolik bileşiklerin (3-klorofenol, 4-klorofenol, fenol, m-Kresol, p-kresol, dopamin ve katekol) tayini için amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Çalışma sonucunda fenol için tespit limiti 1,40 μM, duyarlık 41,36 $mA.M^{-1}cm^{-1}$ ve lineer aralık 5,0–22,0 μM olarak bulunmuştur (Perez *et al*. 2006).

Li ve çalışma arkadaşları, medyatörsüz bir fenol biyosensörü geliştirmişlerdir. Bu biyosensör camsı karbon elektrot üzerinde ZnO nanopartiküllerine tirozinaz enzimini tutuklama yöntemiyle hazırlanmıştır. Fenol biyosensörünün duyarlık değeri 182 $\mu A.M^{-1}$ olarak bulunmuştur (Li *et al*. 2006).

Liu ve arkadaşları tarafından kolloidal altınla modifiye edilmiş karbon hamur elektrot üzerinde tirozinazın immobilizasyonuyla yenilenebilir fenol biyosensörü hazırlanmıştır. Biyosensörün duyarlığı 12,3 $\mu A.cm^{-2}.\mu M^{-1}$, lineer aralığı 4-48 μM tespit limiti ise 6,1 μM olarak bulunmuştur (Liu *et al*. 2006)

Zhou ve Zhi, bor katkılı elmas elektrota tirozinaz enziminin karbodiimid ile çapraz bağlanmasıyla hazırlanan bir amperometrik fenol biyosensörü geliştirmişlerdir. Fenol biyosensörü için optimum pH değerini 6,5, duyarlığı 232,5 $mA.M^{-1}.cm^{-2}$, lineer aralığı 1-200 μM ve tespit limitini 0,2 μM olarak bulmuşlardır (Zhou and Zhi 2006).

Yıldız ve arkadaşları Os-kompleksi içinde tirozinazın immobilizasyonuna dayalı olarak fenol ve katekolün tespiti için bir amperometrik biyosensör geliştirilmişlerdir. Çalışma sonucunda fenol için tespit limitini 100 nM ve duyarlığı 0,15 $nA.\mu M^{-1}$ olarak bulmuşlardır (Yıldız *et al*. 2007).

Zejli ve arkadaşları, Sonogel-Karbon (katı karbon kompozit elektrot) dönüştürücü üzerinde alümina sol-jel ile tirozinaz immobilizasyonuna dayalı fenolün tespiti için bir

biyosensör geliştirilmişlerdir. Lineer aralık 0,5-30 μM, tespit limiti ise 0,3 μM olarak bulunmuştur (Zejli *et al*. 2008).

Guan ve arkadaşları, monomer olarak L- DOPA'yı ve L- DOPA polimerizasyonu için enzim katalizörü olarak tirozinazı kullanarak, PDM-Tyr kompozitlerini sentezleyerek atrazin ve fenolik bileşiklerin (fenol, p-klorofenol, p-kresol ve o- dihidroksibenzenin) tayini için bir biyosensör geliştirmişlerdir. Çalışma sonucunda fenol için duyarlık ve lineer aralığı sırasıyla 5122 $\mu A.mM^{-1}$ ve 10 nM, tespit limitini ise 1,25 μM olarak bulmuşlardır (Guan *et al*. 2016).

Wu ve arkadaşları, çalışmalarında medyatör içermeyen bir biyosensör geliştirmişlerdir. Çalışmalarında ilk önce iki boyutlu (2D) geçiş metali karbürlerinin (veya nitrürlerin) yeni bir sınıfı olan MXene-Ti_3C_2 sentezlemişlerdir. Ardından MXene süspansiyonunu, tirozinaz enzim çözeltisi ve nafyon çözeltisi ile karıştırıp camsı karbon elektrot üzerine damlatarak, fiziksel adsorpsiyon metodu ile biyosensörü hazırlamışlardır. Çalışma sonucunda fenol için linear aralık 0,05-15,5 $\mu mol.L^{-1}$, tayin sınırı 12 $nmol.L^{-1}$ ve duyarlık 414,4 $mA.M^{-1}$ olarak bulunmuştur (Wu *et al*. 2018).

Caetano ve arkadaşları, yüzey baskılı elektrotları, karbon nanotüpler ve altın nanopartiküller ile modifiye ederek tirozinaz enziminin kovalent bağlama immobilizasyonuna dayanan bir biyosensör geliştirmişlerdir. Dönüşümlü voltametri tekniği ile biyosensörün elektrokimyasal karakterizasyonundan sonra, fenol için tespit sınırı ve tayin sınırını sırasıyla 2,94 $nmol.L^{-1}$ ve 8,92 $nmol.L^{-1}$ olarak bulmuşlardır (Caetano *et al*. 2018).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Kimyasallar

Fenol (C_6H_5OH), katekol ($C_6H_6O_2$), grafen oksit (GO), tirozinaz (Tyr), nötral kırmızı (NR), kloroaurik asit ($HAuCl_4$), potasyum hekzosiyanoferrat ($K_3Fe(CN)_6$), potasyum hekzosiyanoferrit ($K_4Fe(CN)_6$) ve sodyum hidroksit (NaOH) Sigma-Aldrich firmasından, potasyum klorür (KCl), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4), dimetil formamid (DMF), hidroklorik asit (HCl, %37'lik) ise Merck firmasından tedarik edilmiştir. Kullanılan tüm kimyasallar yüksek analitik saflıktadır.

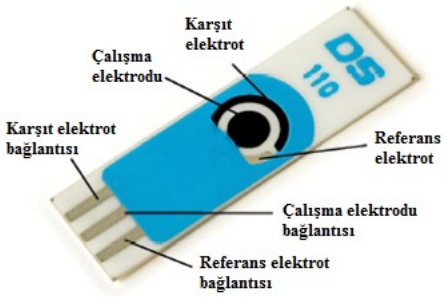
3.1.2 Cihazlar

Elektrokimyasal ölçümler için Dropsens µStat 400 Bipotentiyostat/Galvanostat kullanılmıştır. Uygun pH'da tampon çözelti hazırlamak için Mettler Toledo pH-metre kullanılmıştır. Bu pH-metre, kullanılmadan önce, standart tampon çözeltiler kullanılarak kalibre edilmiştir. Katı kimyasalların tartımı için; Radwag AS220/C/2 marka terazi kullanılmıştır. Deneylerde gereken ultra saf suyun tedariği için; Millipore Milli-Q ultra saf su cihazı kullanılmıştır.

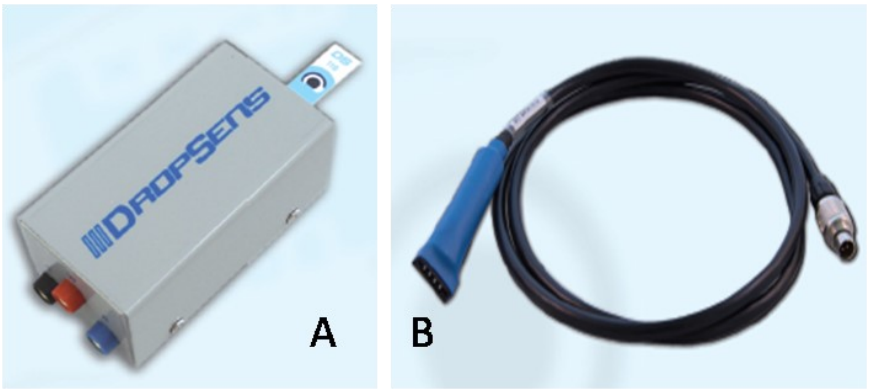
3.1.3 Elektrokimyasal ölçüm sistemi

Tez çalışmasında DropSens (Oveido, İspanya) firmasından temin edilen tek kullanımlık yüzey baskılı karbon elektrotlar (SPCE) kullanılmıştır. SPCE'lerin çalışma elektrotu (4 mm) ve karşıt elektrotu karbondan, referans elektrotu ise Ag/AgCl'den (0,1 M KCl) oluşmaktadır. Yüzey baskılı karbon elektrotların yapısı Şekil 3.1'de verilmiştir. Elektrotların potentiyostata bağlantısı, DropSens'ten temin edilen konnektörler ile yapılmıştır **(**Şekil 3.2). Deneylerde, metil metakrilat malzemesinden imal edilmiş olan elektrokimyasal hücreler kullanılmıştır (Şekil 3.3).

Voltametri ve kronoamperometri gibi çeşitli elektrokimyasal metotların çalışılabildiği DropSens µStat 400 Bipotentiostat/Galvanostat cihazı kullanılmıştır. Bilgisayar kontrollü olan Dropsens µStat 400 Bipotentiostat/Galvanostat cihazının sinyalleri DropView 8400 yazılımı ile değerlendirilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.1 Yüzey baskılı karbon elektrotlar (SPCE)



Şekil 3.2 Sensör konnektör çeşitleri A) kutu şeklinde B) kablo şeklinde



Şekil 3.3 Elektrokimyasal hücre



Şekil 3.4 Dropsens µStat 400 Bipotentiostat/Galvanostat

3.2 Metot

3.2.1 Elektrot yüzeylerinin temizlenmesi ve aktivasyonu

Yüzey baskılı karbon elektrotların (SPCE) yüzeylerinin temizlenmesi ve aktivasyonu için 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu (PBS) içerisinde +1,8 V'da 300 s boyunca potansiyel uygulanarak elektrokimyasal ön işlem uygulanmıştır (Şahin 2013, Sahin and Ayranci 2015, Bilgi and Ayranci 2016).

3.2.2 Tampon çözeltilerin hazırlanması

Deneylerde 0,1 M KCl içinde hazırlanan 50 mM PBS kullanılmıştır. Tampon çözeltilerin hazırlanmasında KH_2PO_4 ve K_2HPO_4, pH ayarlaması için 1 M NaOH ve 1 M HCl kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan tüm çözeltiler PBS içerisinde hazırlanmıştır.

3.2.3 SPCE'lerin ERGO ile modifikasyonu

GO'nun kararlı ve homojen süspansiyonun hazırlanması için 1,0 mg GO ve 1,0 mL DMF:H_2O (1:1) karışımına 2 saatlik sonikatör uygulanmıştır. SPCE'lerin yüzeyinde elektrokimyasal olarak indirgenmiş grafen oksitin (ERGO) hazırlanması için, GO süspansiyonundan 70 µL elektrotların yüzeyine damlatılmış ve 0,0 V ile -1,5 V potansiyel aralığında dönüşümlü voltametri (50 mV s^{-1}, 15 döngü) uygulanmıştır (SPCE/ERGO) (Yu *et al*. 2016). ERGO ile modifiye edilen SPCE'ler ultra saf su ile

yıkanmıştır. Ardından yüksek saflıkta argon gazı altında kurutulmuştur. ERGO ile modifiye edilen SPCE'ler SPCE/ERGO şeklinde kısaltılmıştır.

3.2.4 SPCE/ERGO/PNR elektrodunun hazırlanması

1,0 mM nötral kırmızı (NR), 25 mM pH 5,5 PBS (0,1 M KNO_3) çözeltisinde hazırlanmıştır. SPCE/ERGO üzerinde NR'nin elektropolimerizasyonu için dönüşümlü voltametri tekniği (E_1: -1,1 V, E_2: +0,9 V, 15 döngü, 50 $mV.s^{-1}$) uygulanmıştır (Barsan and Brett 2008, Şahin 2013, Sahin and Ayrancı 2015, Bilgi and Ayrancı 2016). Ardından elektrotlar ultra saf su ile yıkanmış ve kurutulmuştur (Ar gazı). PNR ile modifiye edilen SPCE/ERGO'lar SPCE/ERGO/PNR şeklinde kısaltılmıştır.

3.2.5 SPCE/ERGO/PNR üzerinde AuNP'nin hazırlanması

AuNP'nin SPCE/ERGO/PNR'lerin üzerine depozisyonu, 4 mM $HAuCl_4$ (50 mM pH 7,0 PBS, 0,1 M KCl) çözeltisine dönüşümlü voltametri uygulanması ile gerçekleştirilmiştir (E_1: -1,3 V, E_2: -0,2 V, 10 döngü, 50 $mV.s^{-1}$) (Karaboğa and Sezgintürk, 2019). Ardından elektrotlar ultra saf su ile yıkanmış ve kurutulmuştur (Ar gazı). AuNP ile modifikasyonu yapılan elektrotlar SPCE/ERGO/PNR/AuNP şeklinde kısaltılmıştır.

3.2.6 Fenol biyosensörünün hazırlanması

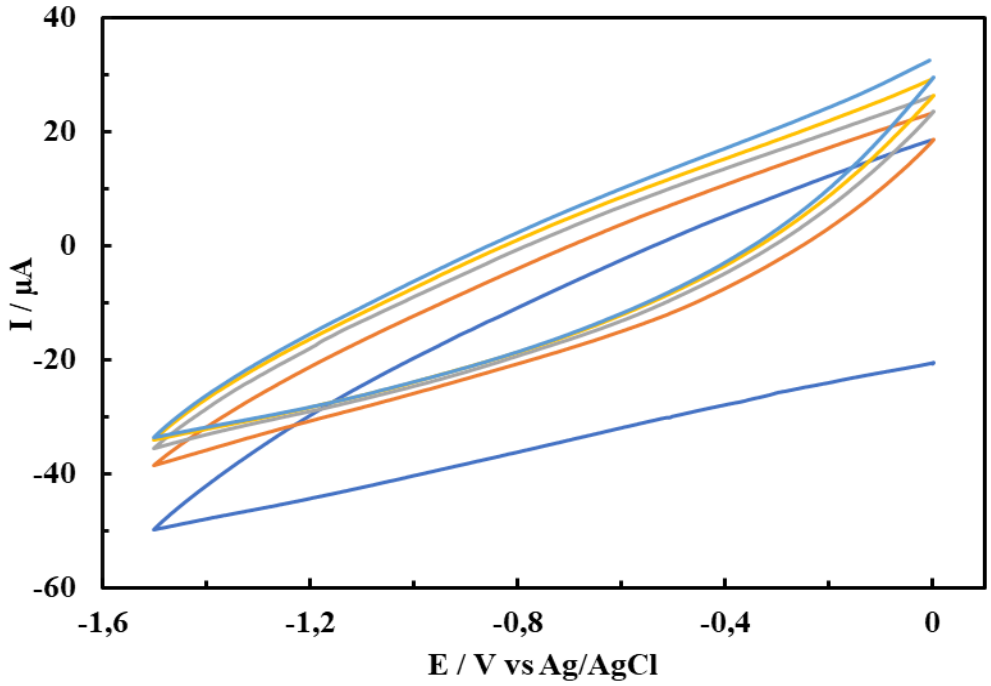
Fenol biyosensörünü hazırlamak için ilk olarak SPCE/RGO/PNR/AuNP'lerin yüzeyine tirozinaz enziminin immobilizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla 50 mM pH 7,0 PBS (0,1M KCl) içinde hazırlanan tirozinaz enzim çözeltisinden 1 µL (100 U) çalışma elektrotu yüzeyine damlatılarak 10 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında kuruyuncaya kadar bekletilmiştir. Bu işlem 4 kez tekrar edilmiş ve elektrot yüzeyine optimum enzim miktarı olan 400 U enzim damlatılmıştır (Cerrato-Alvarez *et al.* 2019). Ardından enzimin çapraz bağlanma yöntemi ile elektrot yüzeyine immobilizasyonu için %2,5 gluteraldehit (0,1 M KCl içeren 50 mM pH 7,0 PBS) çözeltisinden 1 µL damlatılmış ve karanlıkta 10 dakika bekletilmiştir (Erkmen *et al.* 2020). Ardından hazırlanan fenol

biyosensörü Ardından elektrotlar ultra saf su ile yıkanmış ve kurutulmuştur (Ar gazı). Hazırlanan fenol biyosensörleri hemen kullanılmıştır.

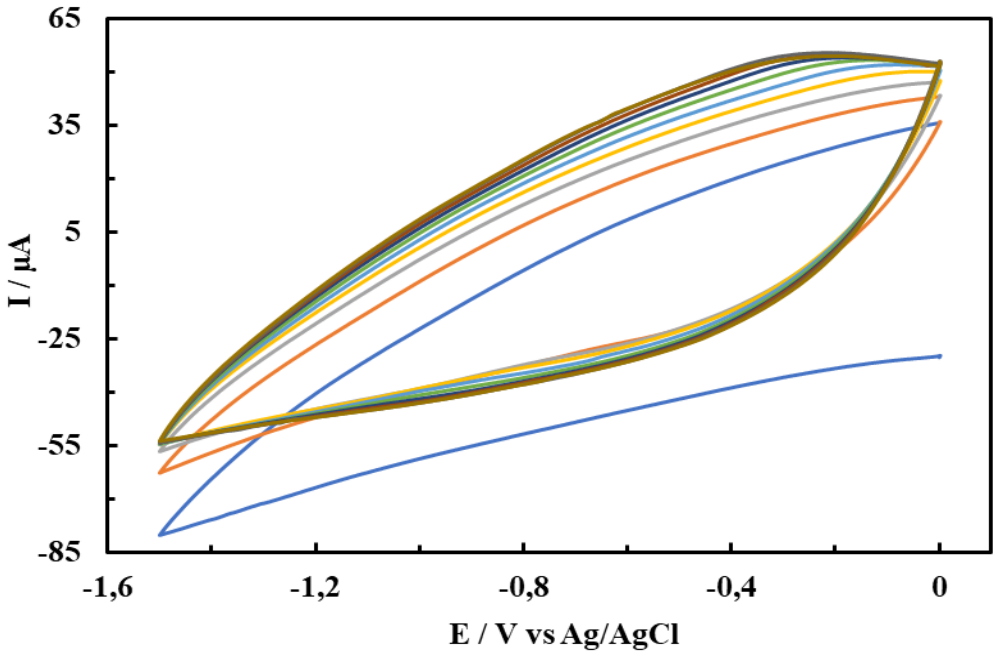
4. BULGULAR

4.1 SPCE'ler Üzerinde ERGO'nun Hazırlanması

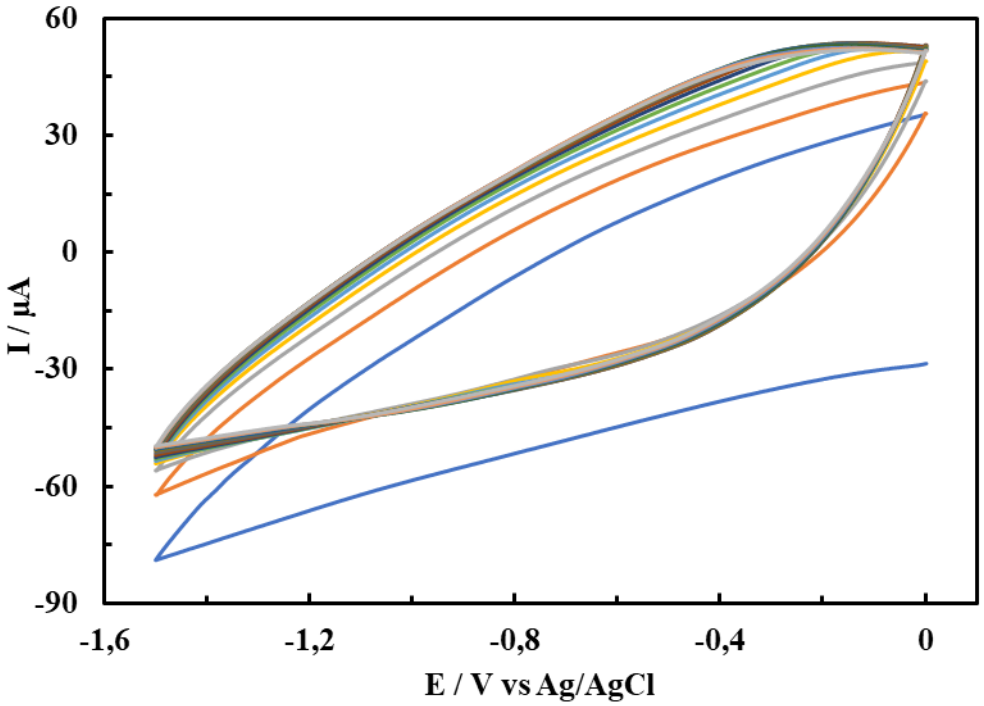
SPCE'ler üzerinde depozite edilen ERGO'nun optimum miktarını belirlemek için, CV metodu ile SPCE'lerin üzerinde GO'dan ERGO hazırlanmasında döngü sayısının optimizasyonu yapılmıştır. Farklı döngü sayılarında hazırlanan SPCE/ERGO'ların dönüşümlü voltamogramları 5, 10, 15 ve 20 döngü için sırasıyla Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te verilmiştir.



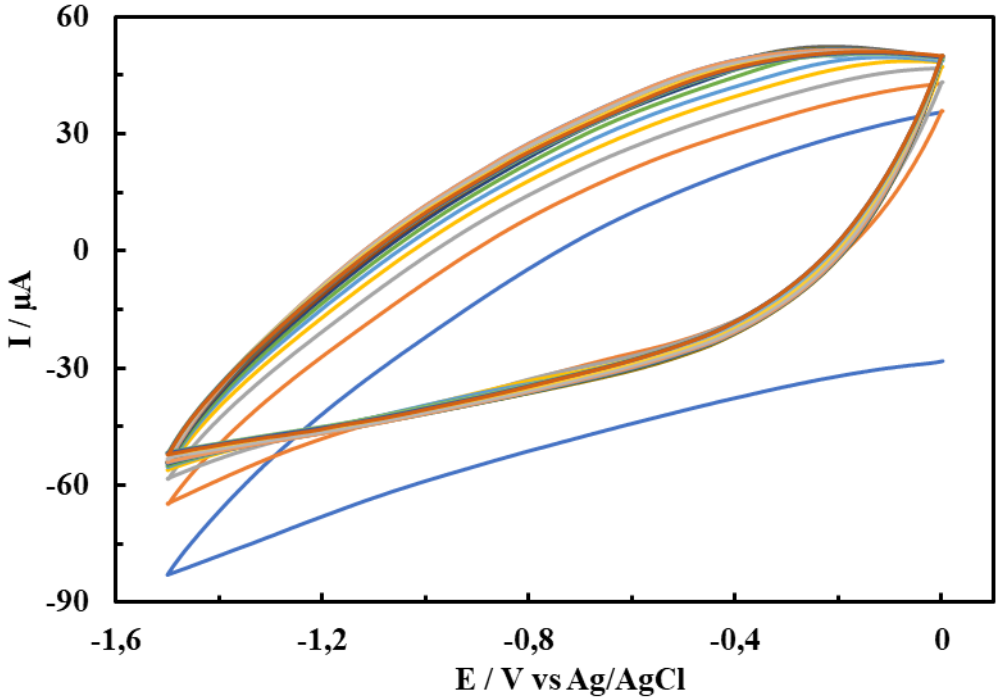
Şekil 4.1 SPCE üzerinde 5 döngü ERGO'nun hazırlanmasıyla elde edilen dönüşümlü voltamogramlar



Şekil 4.2 SPCE üzerinde 10 döngü ERGO'nun hazırlanmasıyla elde edilen dönüşümlü voltamogramlar



Şekil 4.3 SPCE üzerindeki 15 döngü ERGO'nun hazırlanmasıyla elde edilen dönüşümlü voltamogramlar

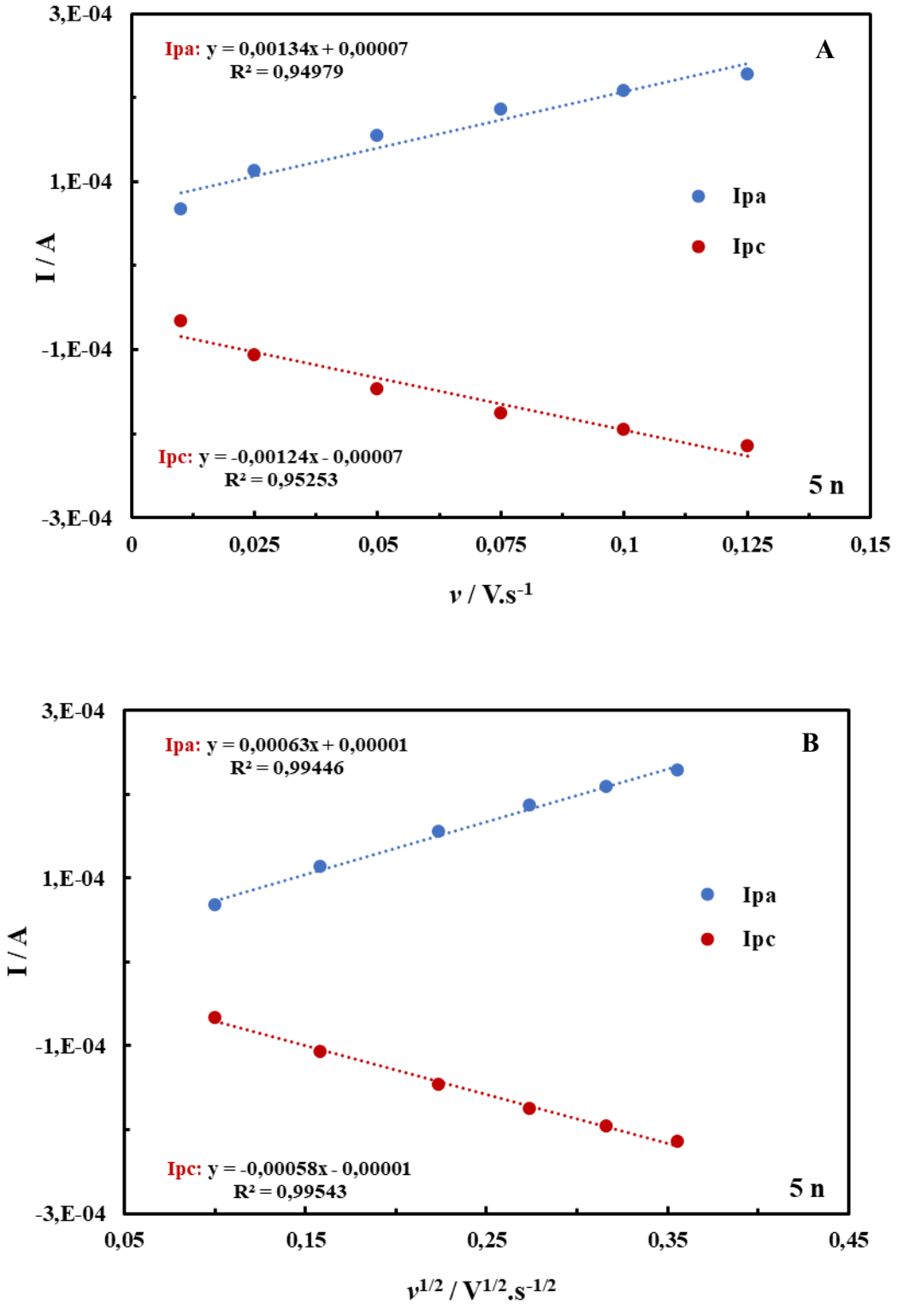


Şekil 4.4 SPCE üzerindeki 20 döngü ERGO'nun hazırlanmasıyla elde edilen dönüşümlü voltamogramlar

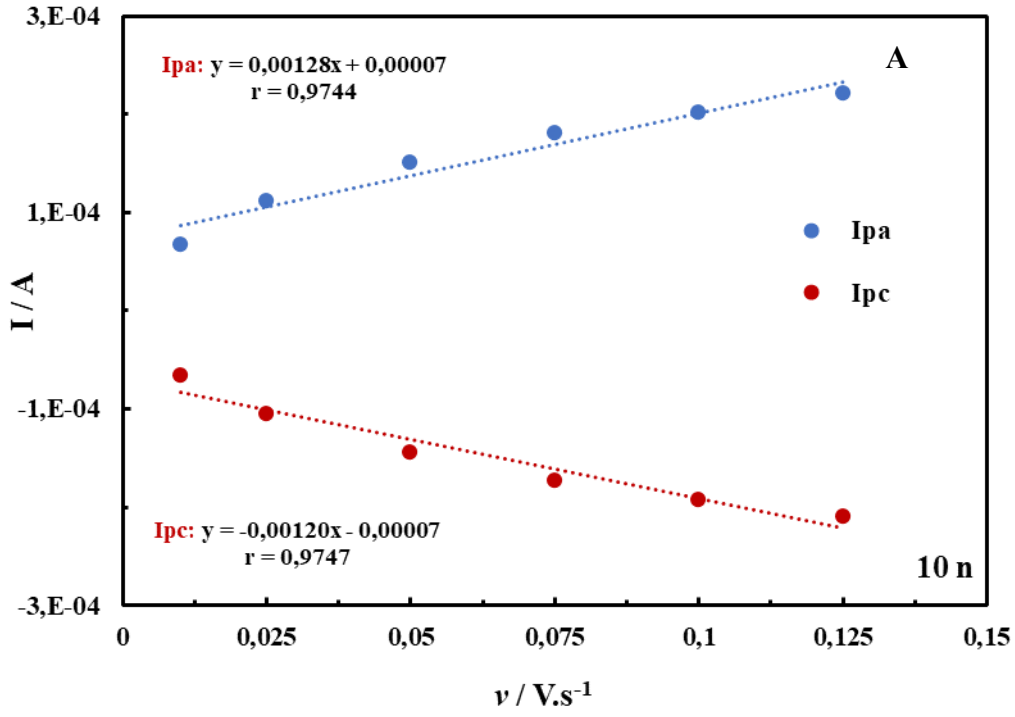
Optimum döngü sayısını belirlemek için 5, 10, 15 ve 20 döngü CV uygulanarak hazırlanan SPCE/ERGO elektrotlarının 5 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (1 M KCl içinde) çözeltisinde farklı tarama hızlarında (10 döngü 125 mVs^{-1}) dönüşümlü voltamogramları alınmış ve elde edilen voltamogramlardan elde edilen pik akım yüksekliklerinden yararlanılarak, her bir elektrot için pik akımları-tarama hızları ve pik akımları-tarama hızlarının karekökü grafikleri çizilmiştir. Çizilen grafikler 5, 10, 15 ve 20 döngü SPCE/ERGO elektrotları için sırasıyla Şekil 4.5.A-B, Şekil 4.6.A-B, Şekil 4.7.A-B ve Şekil 4.8.A-B'de verilmiştir. Grafikler incelendiğinde pik akımları-tarama hızları karekökü grafiklerinin korelasyon katsayılarının, pik akımları-tarama hızı grafiklerinin korelasyon katsayıları değerlerinden daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır. Bu sonuçlara göre, SPCE/ERGO elektrotları üzerinde gerçekleşen elektrokimyasal proses difüzyon kontrollü prosestir. Difüzyon kontrollü elektrokimyasal prosesler için Randles-Sevcik eşitliği kullanılabilir. SPCE/ERGO'ların elektroaktif yüzey alanlarını hesaplamak için Randles-Sevcik eşitliği kullanılmıştır. Randles-Sevcik eşitliğinde;

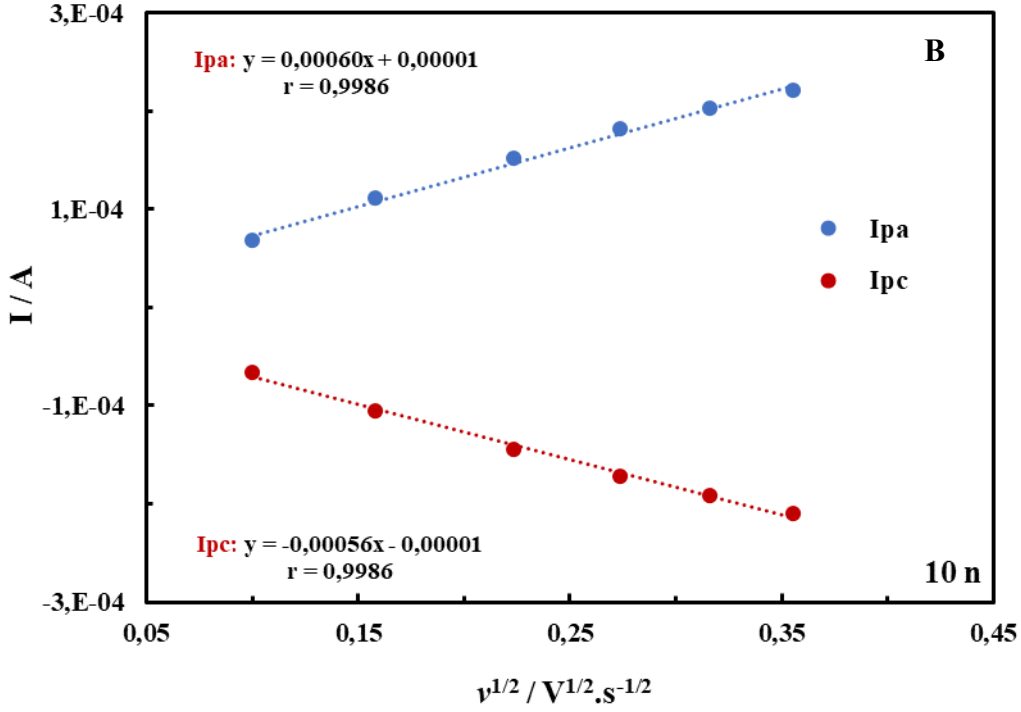
$$i_p = 2{,}96x10^5 n^{3/2} AD^{1/2} Cv^{1/2} \qquad (4.2)$$

i_p pik akımı (A), n alınan verilen elektron sayısı, A elektrot yüzey alanı (cm^2), D difüzyon katsayısı ($cm^2.s^{-1}$), C konsantrasyon ($mol.cm^{-3}$) ve v ise tarama hızıdır ($V.s^{-1}$). 5, 10, 15 ve 20 döngü olarak hazırlanan SPCE/ERGO elektrotlarının elektroaktif yüzey alanları sırasıyla 0,154 cm^2, 0,147 cm^2, 0,155 cm^2 ve 0,150 cm^2 olarak bulunmuştur. En yüksek elektroaktif yüzey alanı 15 döngü SPCE/ERGO ile hazırlanan elektrotlar ile elde edildiği için, optimum döngü sayısı 15 olarak belirlenmiştir.

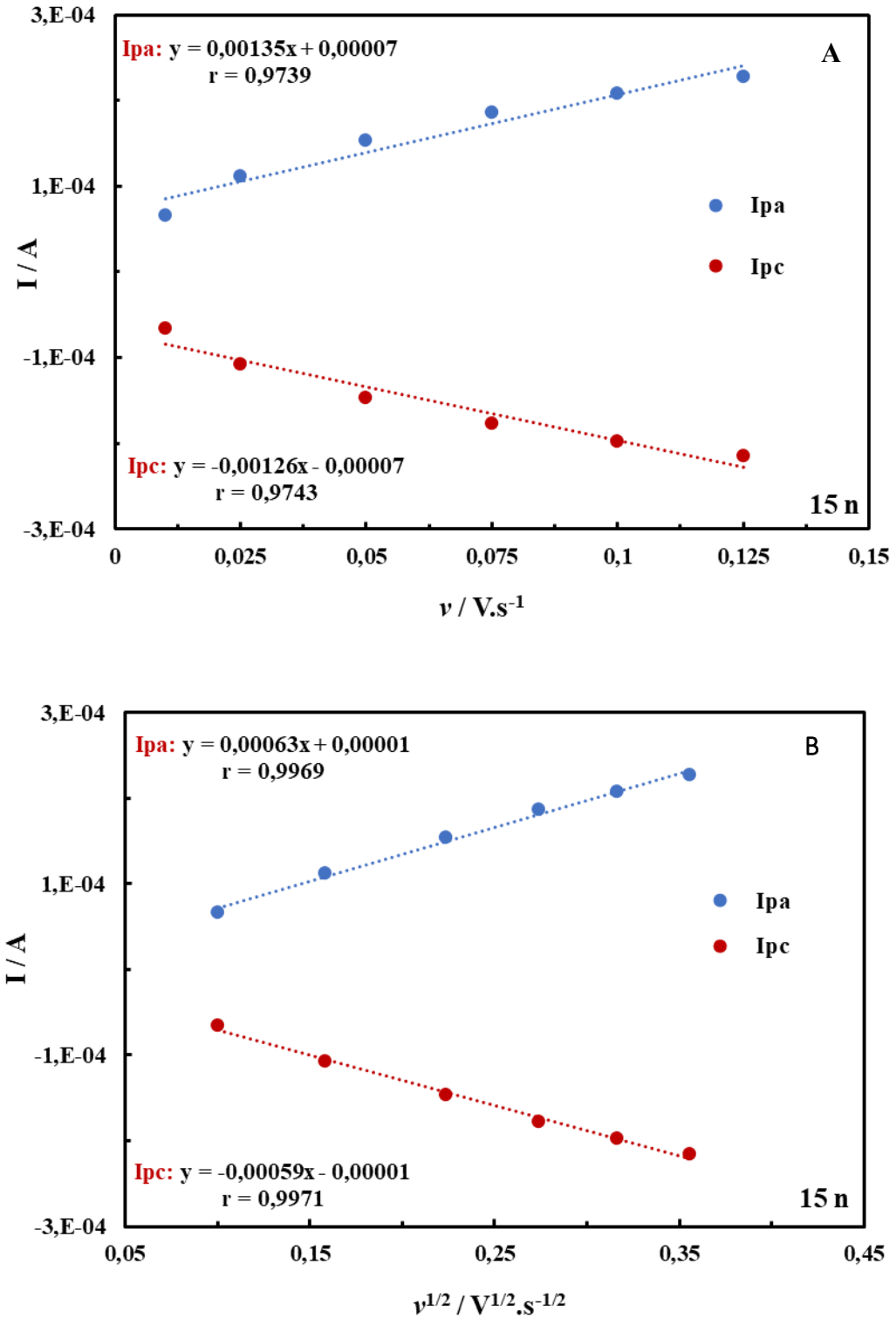


Şekil 4.5 SPCE/$(ERGO)_{5n}$ elektrotlarının 5 mM FF çözeltisinde farklı tarama hızlarında (10, 25, 50, 75, 100, 125 $mV.s^{-1}$) edilen dönüşümlü voltamogramlardan yararlanılarak çizilen A) pik akımı-tarama hızı ve B) tarama hızının karekökü grafikleri

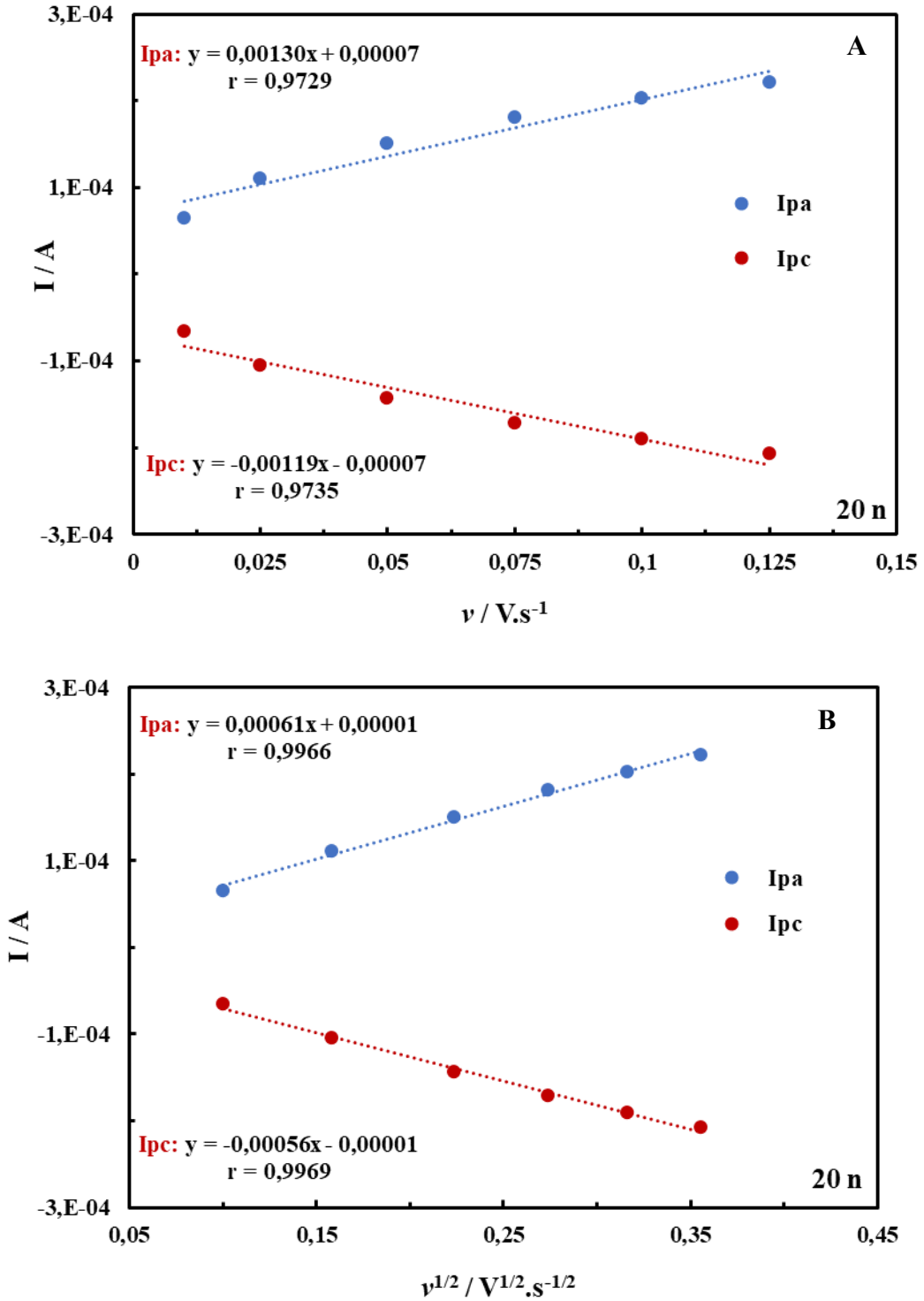




Şekil 4.6 SPCE/$(ERGO)_{10n}$ elektrotlarının 5 mM FF çözeltisinde farklı tarama hızlarında (10, 25, 50, 75, 100, 125 $mV.s^{-1}$) edilen dönüşümlü voltamogramlardan yararlanılarak çizilen A) pik akımı-tarama hızı ve B) tarama hızının karekökü grafikleri



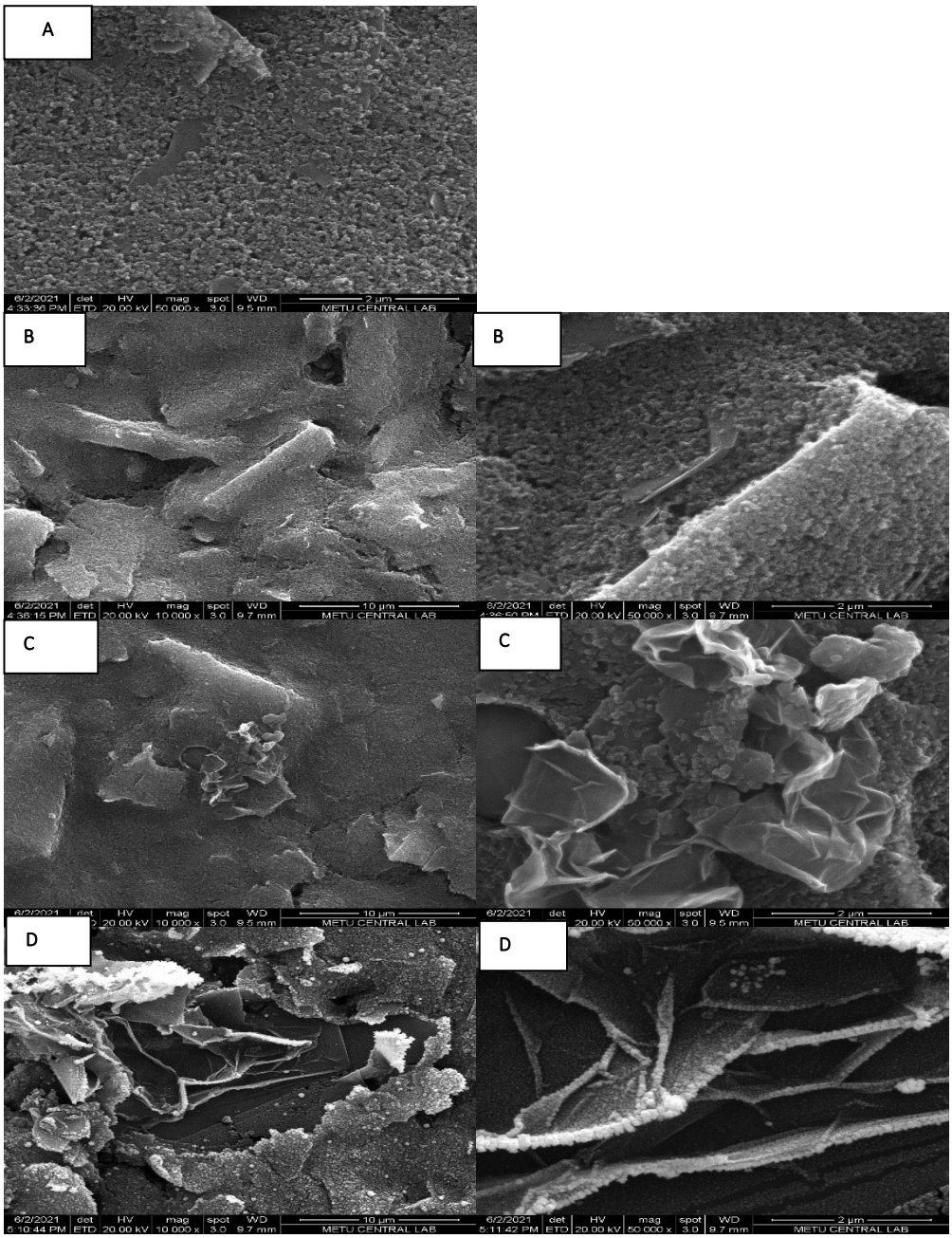
Şekil 4.7 SPCE/$(ERGO)_{15n}$ elektrotlarının 5 mM FFçözeltisinde farklı tarama hızlarında (10, 25, 50, 75, 100, 125 $mV.s^{-1}$) edilen dönüşümlü voltamogramlardan yararlanılarak çizilen A) pik akımı-tarama hızı ve B) tarama hızının karekökü grafikleri



Şekil 4.8 SPCE/$(ERGO)_{20n}$ elektrotlarının 5 mM FF çözeltisinde farklı tarama hızlarında (10, 25, 50, 75, 100, 125 $mV.s^{-1}$) dönüşümlü voltamogramlardan yararlanılarak çizilen A) pik akımı-tarama hızı ve B) tarama hızının karekökü grafikleri

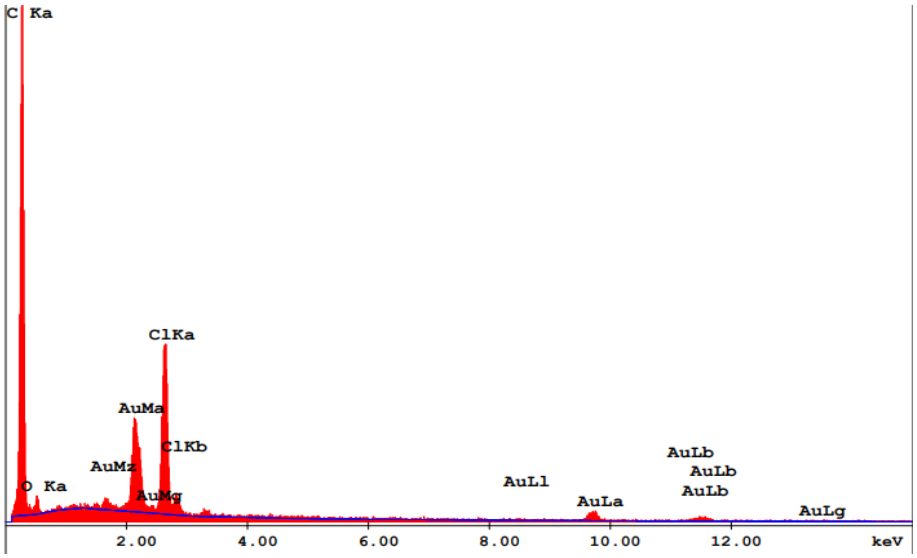
4.2 SPCE/ERGO/PNR/AuNP'nin Morfolojik Karakterizasyonu

SPCE'ler üzerine ERGO, PNR ve AuNP modifikasyonu ile hazırlanan SPCE, SPCE/ERGO, SPCE/ERGO/PNR, SPCE/ERGO/PNR/AuNP elektrotlarının SEM görüntüleri alınmış ve 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9 (A) Yalın SPCE, **(B)** SPCE/ERGO SPCE/ERGO/PNR **(C)** ve **(D)** SPCE/ERGO/PNR/AuNP elektrotlarının SEM görüntüleri

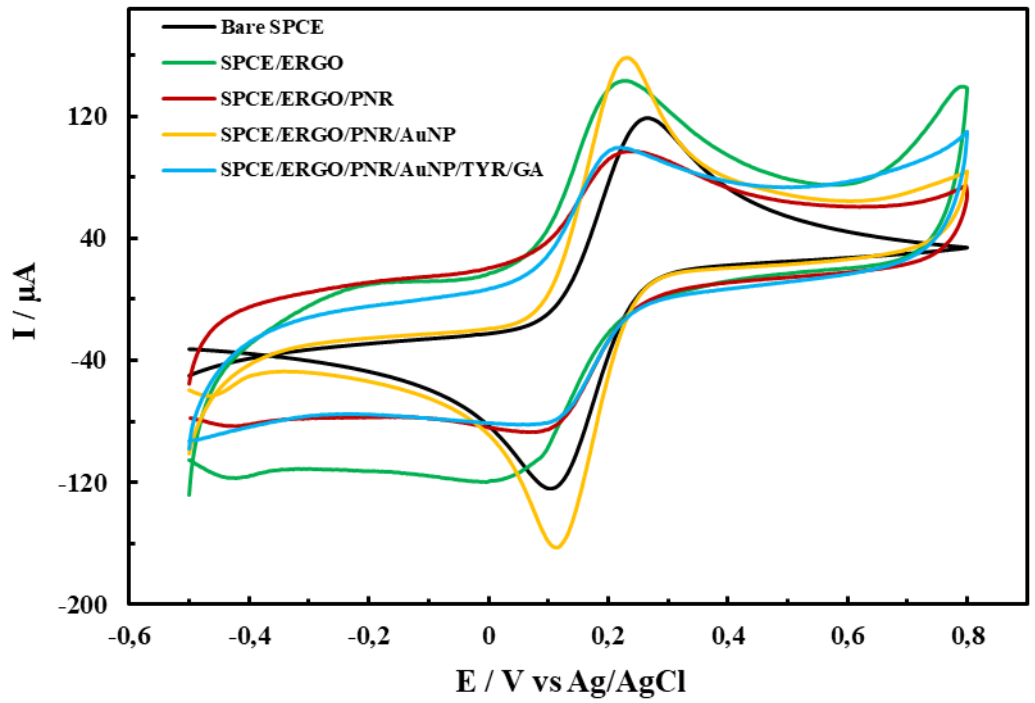
Bare SPCE' nin (A) SEM görüntüsü, nispeten pürüzsüz bir yüzey gösterirken SPCE/ERGO (B) SEM görüntüsünde rastgele dağılmış kıvrımlı katmanlar ve üst üste binmiş daha pürüzlü yüzey gözlenmiştir (Lu *et al*. 2014, Lee *et al*. 2018). SPCE/ERGO/PNR'nin (C) SEM görüntüsü birçok gözenek içeren ağ benzeri yapı sergilemektedir (Xu *et al*. 2010). Bu sonuçlar literatür ile uyumludur. SPCE/ERGO/PNR/AuNP'nin (D) SEM görüntüsü yüzeyde çok sayıda küresel nanoparçacıklar göstermektedir (Lv *et al*. 2016). Bu nanopartiküller AuNP'den oluşmaktadır. SPCE/ERGO/PNR/AuNP elektrotlarının EDX analizi sonuçlarında, AuNP'lerin varlığı doğrulanmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 SPCE/ERGO/PNR/AuNP elektrodunun SEM-EDX analizi sonuçları

4.3 SPCE/ERGO/PNR/AuNP'nin Elektrokimyasal Karakterizasyonu

SPCE/ERGO/PNR/AuNP elektrotlarının yüzeyinde bulunan materyallerin etkisini incelemek için SPCE, SPCE/ERGO, SPCE/ERGO/PNR, SPCE/ERGO/PNR/AuNP ve SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA elektrotlarının 5 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (1 M KCl içinde) çözeltisinde dönüşümlü voltamogramları alınmış (E_1: -0,5V, E_2: +0,8V, 50 $mV.s^{-1}$) ve elde edilen voltamogramlar Şekil 4.11'de verilmiştir. Voltamogramlardan elde edilen anodik pik potansiyelleri (Epa), katodik pik potansiyelleri (Epc), anodik pik akımları (Ipa) ve katodik pik akımları (Ipc) Çizelge 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.11 SPCE, SPCE/ERGO, SPCE/ERGO/PNR, SPCE/ERGO/PNR/AuNP ve SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA elektrotlarının 5 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (1 M KCl içinde) çözeltisinde elde edilen dönüşümlü voltamogramları

Çizelge 4.1 Şekil 4.11'de verilen dönüşümlü voltamogramlardan elde edilen Ep ve Ip değerleri

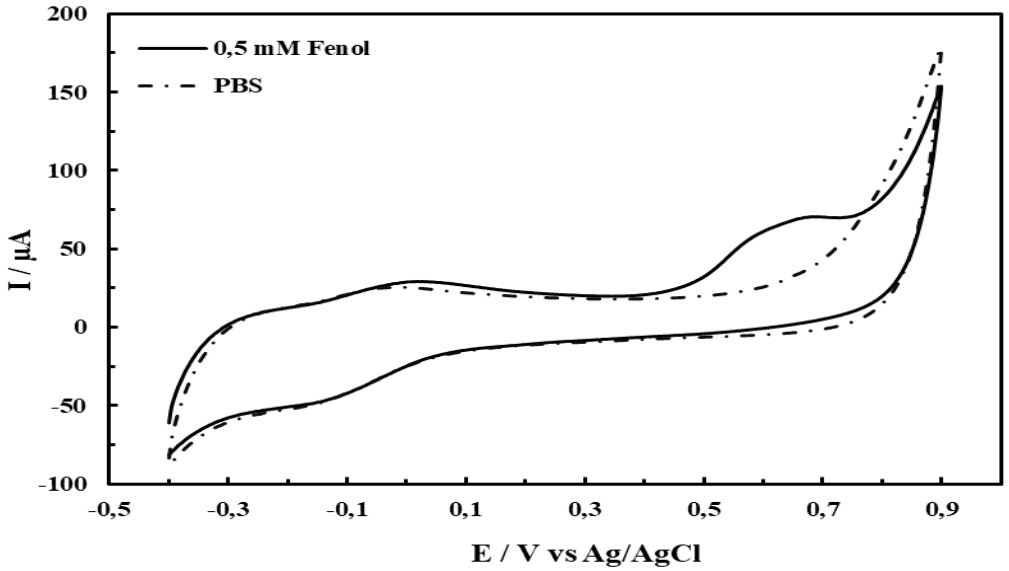
Elektrot formülasyonu	Ipa (µA)	Epa (V)	Ipc (µA)	Epc (V)
SPCE	104,54	0,224	-73,69	0,046
SPCE/ERGO	122,62	0,262	-126,34	0,102
SPCE/ERGO/PNR	62,98	0,232	-64,70	0,098
SPCE/ERGO/PNR/AuNP	148,85	0,232	-159,14	0,112
SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA	67,89	0,210	-57,33	0,104

Elektrot formülasyonunda ERGO'nun yer alması ile anodik ve katodik pik akımlarının arttığı ve pik potansiyelleri arasındaki farkın daraldığı görülmektedir. ERGO, elektronik iletkenliği ve elektrokimyasal reaksiyonun tersinirliğini artırmıştır. SPCE/ERGO elektrodu yüzeyinde PNR filminin oluşturulmasıyla pik akımlarında gözlenen azalış, polimerin elektrot yüzeyine kaplandığını, aynı zamanda polimerin film kalınlığına bağlı olarak difüzyonu azalttığını göstermektedir. PNR'nin elektrot formulasyonunda yer

almasıyla pik potansiyelleri negatif yöne kaymış ve PNR elektrokatalitik etki göstermiştir. SPCE/ERGO/PNR elektrodu üzerinde AuNP'lerin depozisyonu ile oluşan SPCE/ERGO/PNR/AuNP elektrodunda anodik pik akımı oldukça fazla artmıştır. ERGO, PNR ve AuNP'nin elektrot yüzeyinde birlikte yer alması sinerjik bir etki göstererek elektrodun elektroaktif yüzey alanını artırarak elektronik iletkenliği artırmış, aynı zamanda elektrokatalik etki de göstermiştir (Sahin and Ayranci 2015, Bilgi Kamaç *et al*. 2020a, b). Dönüştürücünün enzim ile immobilizasyonu sonrasında, elektrot yüzeyinin iletkenliği azalmıştır. Bu nedenle pik akım yüksekliği de azalmıştır. Bu sonuç, enzimin elektrot yüzeyine immobilize edildiğinin kanıtıdır.

4.4 SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA Fenol Biyosensörünün Elektrokimyasal Karakterizasyonu

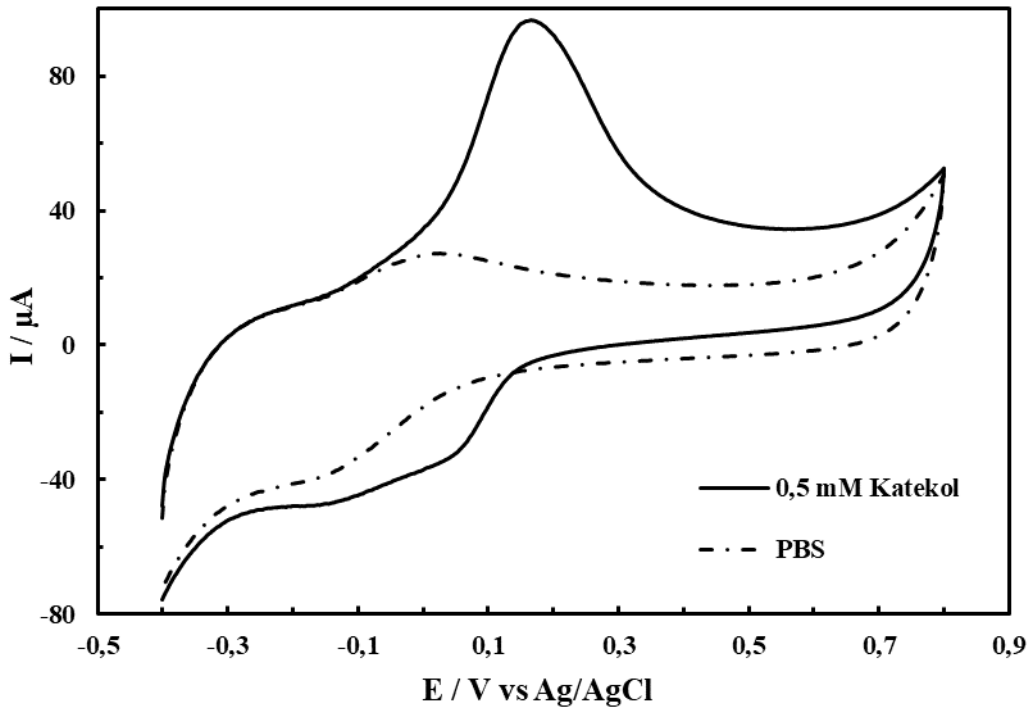
Fenolün SPCE/ERGO/PNR/AuNP elektrotları üzerindeki elektrokimyasal davranışını incelemek için, 50 mM pH 7,0 PBS (0,1 M KCl) içerisinde 0,5 mM fenol varlığında ve yokluğunda dönüşümlü voltametri uygulanmış ve elde edilen voltamogramlar Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.12 SPCE/ERGO/PNR/AuNP elektrodunun 0,5 mM fenol varlığında ve yokluğundaki dönüşümlü voltamogramları

Fenol varlığında SPCE/ERGO/PNR/AuNP elektrodu ile +0,004 V'da (pik akım yüksekliği 11,46 µA) ve +0,612 V'da (pik akım yüksekliği 14,42 µA) fenolün yükseltgenme pikleri gözlenmiştir. +0,004 V'da gözlenen pik, fenolün ilk oksidasyon ürünü olan katekolün yükseltgenme pikidir. Çalışmamız literatürle uyumludur (Qui and Zhang 2005). Fenol yokken +0,612 V potansiyelde herhangi bir pik gözlenmemiştir.

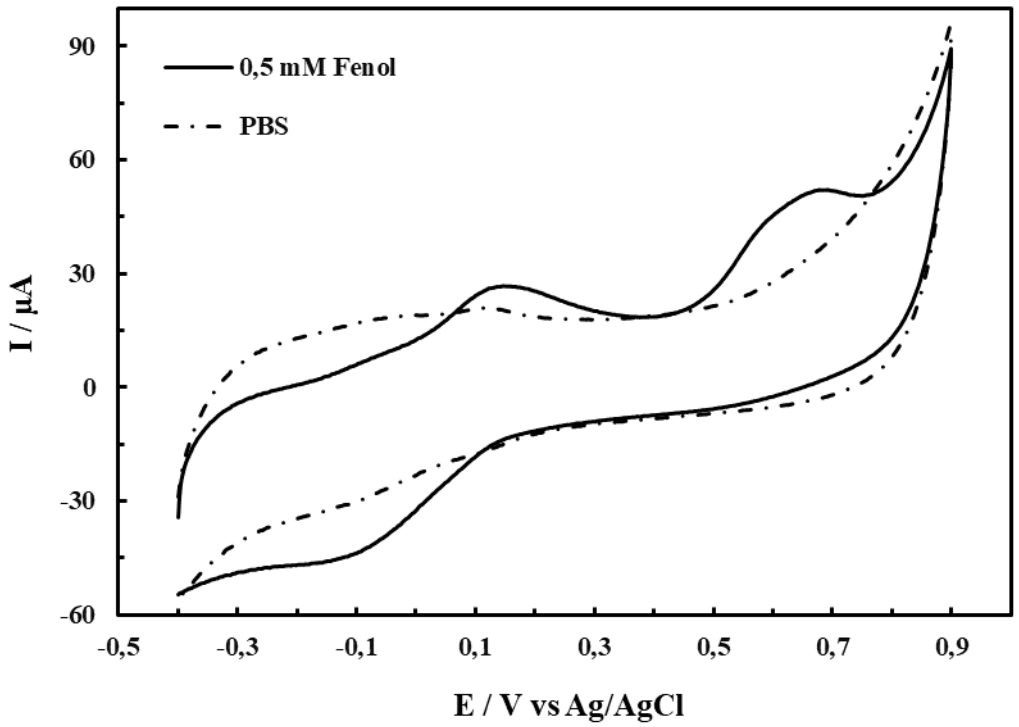
Katekolün SPCE/ERGO/PNR/AuNP elektrotları üzerindeki elektrokimyasal davranışını incelemek için, 50 mM pH 7,0 PBS (0,1 M KCl) içerisinde 0,5 mM katekol varlığında ve yokluğunda dönüşümlü voltametri uygulanmış ve elde edilen voltamogramlar Şekil.4.13'te verilmiştir.



Şekil 4.13 SPCE/ERGO/PNR/AuNP elektrodunun 0,5 mM katekol varlığında ve yokluğundaki dönüşümlü voltamogramları

Katekol varlığında SPCE/ERGO/PNR/AuNP elektrodu ile +0,166 V'da (pik akım yüksekliği 73,03 µA) ve +0,0032 V'da (pik akım yüksekliği -15,47 µA) sırasıyla katekolün yükseltgenme ve indirgenme pikleri gözlenmiştir. Çalışmamız literetür ile uyumludur (Cerrato-Alvarez *et al.* 2019). Katekol yokluğunda PNR'nin redoks pikleri dışında herhangi bir pik gözlenmemiştir.

Fenolün SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörü üzerindeki elektrokimyasal davranışını incelemek için, 50 mM pH 7,0 PBS (0,1 M KCl) içerisinde 0,5 mM fenol varlığında ve yokluğunda dönüşümlü voltametri uygulanmış ve elde edilen voltamogramlar Şekil 4.14'te verilmiştir

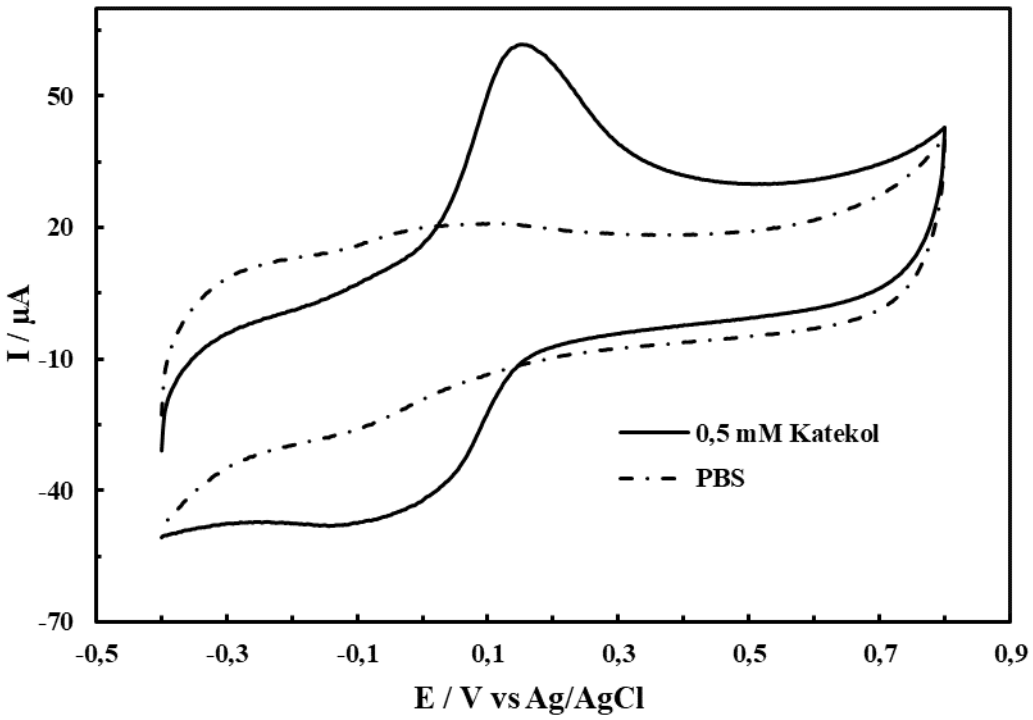


Şekil 4.14 SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörünün 0,5 mM fenol varlığında ve yokluğundaki dönüşümlü voltamogramları

Tirozinaz enzimi yokluğunda, dönüştürücü ile fenolün yükseltgenme pik potansiyeli 0,612 V'da gözlenmiştir. SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörü ile fenol varlığında, +0,626 V'da (pik akım yüksekliği 11,26 µA), +0,136 V'da (pik akım yüksekliği 2,50 µA) ve -0,092 V'da (pik akım yüksekliği -11,47 µA) üç farklı pik gözlenmiştir. +0,136 V'da gözlenen pik, fenolün tirosinaz enzimi ile katalizlenen yükseltgenme reaksiyonu sonucu oluşan ürün olan katekolün o-kinon bileşiğine yükseltgendiği oksidasyon pikidir. +0,626 V'da gözlenen pik, dönüştürücü ile fenolün yükseltgenme pikidir. -0,092 V'da gözlenen pik ise, fenolün tirosinaz enzimi ile katalizlenen yükseltgenme sonucu oluşan o-kinon bileşiğinin, katekole indirgendiği indirgenme pikidir. Sonuç olarak katekolün yükseltgenme piki +0,136 V'da, indirgenme

piki ise -0,092 V'da gözlenmiştir**.** Sonuçlar literatür ile uyumludur **(**Cerrato-Alvarez *et al.* 2019, Erkmen *et al*. 2020). Bu sonuçlar, hazırlamış olduğumuz fenol biyosensörünün analitine cevap verdiğini göstermektedir.

Katekolün SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörleri üzerindeki elektrokimyasal davranışını incelemek için, 50 mM pH 7,0 PBS (0,1 M KCl) içerisinde 0,5 mM katekol varlığında ve yokluğunda dönüşümlü voltametri uygulanmış ve elde edilen voltamogramlar Şekil 4.15'te verilmiştir



Şekil 4.15 SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörünün 0,5 mM katekol varlığında ve yokluğundaki dönüşümlü voltamogramları

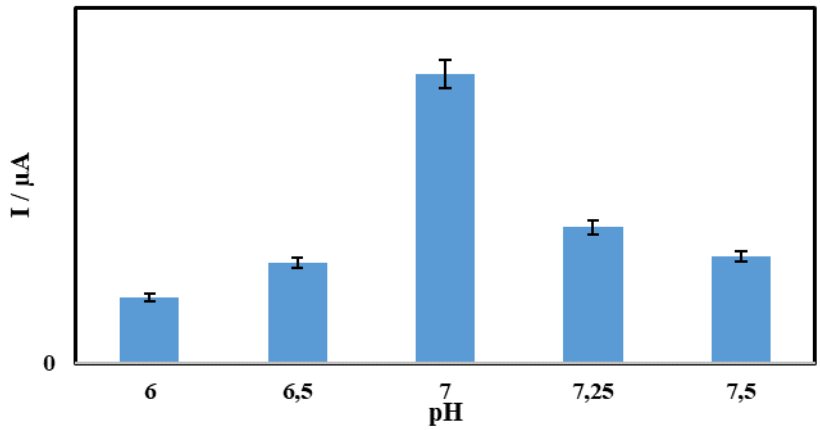
Tirozinaz enzimi kullanılarak fenolün oksidasyon ürünü olan katekol biyosensörü de yapılabilmektedir. Hazırlamış olduğumuz fenol biyosensörünün oksidsayon ürünü olan katekolün yükseltgenme ve indirgenme piklerini doğrulamak için 0,5 mM katekol çözeltisinde dönüşümlü voltametri uygulanmıştır. Elde edilen SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörü ile katekol varlığında +0,146 V'da (pik akım yüksekliği 47,273 µA) ve -0,012 V'da (pik akım yüksekliği -20,857 µA) katekolün yükseltgenme ve indirgenme pikleri gözlenmiştir. Sonuçlar literatür ile

uyumludur (Ghanem 2007). Bu sonuçlar, hazırlamış olduğumuz fenol biyosensörünün katekol ve fenole cevap verdiğinin kanıtıdır.

4.5 SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA Fenol Biyosensörünün Optimum Çalışma Parametrelerinin Belirlenmesi

4.5.1 pH optimizasyonu

Tampon çözeltide fenol tayini için kullanılan fenol biyosensöründen en yüksek verimi elde edebilmek için, pH optimizasyon çalışması yepılmıştır. Bu amaçla 50 mM derişiminde farklı pH'larda (6,0-7,5 aralığında) PBS çözeltileri hazırlanmıştır. Farklı pH'larda hazırlanan 1 mM fenol çözeltisinin SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosenörleri kullanılarak -0.6 V ile +0.6 V aralıgında dönüşümlü voltametri uygulanmıştır. Dönüşümlü voltamogramlardan elde edilen pik akım yüksekliklerine karşı pH değerlerinin grafiği çizilmiştir (Şekil 4.16).

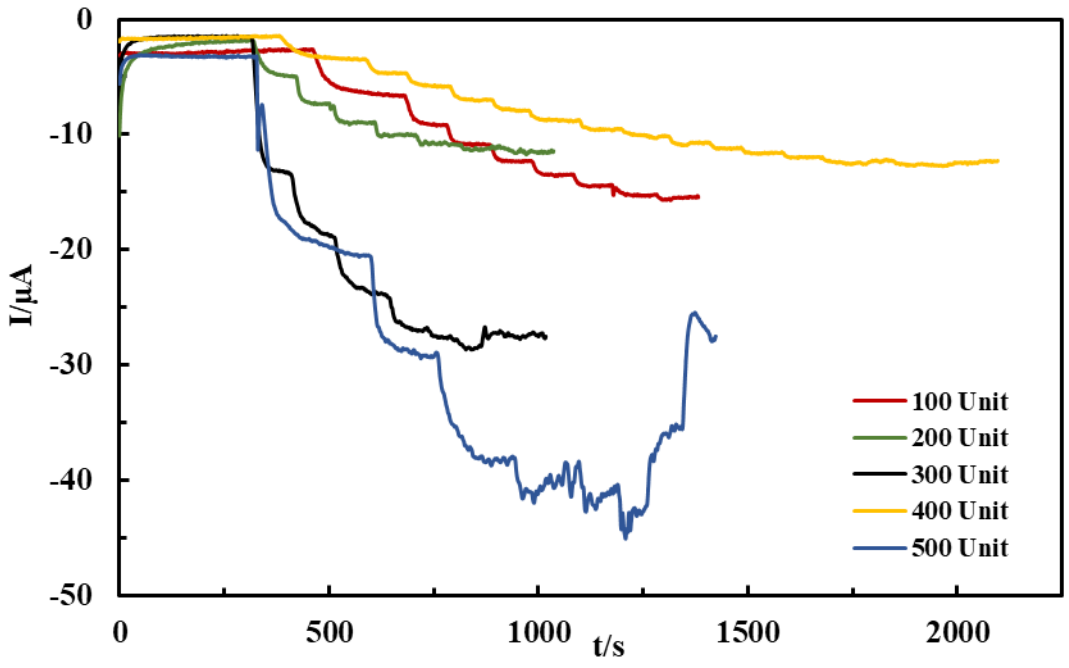


Şekil 4.16 Farklı pH'larda hazırlanan 1 mM fenol çözeltisinin, SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörleri kullanılarak elde edilen akım-pH grafiği

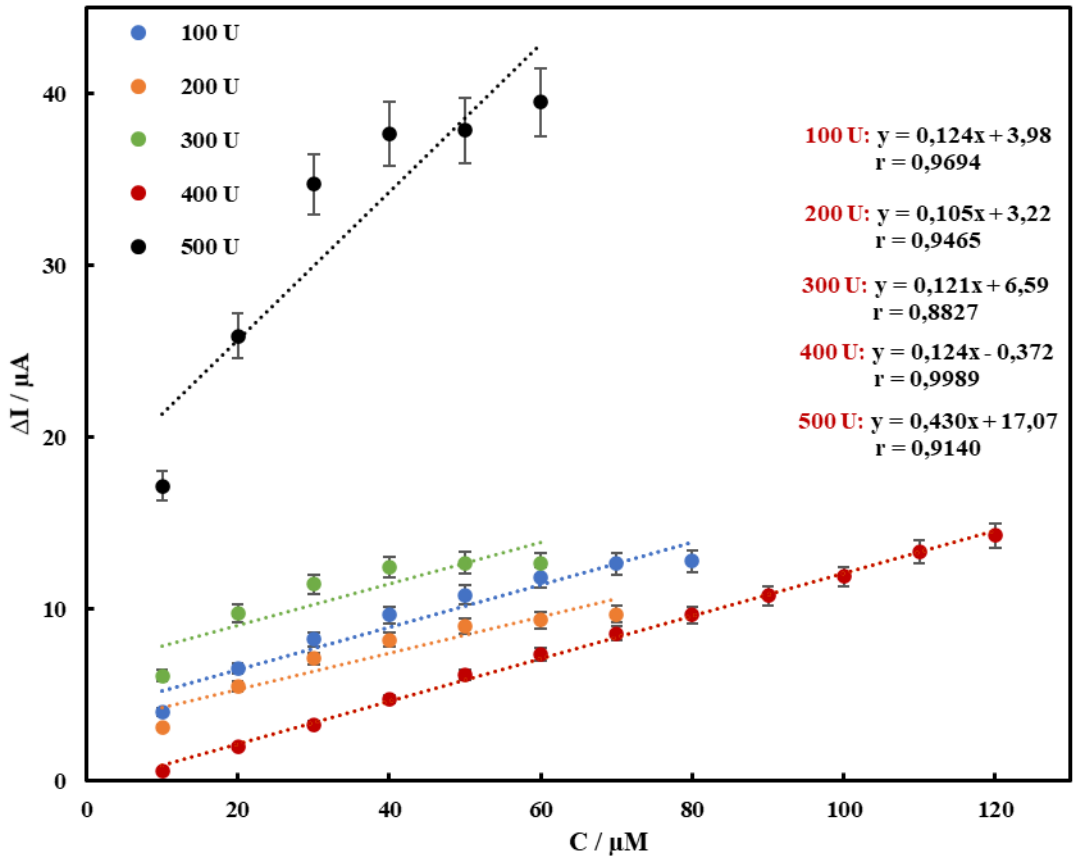
Ölçülen akım değerlerine karşılık pH değerleri grafiğinde en yüksek pik akımı pH 7'de elde edilmiştir. Fenol tayini için optimum pH 7,0 olarak belirlenmiştir. Çalışmanın bundan sonraki kısımlarında 50 mM pH 7,0 fosfat tampon çözeltileri kullanılmıştır.

4.5.2 Enzim miktar optimizasyonu

Optimum enzim miktarının belirlenebilmesi için farklı konsantrasyonlarda (100 U, 200 U, 300 U, 400 U ve 500 U) enzim çözeltileri kullanılarak fenol biyosensörleri hazırlanmıştır. Fenol biyosensörleri kullanılarak fenolün amperometrik tayini optimum pH'da hazırlanan tampon çözelti içerisinde, elektrokimyasal hücrede, karıştırma şartlarında, -0,150 V'da yapılmıştır. Kararlı akıma ulaşıldıktan sonra elektrokimyasal hücreye ardışık olarak 10 µM fenol çözeltisi eklenmiştir. Akım cevabı potentiyostat tarafından kaydedilmiştir. Şekil 4.17'de fenolün amperometrik tayini için elde edilen kronoamperogramları yer almaktadır. Şekil 4.18'de ise amperogramlardan elde edilen akım farklarına karşı fenol kansantrasyonu grafiği verilmiştir.



Şekil 4.17 Farklı konsantrasyonlardaki enzim miktarı (100 U, 200 U, 300 U, 400 U ve 500 U) ile hazırlanan fenol biyosensörlerinin 10 µM fenol ilavesiyle elde edilen kronoamperogramları



Şekil 4.18 Farklı konsantrasyonlardaki enzim miktarı (100 U, 200U, 300 U, 400 U ve 500 U) ile hazırlanan fenol biyosensörlerinin 10 µM fenol ilavesine karşı elde edilen akım farkı-konsantrasyon grafikleri

100 U enzim miktarı ile hazırlanan biyosensörler ile en fazla sekiz ve 200 U'de yedi ardışık fenol çözeltisi ilave edilebilirken, 300 ve 400 U enzim miktarı ile hazırlanan biyosensörler ile en fazla 6 ardışık fenol çözeltisi eklenebilmiştir. 6, 7 ve 8 ardışık fenol çözeltilerinin ilavesinden sonra amperogramlarda kararsız akımlar elde edilmiş, fenol-katekol dönüşümü gerçekleşmemiş, enzim substratına doymuştur. 400 U enzim miktarında ardışık 12 fenol çözeltisi ilave edilebilmiş, amperogramlarda bir kararsızlık gözlenmemiştir. Grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayıları incelendiğinde, en yüksek duyarlığın 500 U enzim miktarı ile hazırlanan biyosensörlerle yapılan analizler sonucu elde edilmiş olsa da en yüksek korelasyon katsayısı 400 U enzim miktarı ile hazırlanan fenol biyosensörleri ile yapılan analizlerde gözlenmiştir (Çizelge 4.2). Bir biyosensörün geliştirilmesinde duyarlık kadar korelasyon katsayısı ve doğrusal çalışma aralığı da önemli bir parametredir. Tüm bu bilgiler ışığında, tez kapsamında hazırlanan fenol biyosensörleri için optimum enzim miktarı 400 U olarak

belirlenmiştir. Çalışmanın bundan sonraki kısımlarında hazırlanan biyosensörlerde 400 U enzim miktarı kullanılmıştır.

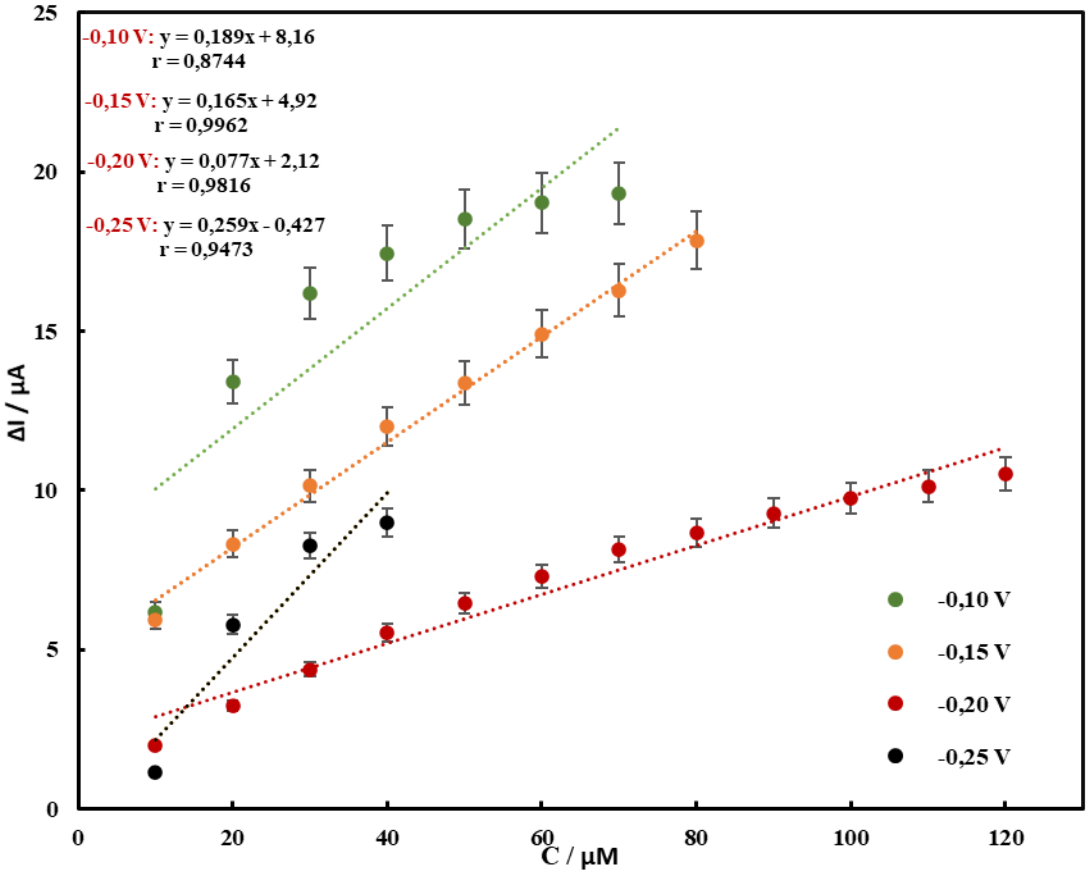
Çizelge 4.2 Şekil 4.18'de verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayıları değerleri

Enzim miktarı / U	**Duyarlık / (μA.mM^{-1})**	**Korelasyon katsayısı (r)**
100	124	0,9694
200	105	0,9465
300	121	0,8827
400	124	0,9989
500	430	0,9140

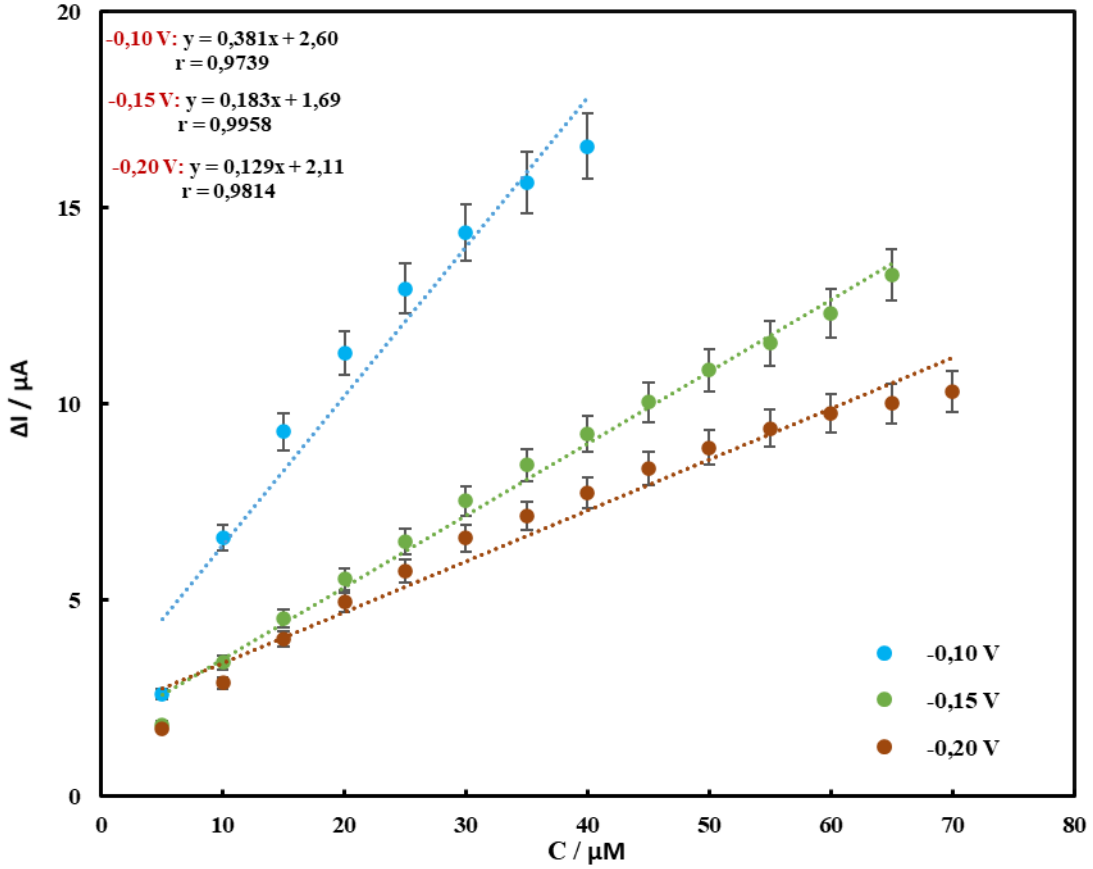
4.5.3 Çalışma potansiyelinin optimizasyonu

Fenol biyosensörünün optimum çalışma potansiyelinin belirlenmesi için beş farklı potansiyelde (-0,10, -0,15, -0,20, -0,25 ve -0,30 V) biyosensörler ile fenolün amperometrik tayini yapılmıştır. Şekil 4.19'da 10 μM fenolün ardışık ilavesi ile, Şekil 4.20'de 5 μM fenolün ardışık ilavesi yapılan amperometrik tayin sonucunda elde edilen amperogramlar kullanılarak akım farkı-konsantrasyon grafikleri çizilmiştir. Grafiklerden yararlanılarak duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri hesaplanmış ve Çizelge 4.3'te listelenmiştir. Şekil 4.20 incelendiğinde en iyi korelasyonun -0,15 ve -0,20 V'da yapılan amperometrik tayinler sonucunda gözlendiği, hatta -0,15 V'da verilen grafiğin korelasyonun en iyi olduğu görülmektedir. -0,10 V'da yapılan amperometrik tayin sonucu çizilen akım-konsantrasyon grafiğinin duyarlık değeri, -0,15 ve -0,20 V'da hesaplanan duyarlık değerlerinden daha yüksek, -0,25 V'da elde edilen duyarlık değerinden düşüktür. En yüksek duyarlık değeri -0,25 V'da yapılan analizler sonucu elde edilmiş olsa da, elektrokimyasal çözeltiye -0,25 V'da en fazla dört ardışık fenol çözeltisi ilave edilebilmiş, daha sonrasında amperogramlarda akım kararsızlaşmıştır. -0,10 V'da elektrokimyasal hücreye en fazla yedi ardışık fenol çözeltisi ilave edilebilirken, -0,15 V'da sekiz ve -0,20 V'da on iki ardışık fenol çözeltisi eklenebilmektedir. -0,30 V'da yapılan amperometrik tayinlerde ise elektrokimyasal hücreye en fazla iki ardışık fenol çözeltisi eklenebilmiş, akım kararsızlaşmıştır.

Amperogramlardaki akım kararlılığı, duyarlık değerleri ve korelasyon katsayıları göz önüne alındığında -0,15 V'da fenolün amperometrik tayini ön plana çıkmaktadır. Enzimin substratına doygunluğu göz önüne alınarak, -0,10 V, -0,15 V ve -0,20 V'da elektrokimyasal hücreye 5 µM fenol çözeltisinin ardışık ilavesi ile amperometrik tayinler yapılmıştır. Şekil 4.20'de verilen grafikler incelendiğinde, en yüksek korelasyonun Şekil 4.19'daki grafiklerde olduğu gibi -0,15 V'da yapılan amperometrik tayinler sonucu olduğu göze çarpmaktadır. -0,10 V'da en yüksek duyarlık elde edilmiş olsa da, elektrokimyasal hücreye en fazla sekiz fenol çözeltisi eklenebilmiş, sonrasında akım kararsızlaşmıştır. Amperogramlardaki akım kararlılığı, duyarlık değerleri ve korelasyon katsayıları, Şekil 4.19 ve 4.20'de verilen grafikler göz önüne alındığında, fenol biyosensörünün optimum çalışma potansiyeli -0,15 V olarak belirlenmiştir. Çalışmanın bundan sonraki kısımlarında hazırlanan biyosensörler ile -0,15 V'da amperometrik tayin yapılmıştır.



Şekil 4.19 SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörlerinin farklı çalışma potansiyellerinde (-0,10 V, -0,15 V, -0,20 V ve -0,25 V) 10 µM fenol ilavesine karşı elde edilen akım farkı-konsantrasyon grafikleri



Şekil 4.20 SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörlerinin farklı çalışma potansiyellerinde (-0,10 V, -0,15 V ve -0,20 V) 5 µM fenol ilavesine karşı elde edilen akım farkı grafikleri

Çizelge 4.3 Şekil 4.20'de verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayıları değerleri

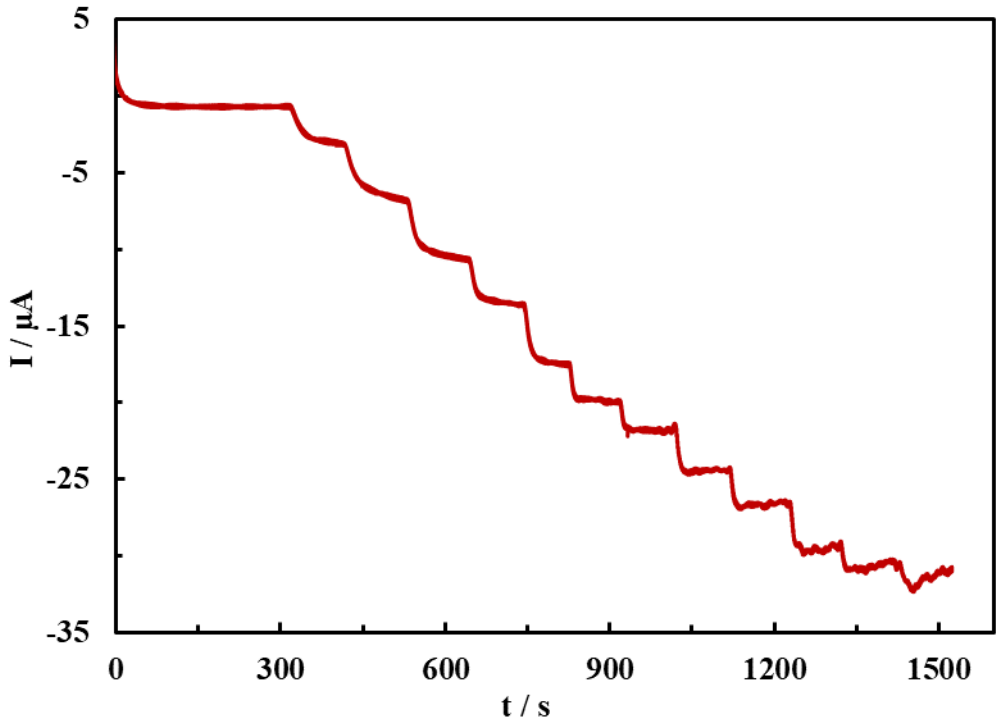
Çalışma potansiyeli / V	Duyarlık / (µA.mM^{-1})	Korelasyon katsayısı (r)
-0,10	381	0,9739
-0,15	183	0,9958
-0,20	129	0,9814

4.6 Amperometrik Fenol Biyosensörünün Analitiksel Karakterizasyonları

4.6.1 Doğrusal çalışma aralığı, tespit limiti ve tekrarlanabilirliğin belirlenmesi

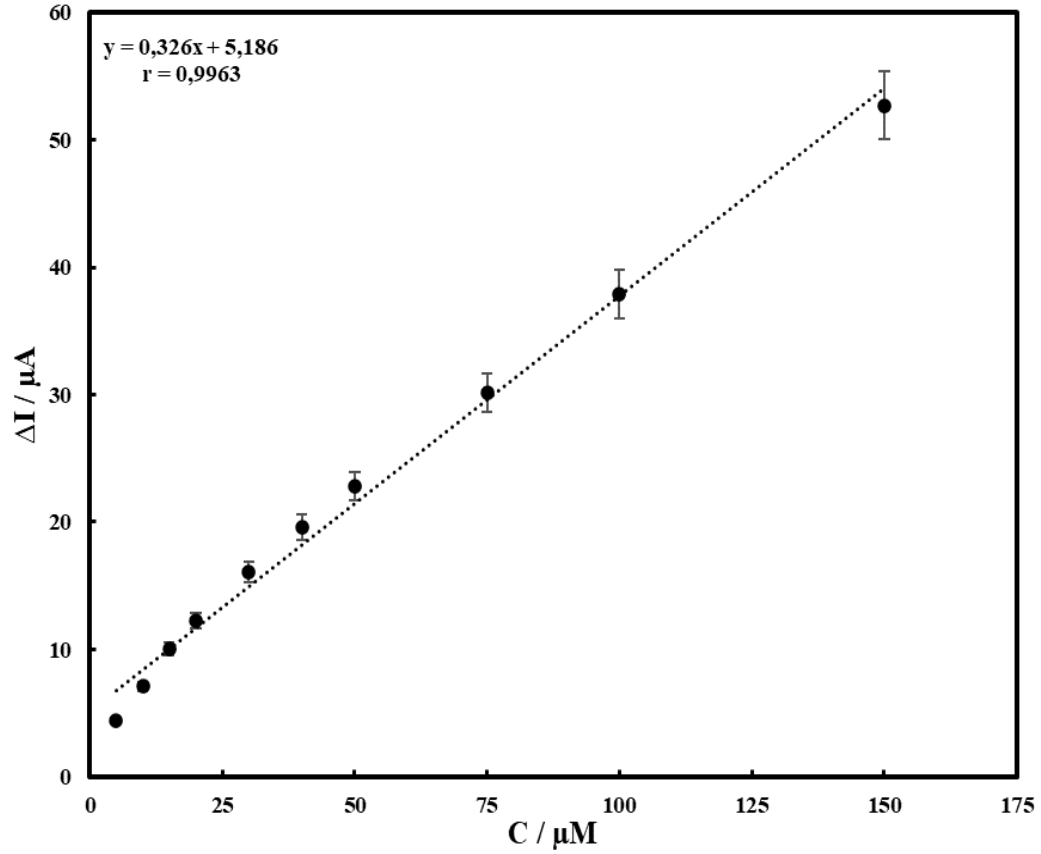
SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörleri kullanılarak fenolün amperometrik tayini, elektrokimyasal hücrede optimum pH'da ve -0,15 V'da karıştırma şartlarında yapılmıştır. Kararlı akıma ulaşıldıktan sonra elektrokimyasal hücreye ardışık olarak 10

µM fenol çözeltisi eklenmiştir. Akım cevabı potentiyostat tarafından kaydedilmiştir. Şekil 4.21'de fenolün amperometrik tayini için elde edilen örnek bir amperogram verilmiştir. Fenol ilavesiyle zamanla akımda bir artış olduğu amperogramdan anlaşılmaktadır.



Şekil 4.21 SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörleri ile 10 µM fenolün ardışık katımı ile elde edilen örnek bir amperogram

Fenolün kantitatif tayini, fenol konsantrasyonunun artışı ile artan akım değerleri kullanılarak yapılmıştır. Amperogramlardan elde edilen akım farkı değerleri kullanılarak fenol konsantrasyonuna karşı grafik çizilmiş ve Şekil 4.22'de verilmiştir. Fenol konsantrasyonundaki artış ile akım farkı değerlerin doğru orantılı olarak arttığı, grafikten görülmektedir.



Şekil 4.22 SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörleri ile 10 µM fenol konsantrasyonuna karşı elde edilen akım farkı grafiği

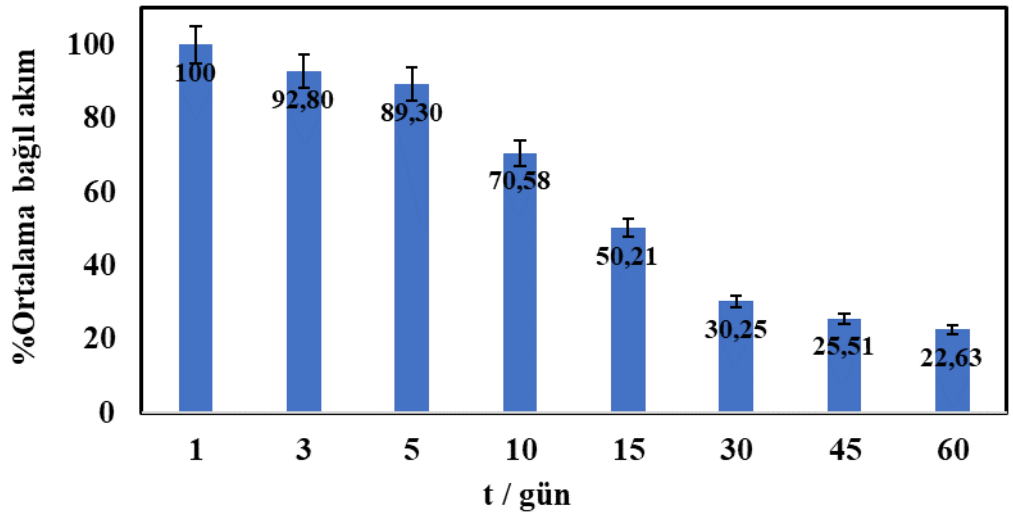
Fenolün amperometrik tayini için kullanılan SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörünün analitiksel karakterizasyonları yapılmıştır. Geliştirilen amperometrik fenol biyosensörünün analitiksel parametreleri olan tayin sınırı tespit limiti, duyarlık, doğrusal aralık ve tekrarlanabilirlik değerleri Çizelge 4.4'te yer almaktadır.

Çizelge 4.4 Geliştirlen amperometrik fenol biyosensörünün analitiksel parametreleri

Tespit limiti	2,36 µM
Tayin sınırı	7,86 µM
Doğrusal çalışma aralığı	5 µM ile 150 µM
Duyarlık	326 $\mu A.mM^{-1}$
Tekrarlanabilirlik	RSD %4,36 (n=5), 10 µM Fenol

4.6.2 Uygulama ve depolama kararlılığı

SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörünün uygulama kararlılığı, 10 µM fenol çözeltisi ile-0,150 V potansiyelde 60 gün boyunca belirli aralıklarla akımların ölçülmesi ile test edilmiştir. 60 gün boyunca fenol için biyosensör cevabının ilk günkü akıma göre yüzde bağıl akım değerleri Şekil 4.23'de verilmiştir.

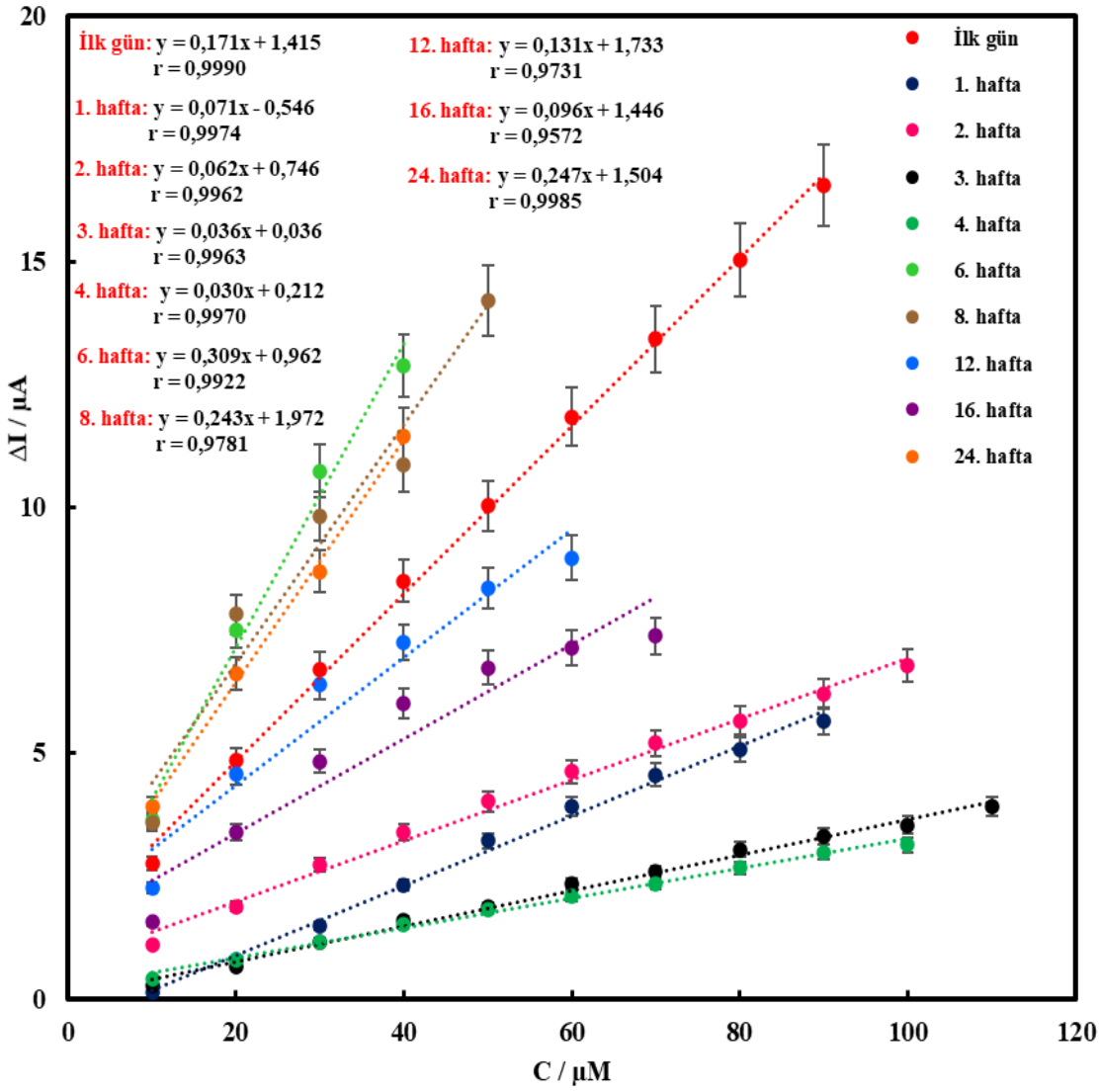


Şekil 4.23 SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörleri ile 10 µM fenol derişimine karşı elde edilen yüzde bağıl akım değerleri-gün sayısı grafiği

Başlangıçta fenol için biyosensörün amperometrik cevabı üçüncü günün sonunda %8,2, onuncu günün sonunda %29,42, otuzuncu günün sonunda %69,75 ve 60. günün sonunda ise %77,37 oranında azalmıştır. SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörünün uygulama kararlılığı ilk güne göre zamanla azalmıştır. Ancak altmışıncı gün de dahi fenol için amperometrik yanıt verdiği grafikten anlaşılmaktadır. Bu sonuçlara göre, fenol biyosensörünün uygulama kararlılığı tek kullanımlık olarak hazırlanmasına rağmen oldukça iyi olduğu görülmektedir. Bunun nedeninin elektrot yüzeyinde yer alan ERGO, PNR ve AuNP'nin biyosensörün uygulama kararlılığını artırması olduğu düşülmektedir.

Çalışma şartlarında geliştirilen biyosensörün depolama kararlığını belirlemek için, hazırlanan biyosensörler +4°C'de sabit nem ortamında bekletilmiştir. Daha sonra bu biyosensörler ile sırasıyla 24 hafta boyunca -0,150 V'da amperometrik fenol tayini

gerçekleştirilmiştir. Amperogramlardan yararlanılarak çizilen akım farkı-konsantrasyon grafikleri Şekil 4.24'te yer almaktadır.



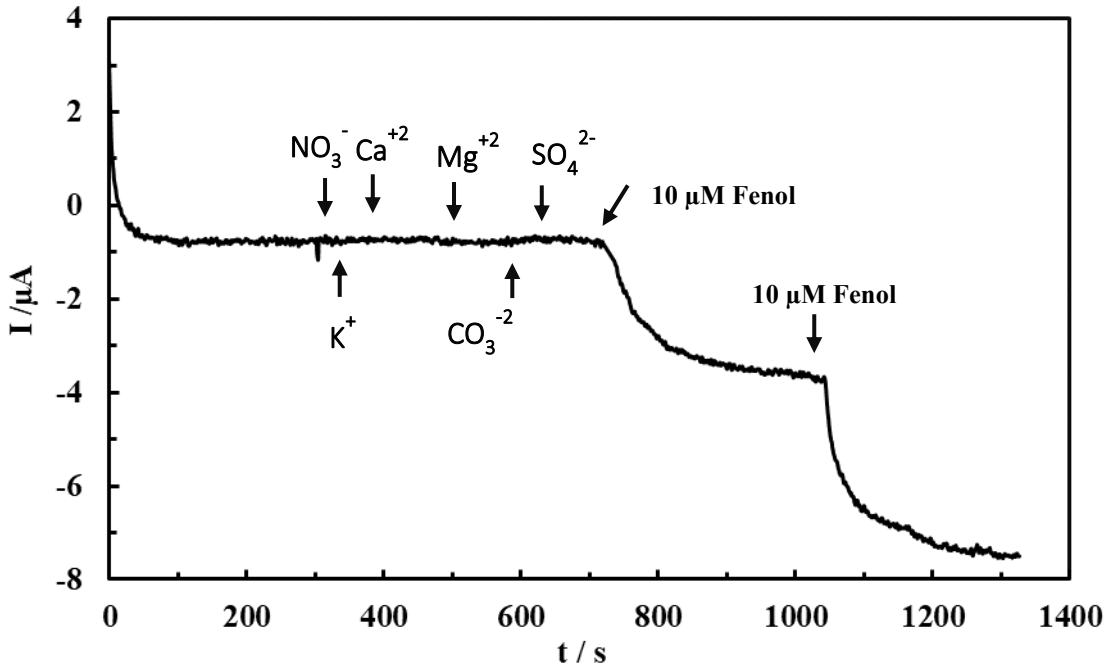
Şekil 4.24 SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörlerinin farklı depolama sürelerinde 10 μM fenol konsantrasyonuna karşı elde edilen akım farkı grafikleri

Hazırlanan fenol biyosensörleri 24 hafta boyunca +4ºC'de depolanmıştır. Grafikler incelediğinde genel olarak korelasyon katsayılarının 0,9'un üzerinde olduğu görülmektedir. Biyosensörlerin ilk günkü kullanımından sonra duyarlık değerlerinin 4. haftaya kadar azaldığı, 6. haftadan sonra ise ilk güne göre yaklaşık iki kat arttığı ve 24. haftaya kadar genel olarak azaldığı Şekil 4.24'te verilen grafikten anlaşılmaktadır. Hazırlanan fenol biyosensörlerinin ilk dört haftalık depolama sürecinden sonra

amperometrik tayinlerde kullanımlarında elektrokimyasal hücreye 8-11 ardışık fenol çözeltisi ilave edilebilmiştir. Ancak biyosensörlerin 6. haftadan 24. haftaya kadar depolama sürelerinden sonra amperometrik tayinlerde kullanımlarında elektrokimyasal hücreye en fazla 4-5 ardışık fenol çözeltisi ilave edilebilmiş, amperogramlarda akım kararsızlığı gözlenmiş ve daha fazla fenol çözeltisi eklenememiştir. Her ne kadar 6. hafta depolama sürelerinden itibaren ilginç bir şekilde duyarlık değerleri ilk güne göre artmış olsa da, depolama süresince glutaraldehit çapraz bağlayıcı ile immobilize edilen tirozinaz enziminin kararlılığının azaldığı ve bu nedenle de amperogramlardaki akım kararlılığının azaldığı düşünülmektedir. Şekil 4.24'teki grafiğe göre, fenol biyosensörleri ile 24 haftalık depolama süresinde dahi fenole karşı yanıt alınabilmektedir.

4.6.3 Girişim testi

SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörleri ile fenolün amperometrik tayini, girişim yapan türlerin etkisini incelemek için, fenole girişim yapabilecek iyonların varlığında yapılmıştır. 1 mM konsantrasyonda (fenol konsantrasyonunun 100 katı) NO_3^-, K^+, Ca^{+2}, Mg^{+2}, CO_3^{-2}, SO_4^{-2} iyonları kullanılmıştır. Analitlerin girişim yapıp yapmadıklarını incelemek için, sabit konsantrasyondaki analitler tek başlarına çözeltiye eklenmiştir. Yapılan ölçüm sonucunda elde edilen amperogram Şekil 4.25'te verilmiştir. -0,15 V potansiyelde hiçbir iyon girişim yapmamıştır.



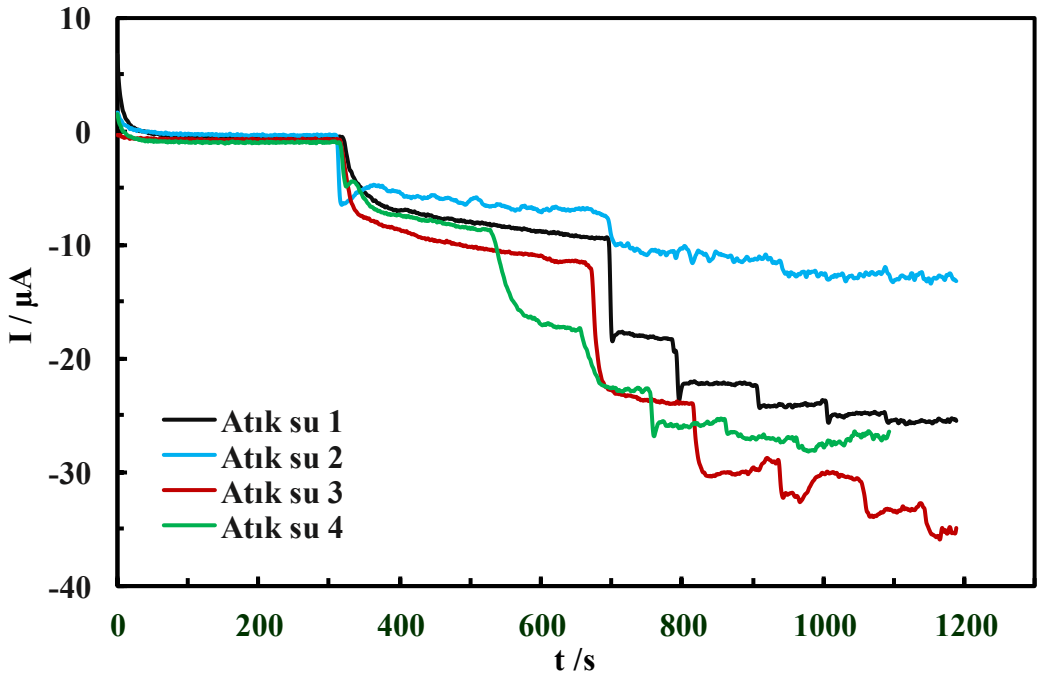
Şekil 4.25 SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörüne 1 mM NO_3^-, K^+, Ca^{+2}, Mg^{+2}, CO_3^{-2}, SO_4^{-2} ve 10 µM fenol eklenmesiyle elde edilen kronoamperogramı

4.6.4 Gerçek numune (atık su) analizi

Bilinen miktarda (10 µM) fenol içeren atık su numunelerinin elektrokimyasal tayini, -0,15 V'da SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörleri ile amperometrik olarak yapılmıştır. SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörleriyle yapılan atık su numunelerinde fenol analizinin amperogramları Şekil 4.26'da verilmiştir.

Gerçek numune analizi için Çankırı ilinin 4 farklı bölgesinden (Tuzlu Bağları TOKİ 1. Çıkış, Mezbahane Çıkış, Kollektör Çıkış ve Küçük Sanayi Çıkış) toplanan atık sularda fenol tayini yapılmıştır. Atık sularında fenolün olup olmadığının belirlenmesi için Febas Çevre Laboratuvarına (Türkak Akrediteli) fenol tayinleri spektrofotometrik yöntemle yaptırılmıştır. Tuzlu Bağları TOKİ 1. çıkıştan alınan numunede (atık su 1) fenol miktarı 0,8 µM, Mezbahane Çıkıştan (atık su 2) alınan numunede fenol miktarı 0,01 µM'dan küçük (fenol tespit edilememiştir), Kollektör çıkıştan (atık su 3) alınan numunede fenol miktarı 0,01 µM'dan küçük (fenol tespit edilememiştir) ve Küçük Sanayi çıkış (atık su 4) alınan numunede fenol miktarı 0,02 µM olduğu rapor edilmiştir. Çevre laboratuvarı tarafından rapor edilen fenol konsantrasyonları çalışmamızda geliştirdiğimiz

amperometrik fenol biyosensörünün doğrusal çalışma aralığının altındadır. Hazırlamış olduğumuz amperometrik fenol biyosensörü ile atık sularda fenol tayini standart katma metodu ile gerçekleştirilmiş olup %95'in üzerinde geri kazanımlar elde edilmiştir. Bu tez kapsamında tek kullanımlık, pratik, düşük maliyetli amperometrik fenol biyosensörü yüksek duyarlık ve yüksek seçicilikte hazırlanmıştır. Fenol biyosensörünün atık sular gibi gerçek numulerde fenol tayininde başarılı bir şekilde uygulaması gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.26 SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörleri ile dört farklı atık su numunelerine 10 µM fenol eklenmesiyle elde edilen amperogramları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmadan elde edilen sonuçlar şöyledir:

- SPCE'lerin üzerinde GO'dan ERGO'nun hazırlanmasında döngü sayısının optimizasyonu yapılmıştır. Optimum döngü sayısını belirlemek için 5, 10, 15 ve 20 döngü CV uygulanarak hazırlanan SPCE/ERGO elektrotlarının 5 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (1 M KCl içinde) çözeltisinde farklı tarama hızlarında (10-125 mVs^{-1}) dönüşümlü voltamogramları alınmıştır. Her bir döngü sayısı için elektroaktif yüzey alanları hesaplanmıştır. En yüksek elektroaktif yüzey alanı 15 döngü SPCE/ERGO ile hazırlanan elektrotlar ile elde edildiği için, optimum döngü sayısı 15 olarak belirlenmiştir.

- SPCE'ler üzerine ERGO, PNR ve AuNP modifikasyonu ile hazırlanan SPCE, SPCE/ERGO, SPCE/ERGO/PNR, SPCE/ERGO/PNR/AuNP elektrotlarının SEM görüntüleri alınmıştır. Bare SPCE' nin SEM görüntüsü, nispeten pürüzsüz bir yüzey gösterirken SPCE/ERGO SEM görüntüsünde rastgele dağılmış kıvrımlı katmanlar ve üst üste binmiş daha pürüzlü yüzey gözlenmiştir. SPCE/ERGO/PNR'nin SEM görüntüsü birçok gözenek içeren ağ benzeri yapı sergilemektedir SPCE/ERGO/PNR/AuNP'nin SEM görüntüsü yüzeyde çok sayıda küresel nanoparçacıklar göstermektedir. Bu nanopartiküller AuNP'den oluşmaktadır. SPCE/ERGO/PNR/AuNP elektrotlarının EDX analizi sonuçlarında, AuNP'lerin varlığı doğrulanmıştır.

- SPCE/ERGO/PNR/AuNP elektrodunun yüzeyinde bulunan materyallerin etkisini incelemek için SPCE, SPCE/ERGO, SPCE/ERGO/PNR, SPCE/ERGO/PNR/AuNP ve SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA elektrotlarının 5 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (1 M KCl içinde) çözeltisinde dönüşümlü voltamogramları alınmıştır. Dönüştürücünün enzim ile immobilizasyonu sonrasında, elektrot yüzeyinin iletkenliği azalmıştır. Bu nedenle pik akım yüksekliği de azalmıştır. Bu sonuç, enzimin elektrot yüzeyine immobilize edildiğinin kanıtıdır.

- Fenolün SPCE/ERGO/PNR/AuNP elektrotları üzerindeki elektrokimyasal davranışını incelemek için, 50 mM pH 7,0 PBS içerisinde 0,5 mM fenol varlığında ve yokluğunda dönüşümlü voltametri uygulanmıştır. Fenol varlığında SPCE/ERGO/PNR/AuNP dönüştürücü ile +0,004 V'da (pik akım yüksekliği 11,46 µA) ve +0,612 V'da (pik akım yüksekliği 14,422 µA) fenolün yükseltgenme pikleri gözlenmiştir. +0,004 V'da gözlenen pik, fenolün ilk oksidasyon ürünü olan katekolün yükseltgenme pikidir. Fenol yokken +0,612 V potansiyelde herhangi bir pik gözlenmemiştir.

- Fenolün SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörleri üzerindeki elektrokimyasal davranışını incelemek için, 50 mM pH 7,0 PBS içerisinde 0,5 mM fenol varlığında ve yokluğunda dönüşümlü voltametri uygulanmıştır. Tirozinaz enzimi yokluğunda, dönüştürücü ile fenolün yükseltgenme pik potansiyeli 0,612 V'da gözlenmiştir. SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörü ile fenol varlığında, +0,626 V'da (pik akım yüksekliği 11,26 µA), +0,136 V'da (pik akım yüksekliği 2,506 µA) ve -0,092 V'da (pik akım yüksekliği -11,476 µA) üç farklı pik gözlenmiştir. +0,136 V'da gözlenen pik, fenolün tirosinaz enzimi ile katalizlenen yükseltgenme reaksiyonu sonucu oluşan ürün olan katekolün o-kinon bileşiğine yükseltgendiği oksidasyon pikidir. +0,626 V'da gözlenen pik, transducer ile fenolün yükseltgenme pikidir. -0,092 V'da gözlenen pik ise, fenolün tirosinaz enzimi ile katalizlenen yükseltgenme sonucu oluşan o-kinon bileşiğinin, katekole indirgendiği indirgenme pikidir. Sonuç olarak katekolün yükseltgenme piki +0,136 V'da, indirgenme piki ise -0,092 V'da gözlenmiştir. Bu sonuçlar, hazırlamış olduğumuz fenol biyosensörünün analitine cevap verdiğini göstermektedir.

- Katekolün SPCE/ERGO/PNR/AuNP elektrotları üzerindeki elektrokimyasal davranışını incelemek için, 50 mM pH 7,0 PBS içerisinde 0,5 mM katekol varlığında ve yokluğunda dönüşümlü voltametri uygulanmış ve elde edilen voltamogramlar Şekil 4.11'de verilmiştir. Katekol varlığında SPCE/ERGO/PNR/AuNP dönüştürücüsü ile +0,166 V'da (pik akım yüksekliği 73,034 µA) ve +0,0032 V'da (pik akım yüksekliği -15,475 µA) sırasıyla katekolün yükseltgenme ve indirgenme pikleri gözlenmiştir. Katekol yokluğunda PNR'nin redoks pikleri dışında herhangi bir pik gözlenmemiştir.

- Katekolün SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörleri üzerindeki elektrokimyasal davranışını incelemek için, 50 mM pH 7,0 PBS içerisinde 0,5 mM katekol varlığında ve yokluğunda dönüşümlü voltametri uygulanmıştır. Elde edilen SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörü ile katekol varlığında +0,146 V'da (pik akım yüksekliği 47,273 µA) ve -0,012 V'da (pik akım yüksekliği -20,857 µA) katekolün yükseltgenme ve indirgenme pikleri gözlenmiştir. Bu sonuçlar, hazırlamış olduğumuz fenol biyosensörünün katekol ve fenole cevap verdiğinin kanıtıdır.

- Fenolün elektrokimyasal tayininde kullanılan tampon çözeltisinin optimum pH'sını belirlemek için, farklı pH'larda fosfat tampon çözeltileri kullanılarak dönüşümlü voltamogramları alınmış ve optimum pH 7,0 olarak belirlenmiştir.

- Optimum enzim miktarının belirlenebilmesi için farklı konsantrasyonlarda fenol biyosensörleri hazırlanmıştır. Hazırlanan fenol biyosensörleri ile fenolün amperometrik tayini yapılmıştır. Optimum enzim miktarı 400 U olarak belirlenmiştir.

- SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörlerinin optimum çalışma potansiyellerini belirlemek amacıyla fenol tayini için farklı potansiyellerde gösterdiği amperometrik yanıtlar incelenmiştir. Fenol biyosensörünün optimum çalışma potansiyeli -0,15 V olarak belirlenmiştir. Çalışmanın bundan sonraki kısımlarında hazırlanan biyosensörler ile -0,15 V'da amperometrik tayin yapılmıştır.

- Fenolün amperometrik tayini için kullanılan SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörünün analitiksel karakterizasyonu için bağıl standart sapma, tespit limiti ve tayin sınırı ve tekrarlanabilirlik gibi parametreleri incelenmiştir. 10 µM fenol için tekrarlanabilirliği bağıl standart sapma (R.S.D.) %4,36 (n = 5), tespit limiti ve tayin sınırı sırasıyla 2,36 µM ve 7,86 µM, doğrusal aralık 5 µM – 150 µM olarak bulunmuştur.

- SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörünün uygulama kararlılığı, 10 µM fenol çözeltisinin -0,150 V potansiyelde 60 gün boyunca belirli aralıklarla akımların

ölçülmesi ile test edilmiştir. Fenol biyosensörünün uygulama kararlılığı ilk güne göre azalmış olmasına rağmen, altmışıncı günde dahi fenol için amperometrik yanıt verdiği belirlenmiştir.

- Depolama kararlığını belirlemek için, hazırlanan biyosensörler +4ºC'de sabit nem ortamında bekletilmiş ve 24. haftaya kadar belirli aralıklarda - 0,150 V'da amperometrik fenol tayini için kullanılmıştır. SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörünün 24. haftaya kadar fenole karşı yanıt verdiği görülmüştür.

- SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörü kullanılarak fenolün elektrokimyasal analizi, girişim yapan iyonlar olan NO_3^-, K^+, Ca^{+2}, Mg^{+2}, CO_3^{-2}, SO_4^{-2} varlığında amperometrik olarak yapılmış ve hiçbir iyonun girişim yapmadığı sonucuna varılmıştır.

- Geliştirilen fenol biyosensörleri gerçek numune olarak atık su analizinde kullanılmıştır. Bilinen miktarda fenol içeren atık suların elektrokimyasal tayini, -0,150 V'da SPCE/ERGO/PNR/AuNP/TYR/GA biyosensörleri ile amperometrik olarak yapılmıştır.

- Hazırlamış olduğumuz amperometrik fenol biyosensörü ile atık sularda fenol tayini standart katma metodu ile gerçekleştirilmiş olup %95'in üzerinde geri kazanımlar elde edilmiştir.

- Bu tez kapsamında tek kullanımlık, pratik, düşük maliyetli amperometrik fenol biyosensörü yüksek duyarlık ve yüksek seçicilikte hazırlanmıştır. Fenol biyosensörünün atık sular gibi gerçek numulerde fenol tayininde başarılı bir şekilde uygulaması gerçekleştirilmiştir.

KAYNAKLAR

Ahmad, R., Wolfbeis, O. S., Hahn, Y. B., Alshareef, H. N., Torsi, L. and Salama, K. N. 2018. Deposition of nanomaterials: a crucial step in biosensor fabrication. Materials Today Communications, 17, 289-321.

Ambrosi, A., Bonanni, A., Sofer, Z., Cross, J. S. And Pumera, M. 2011. Electrochemistry at chemically modified graphenes. Chemistry–A European Journal, 17(38), 10763-10770.

Babich, H. and Davis, D. L. 1981. Phenol: A review of environmental and health risks. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 1(1), 90-109.

Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisen, P., Fernández-Lafuente, R., Huguet, J. and Guisán, J. M. 1998. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. Biotechnology and bioengineering, 58(5), 486-493.

Bilal, M. and Asgher, M. 2015. Sandal reactive dyes decolorization and cytotoxicity reduction using manganese peroxidase immobilized onto polyvinyl alcohol-alginate beads. Chemistry Central Journal, 9(1), 1-14.

Bilgi, M. and Ayranci, E. 2016. Biosensor application of screen-printed carbon electrodes modified with nanomaterials and a conducting polymer: Ethanol biosensors based on alcohol dehydrogenase. Sensors and Actuators B: Chemical, 237, 849-855.

Bilgi Kamaç, M., Kiymaz Onat, E. and Yilmaz, M. 2020a. A novel non-enzymatic amperometric H_2O_2 sensor based on screen-printed electrode modified with reduced graphene oxide, polyneutralred and gold nanoparticles. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 100(4), 408-418.

Bilgi Kamaç, M., Kıymaz Onat, E. and Yılmaz, M. 2020b. A new disposable amperometric NADH sensor based on screen-printed electrode modified with reduced graphene oxide/polyneutral red/gold nanoparticle. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 100(4), 419-431.

Bosch, F., Font, G. and Mañes, J. 1987. Ultraviolet spectrophotometric determination of phenols in natural and waste waters with iodine monobromide. Analyst, 112(9), 1335-1337.

Caetano, F. R., Carneiro, E. A., Agustini, D., Figueiredo-Filho, L. C. S., Banks, C. E., Bergamini, M. F. and Marcolino-Junior, L. H. 2018. Combination of electrochemical biosensor and textile threads: A microfluidic device for phenol determination in tap water. Biosensors and Bioelectronics, 99, 382-388.

Campuzano, S., Serra, B., Pedrero, M., de Villena, F. J. M. and Pingarrón, J. M. 2003. Amperometric flow-injection determination of phenolic compounds at self-assembled monolayer-based tyrosinase biosensors. Analytica Chimica Acta, 494(1-2), 187-197.

Casanola-Martin, G.M., Le-Thi-Thu, H., Marrero-Ponce, Y., Castillo-Garit, J.A., Torrens, F., Rescigno, A., Abad, C. and Tareq Hassan Khan, M. 2014. Tyrosinase enzyme: 1. An overview on a pharmacological target. Current topics in medicinal chemistry, 14(12), 1494-1501.

Cerrato-Alvarez, M., Bernalte, E., Bernalte-García, M. J. and Pinilla-Gil, E. 2019. Fast and direct amperometric analysis of polyphenols in beers using tyrosinase-modified screen-printed gold nanoparticles biosensors. *Talanta*, *193*, 93-99.

Cirillo, G., Nicoletta, F. P., Curcio, M., Spizzirri, U. G., Picci, N. and Iemma, F. 2014. Enzyme immobilization on smart polymers: Catalysis on demand. Reactive and Functional Polymers, 83, 62-69.

Damjanović, L., Rakić, V., Rac, V., Stošić, D. and Auroux, A. 2010. The investigation of phenol removal from aqueous solutions by zeolites as solid adsorbents. Journal of hazardous materials, 184(1-3), 477-484.

Datta, S., Christena, L. R. and Rajaram, Y. R. S. 2013. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. 3 Biotech, 3(1), 1-9.

Dempsey, E., Diamond, D. and Collier, A. 2004. Development of a biosensor for endocrine disrupting compounds based on tyrosinase entrapped within a poly (thionine) film. Biosensors and Bioelectronics, 20(2), 367-377.

Dogan, H. Ö., Ekinci, D. and Demir, Ü. 2013. Atomic scale imaging and spectroscopic characterization of electrochemically reduced graphene oxide. Surface science, 611, 54-59.

Dreyer, D. R., Park, S., Bielawski, C. W. and Ruoff, R. S. 2010. The chemistry of graphene oxide. Chemical society reviews, 39(1), 228-240.

D'souza, S. F. 1999. Immobilized enzymes in bioprocess. Current Science, 69-79.

Erkmen, C., Kurbanoglu, S. and Uslu, B. 2020. Fabrication of poly (3, 4-ethylenedioxythiophene)-iridium oxide nanocomposite based tyrosinase biosensor for the dual detection of catechol and azinphos methyl. Sensors and Actuators B: Chemical, 316, 128121.

Fan, J., Lei, J., Wang, L., Yu, C., Tu, B. and Zhao, D. 2003. Rapid and high-capacity immobilization of enzymes based on mesoporous silicas with controlled morphologies. Chemical communications, (17), 2140-2141.

Ghanem, M. A. 2007. Electrocatalytic activity and simultaneous determination of catechol and hydroquinone at mesoporous platinum electrode. Electrochemistry communications, 9(10), 2501-2506.

Godoy-Reyes, T. M., Costero, A. M., Gaviña, P., Martínez-Máñez, R. and Sancenon, F. 2019. Colorimetric detection of normetanephrine, a pheochromocytoma biomarker, using bifunctionalised gold nanoparticles. Analytica chimica acta, 1056, 146-152.

Goode, J. A., Rushworth, J. V. H. and Millner, P. A. 2015. Biosensor regeneration: a review of common techniques and outcomes. Langmuir, 31(23), 6267-6276.

Guan, Y., Liu, L., Chen, C., Kang, X. and Xie, Q. 2016. Effective immobilization of t yrosinase via enzyme catalytic polymerization of L-DOPA for highly sensitive phenol and atrazine sensing. Talanta, 160, 125-132.

Gutés, A., Céspedes, F., Alegret, S. and Del Valle, M. 2005. Determination of phenolic compounds by a polyphenol oxidase amperometric biosensor and artificial neural network analysis. Biosensors and Bioelectronics, 20(8), 1668-1673.

Hanrahan, G., Patil, D. G. and Wang, J. 2004. Electrochemical sensors for environmental monitoring: design, development and applications. Journal of Environmental Monitoring, 6(8), 657-664.

Haque, A. M. J., Park, H., Sung, D., Jon, S., Choi, S. Y. and Kim, K. 2012. An electrochemically reduced graphene oxide-based electrochemical immunosensing platform for ultrasensitive antigen detection. Analytical chemistry, 84(4), 1871-1878.

Huang, X., Qiu, N. and Yuan, D. 2008. Direct enrichment of phenols in lake and sea water by stir bar sorptive extraction based on poly (vinylpyridine-ethylene

dimethacrylate) monolithic material and liquid chromatographic analysis. Journal of Chromatography A, 1194(1), 134-138.

Ikehata, K. and Nicell, J. A. 2000. Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols. Bioresource Technology, 74(3), 191-199.

Jianlong, W., Yi, Q., Horan, N. and Stentiford, E. 2000. Bioadsorption of pentachlorophenol (PCP) from aqueous solution by activated sludge biomass. Bioresource Technology, 75(2), 157-161.)

Junior, J. C. Q., Ferrarezi, A. L., Borges, J. P., Brito, R. R., Gomes, E., Da Silva, R., and Boscolo, M. 2016. Hydrophobic adsorption in ionic medium improves the catalytic properties of lipases applied in the triacylglycerol hydrolysis by synergism. Bioprocess and biosystems engineering, 39(12), 1933-1943.

Koeller, K. M. and Wong, C. H. 2001. Enzymes for chemical synthesis. Nature, 409(6817), 232-240.

Kumar, S., Ahlawat, W., Kumar, R. and Dilbaghi, N., 2015. Graphene, carbon nanotubes, zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare. Biosens. Bioelectron. 70, 498–503.

Lee, C. S., Yu, S. H. and Kim, T. H. 2018. One-step electrochemical fabrication of reduced graphene oxide/gold nanoparticles nanocomposite-modified electrode for simultaneous detection of dopamine, ascorbic acid, and uric acid. Nanomaterials, 8(1), 17.

Li, Y. F., Liu, Z. M., Liu, Y. L., Yang, Y. H., Shen, G. L. and Yu, R. Q. 2006. A mediator-free phenol biosensor based on immobilizing tyrosinase to ZnO nanoparticles. Analytical biochemistry, 349(1), 33-40.

Liu, S., Yu, J. and Ju, H. 2003. Renewable phenol biosensor based on a tyrosinase-colloidal gold modified carbon paste electrode. Journal of Electroanalytical Chemistry, 540, 61-67

Liu, D. M., Chen, J. and Shi, Y. P. 2018. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 102, 332-342.

.

Lv, Y., Wang, F., Zhu, H., Zou, X., Tao, C. A. and Wang, J. 2016. Electrochemically reduced graphene oxide-nafion/Au nanoparticle modified electrode for hydrogen peroxide sensing. Nanomaterials and Nanotechnology, 6, 30.

Mehrotra, P. 2016. Biosensors and their applications–A review. Journal of oral biology and craniofacial research, 6(2), 153-159.

Mello, L. D. and Kubota, L. T. 2002. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. Food chemistry, 77(2), 237-256.

Meng, J., Shi, C., Wei, B., Yu, W., Deng, C. and Zhang, X. 2011. Preparation of Fe3O4@ C@ PANI magnetic microspheres for the extraction and analysis of phenolic compounds in water samples by gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1218(20), 2841-2847.

Nelson, J. M. and Griffin, E. G. 1916. Adsorption of invertase. Journal of the American Chemical Society, 38(5), 1109-1115.

Othmer, K., 1982. Encyclopedia of Chemical Technology 3rd edition, Wiley–Interscience, U.S.,373-382

Pang, S., Wu, Y., Zhang, X., Li, B., Ouyang, J. and Ding, M. 2016. Immobilization of laccase via adsorption onto bimodal mesoporous Zr-MOF. Process Biochemistry, 51(2), 229-239.

Peñalver, M. J., Hiner, A. N., Rodríguez-López, J. N., García-Cánovas, F. and Tudela, J. 2002. Mechanistic implications of variable stoichiometries of oxygen consumption during tyrosinase catalyzed oxidation of monophenols and o-diphenols. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1597(1), 140-148.

Pérez, J. H., López, M. S. P., López-Cabarcos, E. and López-Ruiz, B. 2006. Amperometric tyrosinase biosensor based on polyacrylamide microgels. Biosensors and Bioelectronics, 22(3), 429-439.

Rezwan, K., Meier, L. P., Rezwan, M., Vörös, J., Textor, M. and Gauckler, L. J. 2004. Bovine serum albumin adsorption onto colloidal Al_2O_3 particles: a new model based on zeta potential and UV− Vis measurements. Langmuir, 20(23), 10055-10061.

Rustagi, S. and Kumar, P. 2013. Biosensor and it's Application in Food Industry. Advances in Bioresearch, 4(2), 168-170.

Sahin, M. and Ayranci, E. 2015. Electrooxidation of NADH on modified screen-printed electrodes: effects of conducting polymer and nanomaterials. Electrochimica Acta, 166, 261-270.

Sahutoglu, A. S. and Akgul, C. 2015. Immobilisation of Aspergillus oryzae α-amylase and Aspergillus niger glucoamylase enzymes as cross-linked enzyme aggregates. Chemical Papers, 69(3), 433-439.

Seo, S. Y., Sharma, V. K. and Sharma, N. 2003. Mushroom tyrosinase: recent prospects. Journal of agricultural and food chemistry, 51(10), 2837-2853.

Serra, B., Jiménez, S., Mena, M. L., Reviejo, A. J. and Pingarrón, J. M. 2002. Composite electrochemical biosensors: a comparison of three different electrode matrices for the construction of amperometric tyrosinase biosensors. Biosensors and Bioelectronics, 17(3), 217-226.

Şahin, M. 2013. Etanol-metanol karışımının tayini için yüzey baskılı elektrotların modifiye edilmesiyle amperometrik alkol biyosensörünün geliştirilmesi.

Telefoncu, A. 1999. İmmobilize enzimler. Kuşadası: Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu.

Toussaint, O. and Lerch, K. 1987. Catalytic oxidation of 2-aminophenols and ortho hydroxylation of aromatic amines by tyrosinase. Biochemistry, 26(26), 8567-8571.

Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K. and Adley, C. 2010. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. Biotechnology advances, 28(2), 232-254.

Wang, Z., Zhou, X., Zhang, J., Boey, F. and Zhang, H. 2009. Direct electrochemical reduction of single-layer graphene oxide and subsequent functionalization with glucose oxidase. The Journal of Physical Chemistry C, 113(32), 14071-14075.

Wei, W., Yin, X. B. and He, X. W. 2008. pH-mediated dual-cloud point extraction as a preconcentration and clean-up technique for capillary electrophoresis determination of phenol and m-nitrophenol. Journal of Chromatography A, 1202(2), 212-215.

Wu, L., Lu, X., Wu, Z. S., Dong, Y., Wang, X., Zheng, S. and Chen, J. 2018. 2D transition metal carbide MXene as a robust biosensing platform for enzyme

immobilization and ultrasensitive detection of phenol. Biosensors and Bioelectronics, 107, 69-75.

Xu, H., Cao, Q., Wang, X., Li, W., Li, X. and Deng, H. 2010. Properties and chemical oxidation polymerization of polyaniline/neutral red/TiO2 composite electrodes. Materials Science and Engineering: B, 171(1-3), 104- 108.

Yildiz, H. B., Castillo, J., Guschin, D. A., Toppare, L. and Schuhmann, W. 2007. Phenol biosensor based on electrochemically controlled integration of tyrosinase in a redox polymer. Microchimica Acta, 159(1), 27-34.

Zejli, H., de Cisneros, J. H. H., Naranjo-Rodriguez, I., Liu, B., Temsamani, K. R.and Marty, J. L. 2008. Phenol biosensor based on Sonogel-Carbon transducer with tyrosinase alumina sol–gel immobilization. Analytica chimica acta, 612(2), 198-203.

Zhou, Y. and Zhi, J. 2006. Development of an amperometric biosensor based on covalent immobilization of tyrosinase on a boron-doped diamond electrode. Electrochemistry communications, 8(12), 1811-1816.

Zhu, Y. T., Ren, X. Y., Liu, Y. M., Wei, Y., Qing, L. S. and Liao, X. 2014. Covalent immobilization of porcine pancreatic lipase on carboxyl-activated magnetic nanoparticles: characterization and application for enzymatic inhibition assays. Materials Science and Engineering: C, 38, 278-285.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	: Şakir KAMAÇ
Medeni Hali	: Evli
Yabancı Dili	: İngilizce
Mesleği	: Jeoloji Mühendisi
Eğitim Durumu	
Lise	: Elazığ M.Akif Ersoy Lisesi (1993)
Lisans	: Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi (2013)
Yüksek Lisans	: Çankırı Karatekin Üniversitesi FBE Kimya Anabilim Dalı (2021)