

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI
2022-DR-013

KATEKOL, DOPAMİN VE (-)-EPİKATEŞİN TAYİNİ İÇİN
LAKKAZ TEMELLİ NANOBIYOSENSÖRLERİN
HAZIRLANMASI

SİNEM EVLİ
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. DENİZ AKTAŞ UYGUN

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
FEF-20024 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN – 2022

TEŞEKKÜR

Öğrenim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteğini, güler yüzünü, samimiyetini ve özellikle yüksek enerjisini hiçbir zaman esirgemeyen, değerli bilgilerini benimle paylaşan, büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenin fazlasını sunan ve danışmanım olmasından her zaman gurur duyacağım sevgili danışman hocam sayın Prof. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bilimsel ve manevi desteklerinden ve Tez İzleme Komitemde sunduğu katkılarından dolayı değerli hocam sayın Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER'e; bilgi ve tecrübelerini paylaşmaktan çekinmeyen sayın Prof. Dr. Dilek ODACI DEMİRKOL'a ve emekleri ve desteğinden dolayı bölüm hocalarımdan sayın Prof. Dr. Yüksel ŞAHİN'e teşekkür ederim.

Doktora öğrenimim sürecinde tecrübeleriyle ve pozitif enerjisiyle her zaman içtenlikle yardım eden değerli hocam Prof. Dr. Murat UYGUN'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışma ortamımı paylaştığım laboratuvar hocalarım ve arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Rukiye YAVAŞER, Öğr. Gör. Dr. Çağdaş SUNNA, doktora öğrencileri Baha ÖNDEŞ, Ulviye KİLİMCİ'ye; bu çalışmayı FEF 2024 No'lu Bilimsel Araştırma Projesi olarak destekleyen Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne ve olanaklarından yararlandığım Kimya Bölümü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalarım için YÖK 100/2000 Öncelikli Alanlar doktora bursunu sağlayan YÖK'e ve 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım. Doktora öğrenimim sürecinde Erasmus+ Programları ile iki kez yurt dışına gidebilme imkanı sundukları için Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Uluslararası İlişkiler Koordinatörlüğü'ne teşekkürü borç bilirim.

Canım arkadaşlarım Philip SÄRLÖV, Anıl İNCEL, Alper YILMAZ, Ayşe ALKANDURUR, Hilal ALKANDURUR, Mehmet Can DOĞANER, Merve Sultan ÇAKAN ve Şevin Ece GÜNDEŞ'e destekleri için teşekkür ederim.

Son olarak, sevgisini ve hoşgörüsünü cömertçe sunan, her koşulda yanımda olduklarını bildiğim çok kıymetli anneme, babama ve kardeşlerime tüm kalbimle teşekkürlerimi sunarım.

Sinem EVLİ

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
RESİMLER DİZİNİ.....	xviii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
ÖZET.....	xxii
ABSTRACT.....	xxiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Biyosensörlerin Tanımı ve Tarihçesi	1
1.2. Biyosensörlerin Çalışma Prensipleri ve Sınıflandırılması.....	5
1.3. Biyoreseptör Türlerine Göre Biyosensörler	6
1.3.1. Enzim Biyoreseptörleri.....	7
1.3.2. Antikor Biyoreseptörleri.....	7
1.3.3. Nükleik Asit Biyoreseptörleri	8
1.3.4. Hücre Biyoreseptörleri	9
1.3.5. Biyomimetik Biyoreseptörler.....	9

1.4. Sinyal Çeviri Türlerine Göre Biyosensörler	12
1.4.1. Optik Algılama Yöntemleri	13
1.4.2. Piezoelektrik Temelli Biyosensörler	15
1.4.3. Kalorimetrik Biyosensörler.....	16
1.4.4. Elektrokimyasal Biyosensörler	16
1.5. İdeal Bir Biyosensörün Sahip Olması Gereken Özellikler ve Biyosensörlerin Uygulama Alanları.....	22
1.6. Nanoteknolojinin Tanımı ve Tarihçesi.....	25
1.6.1. Nanomalzemeler ve Nanomalzemelerin Biyosensörlerde Kullanımı	27
1.6.1.1. Sıfır Boyutlu (0D) Nanomalzemeler	30
1.6.1.2. Tek Boyutlu (1D) Nanomalzemeler	32
1.6.1.3. İki Boyutlu (2D) Nanomalzemeler.....	33
1.6.1.4. Üç Boyutlu (3D) Nanomalzemeler.....	33
1.7. Enzimler ve Enzim Temelli Biyosensörler.....	34
1.8. Lakkaz Enzimi Hakkında Genel Bilgiler	37
1.8.1. Lakkaz Temelli Amperometrik Biyosensörler.....	40
1.9. Polifenoller Hakkında Temel Bilgiler	43
1.9.1. Katekol.....	44
1.9.2. Dopamin	45
1.9.3. (-)-Epikateşin	46

2. KAYNAK ÖZETLERİ	47
2.1. Katekol Tayini Çalışmaları.....	47
2.2. Dopamin Tayini Çalışmaları.....	51
2.3. Epikateşin Tayini Çalışmaları.....	56
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	60
3.1. Kimyasallar ve Cihazlar	60
3.1.1. Kimyasallar	60
3.1.2. Cihazlar.....	61
3.2. Yöntem	61
3.2.1. Göl Suyu ve Musluk Suyunda Katekol Tayini için Lakkaz İmmobilize L-Sistein-Ag@Fe ₃ O ₄ Manyetik Nanopartiküllerle Modifiye Perde Baskılı Elektrotların Hazırlanması	61
3.2.1.1. Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ Manyetik Nanopartiküllerin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Lakkazın Manyetik Nanopartiküllere İmmobilizasyonu.....	61
3.2.1.2. Perde Baskılı Elektrotların Lakkaz İmmobilize Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ Manyetik Nanopartiküller ile Modifikasyonu ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu	63
3.2.1.3. Cys-Lakkaz-Ag@Fe ₃ O ₄ /SPE'lerin Optimizasyonu	64
3.2.1.4. Lakkaz/Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ /Kitosan/SPE'lerin Kinetik ve Analitik Performansları ...	65
3.2.1.5. Lakkaz/Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ /Kitosan/SPE'lerin Göl Suyu ve Musluk Suyunda Katekol Tayini İçin Uygulanabilirliğinin Araştırılması	66
3.2.2. Ticari Serum ve Yapay İdrarda Dopamin Tayini için Lakkaz İmmobilize Ni/Au/PPy-COOH Nanoteller ile Modifiye Perde Baskılı Elektrotların Hazırlanması	67
3.2.2.1. Ni/Au/PPy-COOH Nanotellerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Aktivasyonu	67

3.2.2.2. Perde Baskılı Elektrotların Modifikasyonu ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu	68
3.2.2.3. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin Optimizasyonu	70
3.2.2.4. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin Kinetik ve Analitik Performansları	71
3.2.2.5. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin Ticari Serum ve Yapay İdrarda Dopamin Tayini İçin Uygulanabilirliğinin Araştırılması	72
3.2.3. Şarapta ve Meyve Suyunda (-)-Epikateşin Tayini için Lakkaz Temelli GO/TiS ₂ Nanokompozitlerle Modifiye Perde Baskılı Elektrotların Hazırlanması	73
3.2.3.1. GO/TiS ₂ Nanokompozitlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu	73
3.2.3.2. Perde Baskılı Elektrotların Modifikasyonu ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu	74
3.2.3.3. Lakkaz-GO/TiS ₂ /NAF/SPE'lerin Optimizasyonu	75
3.2.3.4. Lakkaz-GO/TiS ₂ -NAF/SPE'lerin Kinetik ve Analitik Performansları	76
3.2.3.5. Lakkaz-GO/TiS ₂ -NAF/SPE'lerin Şarapta ve Meyve Suyunda (-)-Epikateşin Tayini İçin Uygulanabilirliğinin Araştırılması	77
4. BULGULAR	79
4.1. Göl Suyu ve Musluk Suyunda Katekol Tayini için Lakkaz Temelli Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ Manyetik Nanopartiküllerle Modifiye Perde Baskılı Elektrotların Hazırlanması	79
4.1.1. Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ Manyetik Nanopartiküllerin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Lakkazın Manyetik Nanopartiküllere İmmobilizasyonu	79
4.1.2. Perde Baskılı Elektrotların Lakkaz/Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ ile Modifikasyonu ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu	81
4.1.3. Lakkaz/Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ /Kitosan/SPE'lerin Optimizasyonu	84
4.1.4. Lakkaz/Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ /Kitosan/SPE'lerin Kinetik ve Analitik Performansları	86

4.1.5. Lakkaz/Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ /Kitosan/SPE'lerin Göl Suyu ve Musluk Suyunda Katekol Tayini İçin Uygulanabilirliğinin Araştırılması.....	91
4.2. Ticari Serum ve Yapay İdrarda Dopamin Tayini için Lakkaz İmmobilize Ni/Au/PPy-COOH Nanoteller ile Modifiye Perde Baskılı Elektrotların Hazırlanması.....	92
4.2.1. Ni/Au/PPy-COOH Nanotellerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Aktivasyonu	92
4.2.2. Perde Baskılı Elektrotların Modifikasyonu ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu ..	94
4.2.3. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin Optimizasyonu.....	96
4.2.4. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin Kinetik ve Analitik Performansları.....	99
4.2.5. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin Ticari Serum ve Yapay İdrarda Dopamin Tayini İçin Uygulanabilirliğinin Araştırılması.....	104
4.3. Şarapta ve Meyve Suyunda (-)-Epikateşin Tayini için Lakkaz Temelli GO/TiS ₂ Nanokompozitlerle Modifiye Perde Baskılı Elektrotların Hazırlanması.....	105
4.3.1. GO/TiS ₂ Nanokompozitlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu	105
4.3.2. Perde Baskılı Elektrotların Modifikasyonu ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu	106
4.3.3. Lakkaz/GO/TiS ₂ /NAF/SPE'lerin Optimizasyonu.....	109
4.3.4. Lakkaz-GO/TiS ₂ -NAF/SPE'lerin Kinetik ve Analitik Performansları	111
4.3.5. Lakkaz-GO/TiS ₂ -NAF/SPE'lerin Şarapta ve Meyve Suyunda (-)-Epikateşin Tayini İçin Uygulanabilirliğinin Araştırılması.....	116
5. TARTIŞMA.....	117
5.1. Göl Suyu ve Musluk Suyunda Katekol Tayini için Lakkaz İmmobilize Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ Manyetik Nanopartiküllerle Modifiye Perde Baskılı Elektrotların Hazırlanması	118
5.1.1. Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ Manyetik Nanopartiküllerin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Lakkazın Manyetik Nanopartiküllere İmmobilizasyonu	118

5.1.2. Perde Baskılı Elektrotların Lakkaz İmmobilize Ag@Fe ₃ O ₄ Manyetik Nanopartiküller ile Modifikasyonu ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu	120
5.1.3. Lakkaz/Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ /Kitosan/SPE'lerin Optimizasyonu	122
5.1.4. Lakkaz/Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ /Kitosan SPE'lerin Kinetik ve Analitik Performansları	125
5.1.5. Lakkaz/Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ /Kitosan/SPE'lerin Göl Suyu ve Musluk Suyunda Katekol Tayini İçin Uygulanabilirliğinin Araştırılması.....	130
5.2. Ticari Serum ve Yapay İdrarda Dopamin Tayini için Lakkaz İmmobilize Ni/Au/PPy-COOH Nanoteller ile Modifiye Perde Baskılı Elektrotların Hazırlanması	131
5.2.1. Ni/Au/PPy-COOH Nanotellerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Aktivasyonu	132
5.2.2. Perde Baskılı Elektrotların Modifikasyonu ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu	133
5.2.3. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin Optimizasyonu.....	134
5.2.4. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin Kinetik ve Analitik Performansları	137
5.2.5. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin Ticari Serum ve Yapay İdrarda Dopamin Tayini İçin Uygulanabilirliğinin Araştırılması.....	143
5.3. Şarapta ve Meyve Suyunda (-)-Epikateşin Tayini için Lakkaz Temelli GO/TiS ₂ Nanokompozitlerle Modifiye Perde Baskılı Elektrotların Hazırlanması.....	144
5.3.1. GO/TiS ₂ Nanokompozitlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu	145
5.3.2. Perde Baskılı Elektrotların Modifikasyonu ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu	146
5.3.3. Lakkaz-GO/TiS ₂ -NAF/SPE'lerin Optimizasyonu	147
5.3.4. Lakkaz-GO/TiS ₂ -NAF/SPE'lerin Kinetik ve Analitik Performansları	149
5.3.5. Lakkaz-GO/TiS ₂ -NAF/SPE'lerin Şarapta ve Meyve Suyunda (-)-Epikateşin Tayini İçin Uygulanabilirliğinin Araştırılması.....	152
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	154

KAYNAKLAR.....	157
BİLİMSEL ETİK BEYANI	183
ÖZ GEÇMİŞ.....	184



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

0D	: Sıfır Boyut
1D	: Bir Boyut
2D	: İki Boyut
3D	: Üç Boyut
Å	: Ångström
ABS	: Asetat Tamponu
AFM	: Atomik Kuvvet Mikroskobu
AgNPs	: Gümüş Nanopartiküller
C	: Kapasitans
CE	: Karşıt Elektrot
CMC	: Karboksimetil Selüloz
CMF	: Selüloz Mikrofiberler
CNT	: Karbon Nanotüp
CS	: Kitosan
CV	: Döngüsel Voltametri
CVD	: Kimyasal Buhar Biriktirme
Cys	: Sistein
DET	: Doğrudan Elektron Transferi
DPV	: Diferansiyel Pulse Voltametrisi

E°	: Standart Redoks Potansiyeli
EDC	: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür
EDOT	: 3,4-Etilendioksitiofen
EDX	: Enerji Dağılımlı X-Işını Analizi
EIS	: Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi
ESR	: Elektron Spin Rezonans
GCE	: Camsı Karbon Elektrot
GMDK	: Geçiş Metal Dikalkojenit
GR	: Grafen
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IBM	: Uluslararası İş Makineleri
ISE	: İyon Seçici Elektrotlar
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler
L-DOPA	: 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin
LOD	: Tayin Sınırı
LOQ	: Ölçüm Sınırı
LSV	: Doğrusal Tarama Voltametri

MEMS	: Mikroelektromekanik Sistemler
MIP	: Moleküler Baskılanmış Polimerler
MWCNT	: Çok Duvarlı Karbon Nanotüpler
NAF	: Nafion™
NHS	: N-Hidroksisüksinimid
NNI	: Ulusal Nanoteknoloji Girişimi
N-OMC	: Azot İçeren Düzenli Bir Mezogözenekli Karbon
NP	: Nanopartikül
PA	: Fitik Asit
PANI	: Polianilin
PBS	: Fosfat Tamponu Çözeltisi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pI	: İzoelektrik Nokta
PMT	: Foton Çoğaltıcı Tüp
PPy	: Polipirol
QCM	: Kuvars Kristali Mikrodenge
R_{ct}	: Elektron Transfer Direnci
RE	: Referans Elektrot
GO	: Grafen Oksit
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat

SELEX	: Üstel Zenginleştirme Yoluyla Ligandların Sistemik Evrimi
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SPE	: Perde Baskılı Elektrotlar
SPR	: Yüzey Plazmon Rezonans
ssDNA	: Tek Zincirli DNA
SWV	: Kare Dalga Voltametri
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskobu
TPC	: Toplam Polifenol İçeriği
TvL	: <i>Trametes versicolor</i> Lakkazı
U	: Enzim Ünitesi
UV	: Ultraviyole Spektroskopisi
W	: Kütle Transfer Sınırlamalarının Etkilerini Açıklayan Warburg Empedansı
WE	: Çalışma Elektrodu
YSI	: Yellow Springs Instruments şirketi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Biyosensörlerin çalışma prensiplerinin şematik gösterimi.....	2
Şekil 1.2. Biyosensör araştırmalarının zaman çizelgesi.....	5
Şekil 1.3. Biyosensörlerin sınıflandırılması.....	6
Şekil 1.4. Empedans ölçümlerinde kullanılan elektrik devresi (R_1 : Elektrotlar arasındaki çözelti direnci, R_2 : Yük transfer direnci, C: Elektrot ile çözeltideki yüklü iyonlar arasındaki kapasitans, W: Warburg empedansı).....	21
Şekil 1.5. Biyosensörlerin uygulama alanları.....	24
Şekil 1.6. Nanomalzemelerin farklı kriterlere göre sınıflandırılmasının şematik gösterimi.....	28
Şekil 1.7. Biyosensörlerde boyutlarına göre nanomalzemeler.....	30
Şekil 1.8. İmmobilizasyon yöntemleri.....	43
Şekil 3.1. Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ manyetik nanopartiküllere lakkazın immobilizasyonu ve elektrodun modifikasyonu.....	64
Şekil 3.2. Ni/Au/PPy-COOH nanotellerin hazırlanması ve elektrot modifikasyonun şematik gösterimi.....	69
Şekil 3.3. GO/TiS ₂ nanokompozitlerinin hazırlanması ve elektrodun modifikasyonu.....	75
Şekil 4.1. Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ nanopartiküllere immobilize edilmiş lakkaz miktarının Lakkaz/Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ /Kitosan/SPE biyosensörünün amperometrik yanıtına etkisi (50 mM pH 5.5 ABS tampon çözeltisi içerisinde 50 µM katekol varlığında, uygulanan potansiyel -50 mV, sıcaklık 25°C).....	84
Şekil 4.2. Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ manyetik nanopartiküllerin derişiminin Lakkaz/Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ /Kitosan/SPE biyosensörünün amperometrik yanıtına etkisi (50 mM	

- pH 5.5 ABS tampon çözeltisinde 50 μ M katekol varlığında, uygulanan potansiyel -50 mV, sıcaklık 25°C).85
- Şekil 4.3.** Ortam pH'ının Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörünün amperometrik yanıtına etkisi (Tüm tampon çözeltiler için 50 μ M katekol varlığında, uygulanan potansiyel -50 mV, sıcaklık 25°C). 86
- Şekil 4.4.** Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE için 50 mM pH 5.5 ABS tamponuna farklı katekol derişimleri eklenmesiyle elde edilen kalibrasyon eğrisi ve iç grafik; doğrusal aralık grafiği (uygulanan potansiyel -50 mV, sıcaklık 25°C). 87
- Şekil 4.5.** Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörünün katekol için Lineweaver–Burk grafiği (uygulanan potansiyel -50 mV, sıcaklık 25°C, 50 mM pH 5.5 ABS tamponu). 88
- Şekil 4.6.** Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörünün optimum koşullarda A) tekrar kullanılabilirliği ve B) tekrar üretilebilirliği 89
- Şekil 4.7.** Elektroaktif türlerin Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörü yüzeyine eklenmesiyle elde edilen girişim grafiği. İç grafik: Girişim yapan elektroaktif türlerin amperometrik cevabını gösteren akım-zaman grafiği (25°C, 50 mM pH 5.5 ABS çalışma tamponu ve uygulanan potansiyel -50 mV). 90
- Şekil 4.8.** Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörünün optimum koşullarda depo kararlılığı. 90
- Şekil 4.9.** Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE biyosensörünün amperometrik yanıtına çalışma potansiyelinin etkisi (50 mM pH 6.5 PBS tamponu çözeltisinde 10 μ M dopamin varlığında, sıcaklık 25°C). 97
- Şekil 4.10.** Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE biyosensörünün amperometrik yanıtına Ni/Au/PPy-COOH nanotel derişiminin etkisi (50 mM pH 6.5 PBS tamponunda 10 μ M dopamin varlığında, uygulanan potansiyel -0.2 V, sıcaklık 25°C). 98

- Şekil 4.11.** Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE biyosensörünün amperometrik yanıtına pH'ın etkisi (tüm tampon çözeltilerde 10 µM dopamin varlığında, uygulanan potansiyel -0.2 V, sıcaklık 25°C).....99
- Şekil 4.12.** Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'ler için 50 mM pH 6.5 ABS tamponuna farklı dopamin derişimleri eklenmesiyle elde edilen kalibrasyon eğrisi ve doğrusal aralık grafiği (iç grafik) (uygulanan potansiyel -0.2 V, sıcaklık 25°C).
..... 100
- Şekil 4.13.** Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE biyosensörünün dopamin için Lineweaver–Burk grafiği (uygulanan potansiyel -0.2 V, sıcaklık 25°C, 50 mM pH 6.5 PBS tamponu). 101
- Şekil 4.14.** Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin 50 mM pH 6.5 PBS tampon çözeltisinde 10 µM dopamin varlığında ve -0.2 V potansiyelde A) tekrar kullanılabilirliği B) tekrar üretilebilirliği. 102
- Şekil 4.15.** Elektroaktif türlerin Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE biyosensörü yüzeyine eklenmesiyle elde edilen grafik. İç grafik: Girişim yapan elektroaktif türlerin amperometrik cevabını gösteren akım-zaman grafiği (25°C, 50 mM pH 6.5 PBS çalışma tamponu ve uygulanan potansiyel -0.2 V)..... 103
- Şekil 4.16.** Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin optimum koşullarda depo kararlılığı.
..... 103
- Şekil 4.17.** Lakkaz/GO/TiS₂-NAF/SPE'lerin amperometrik yanıtına çalışma potansiyelinin etkisi (50 mM pH 5.0 ABS tampon çözeltisi içerisinde 100 µM (-)-epikateşin varlığında, sıcaklık 25°C)..... 109
- Şekil 4.18.** Lakkaz/GO/TiS₂-NAF/SPE'lerin amperometrik yanıtına lakkaz miktarının etkisi (50 mM pH 5.0 ABS tamponunda 100 µM (-)-epikateşin varlığında, sıcaklık 25°C, uygulanan potansiyel -0.6V). 110
- Şekil 4.19.** Lakkaz/GO/TiS₂-NAF/SPE'lerin amperometrik yanıtına pH'ın etkisi (tüm tampon çözeltileri için 100 µM (-)-epikateşin varlığında, sıcaklık 25°C, uygulanan potansiyel -0.6 V). 111

- Şekil 4.20.** Lakkaz/GO/TiS₂-NAF/SPE'ler için 50 mM pH 5.0 ABS tamponuna farklı (-)-epikateşin derişimlerinin eklenmesiyle çizilen kalibrasyon grafiği (iç grafik: kalibrasyon grafiğinin doğrusal olduğu bölge) (uygulanan potansiyel -0.6 V, sıcaklık 25°C)..... 112
- Şekil 4.21.** Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE biyosensörünün (-)-epikateşin için Lineweaver-Burk grafiği (uygulanan potansiyel -0.6 V, sıcaklık 25°C, 50 mM pH 5.0 ABS tamponu). 113
- Şekil 4.22.** Lakkaz/GO/TiS₂-NAF/SPE'lerin 50 mM pH 5.0 ABS tamponunda ve -0.6 V potansiyelde (-)-epikateşin için A) tekrar kullanılabilirliği ve B) tekrar üretilebilirliği..... 114
- Şekil 4.23.** Elektroaktif türlerin Lakkaz/GO/TiS₂-NAF/SPE biyosensörü yüzeyine eklenmesiyle elde edilen grafik. İç grafik: Girişim yapan elektroaktif türlerin amperometrik cevabını gösteren akım-zaman grafiği (25°C, 50 mM pH 5.0 ABS tampon çözeltisi ve uygulanan potansiyel -0.6 V). 115
- Şekil 4.24.** Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE biyosensörünün optimum koşullarda depo kararlılığı. 115

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.1. Dr. Clark ve tasarladığı O ₂ elektrodu.....	4
Resim 1.2. Bir antikoron “Y” yapısının şematik gösterimi.	8
Resim 1.3. Bir DNA molekülünün çift sarmallı yapısının ve iki ayrı zincirin birbirleriyle etkileşiminin şematik gösterimi.....	9
Resim 1.4. Üstel zenginleştirme yoluyla ligandların sistematik evrimi (SELEX) metodunun şematik gösterimi	11
Resim 1.5. Moleküler baskılanmış polimerlerin sentezlenmesi prosesi.....	12
Resim 1.6. Bir yüzey plazmon rezonansı (SPR) biyosensörünün kısımlarının ve çalışma prensibinin şematik gösterimi	14
Resim 1.7. Bir elektrokimya hücresi ve üçlü elektrot sistemi (A: Akım, V: Potansiyel, RE: Referans elektrot, WE: Çalışma elektrodu, CE: Karşıt elektrot)	17
Resim 1.8. Farklı bileşenler ve şekillerde tasarlanmış perde baskılı elektrotlar	22
Resim 1.9. Farklı nesnelerin ve doğal organizmaların boyutları	27
Resim 1.10. Elektrotların fabrikasyonunda kullanılan yöntemler.....	29
Resim 1.11. Enzim biyosensörlerinin farklı nesillerinin şematik gösterimleri.....	35
Resim 1.12. a) Nanomalzeme ile modifiye edilmiş elektroda enzim immobilizasyonu, b) elektrodun enzim/nanomalzeme kompoziti ile modifikasyonu.....	36
Resim 1.13. <i>Trametes versicolor</i> lakkazının kümelerini (D1: mavi, D2: kahverengi, D3: yeşil), bakır atomlarını (mavi küreler), karbohidrat birimlerini ve disülfid bağlarını gösteren üç boyutlu yapısı	38

Resim 1.14. <i>Trametes versicolor</i> lakkazının bakır bağlanma bölgeleri. Bakır merkezleri turuncu, L1, M2, L3 ve M4 sırasıyla pembe, yeşil, mavi ve açık sarı ile gösterilmektedir.....	39
Resim 1.15. Lakkazın kataliz reaksiyonunun basitleştirilmiş bir mekanizması	40
Resim 1.16. Katekolün kimyasal yapısı	44
Resim 1.17. Dopaminin kimyasal yapısı	45
Resim 1.18. (-)-Epikateşinin kimyasal yapısı.	46
Resim 4.1. Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ manyetik nanopartiküllerin TEM görüntüleri A) 50 nm, B) 200 nm, C) 500 nm ölçek.....	80
Resim 4.2. Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ manyetik nanopartiküllerin EDX spektrumu	80
Resim 4.3. Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumu.....	81
Resim 4.4. 5 mM [Fe(CN) ₆] ^{3/4-} ve 0.1 M KCl içeren 50 mM pH 7.4 PBS tampon çözeltileri için A) yalın SPE, Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ /Kitosan/SPE ve Lakkaz/Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ /Kitosan/SPE'lere ait CV grafikleri ve B) EIS spektrumları.	82
Resim 4.5. A) 50 µM katekol içeren 50 mM pH 5.5 ABS tampon çözeltilerinde yalın SPE, Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ /Kitosan/SPE ve Lakkaz/Cys-Ag@Fe ₃ O ₄ /Kitosan/SPE'lere ait CV grafikleri. B) Enzimatik oksidasyon reaksiyonu ve ardından substratın elektrot yüzeyinde geri dönüşümünün şematik gösterimi.....	83
Resim 4.6. Ni/Au/PPy-COOH nanotellerin SEM görüntüleri A) 10 µm, B) 5 µm, C) 5 µm ve D) 2 µm	93
Resim 4.7. Ni/Au/PPy-COOH tellerin EDX sonuçları.....	93
Resim 4.8. Manyetik nanotellerin ESR spektrumu.	94
Resim 4.9. A) 5 mM [Fe(CN) ₆] ^{3/4-} ve 0.1 M KCl içeren PBS pH 7.4 tampon çözeltileri için yalın SPE, Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE ve Lakkaz/Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lere ait CV grafikleri ve B) EIS spektrumları.	95

- Resim 4.10.** A) 10 μM dopamin içeren 50 mM pH 6.5 PBS tampon çözeltileri için yalın SPE, Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE ve Lakkaz/Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lere ait CV eğrileri. B) Enzimatik oksidasyon reaksiyonu ve ardından substratın elektrot yüzeyinde geri dönüşümünün şematik gösterimi. 96
- Resim 4.11.** A) GO ve B) TiS_2 nanotabakaların TEM görüntüleri.....105
- Resim 4.12.** GO/ TiS_2 nanokompozitinin TEM görüntüleri A) 100 nm ve B) 60 nm ölçek106
- Resim 4.13.** A) 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ ve 0.1 M KCl içeren 50 mM pH 7.4 PBS tampon çözeltileri için yalın SPE, GO/SPE, TiS_2 /SPE, GO/ TiS_2 /SPE ve Lakkaz/GO/ TiS_2 -NAF/SPE'lere ait CV grafikleri ve B) EIS spektrumları....107
- Resim 4.14.** A) 100 μM (-)-epikateşin içeren 50 mM pH 5.0 ABS tampon çözeltileri için yalın SPE, GO/SPE, TiS_2 /SPE, GO/ TiS_2 /SPE, Lakkaz-GO/ TiS_2 -NAF/SPE'lere ait CV eğrileri. B) Enzimatik oksidasyon reaksiyonu ve ardından substratın elektrot yüzeyinde geri dönüşümünün şematik gösterimi.....108

ÇİZELGELER DİZİNİ

- Çizelge 1.** Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörünün ve Folin-Ciocalteu metodunun musluk suyu ve göl suyunda katekol tayini performansları.....91
- Çizelge 2.** Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE biyosensörü ile ticari serum ve yapay idrarda dopamin tayini. 104
- Çizelge 3.** Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE biyosensörü ile şarapta ve meyve suyunda (-)-epikateşin tayini. 116
- Çizelge 4.** Katekol tayini için tasarlanan çeşitli lakkaz temelli biyosensörlerin karşılaştırılması..... 127
- Çizelge 5.** Dopamin tayini için tasarlanan çeşitli 1D nanomalzeme temelli biyosensörlerin karşılaştırılması..... 139
- Çizelge 6.** Dopamin tayini için tasarlanan çeşitli lakkaz temelli biyosensörlerin karşılaştırılması..... 140
- Çizelge 7.** (-)-Epikateşin tayini için tasarlanan çeşitli lakkaz ve tirozinaz temelli biyosensörlerin karşılaştırılması 152

ÖZET

KATEKOL, DOPAMİN ve (-)-EPİKATEŞİN TAYİNİ İÇİN LAKKAZ TEMELLİ NANOBIYOSENSÖRLERİN HAZIRLANMASI

Evli S. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Programı,
Doktora Tezi, Aydın, 2022.

Amaç: Bu çalışma, lakkaz temelli nanobiyosensörlerin katekolün, dopaminin ve (-)-epikateşinin tayininde kullanılabilirliğinin araştırılması amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Yöntem: Damlatma tekniği ile Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE, Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE ve Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE olarak hazırlanan elektrotların sırasıyla katekol, dopamin ve (-)-epikateşin tayini için optimum çalışma koşulları belirlenmiştir. Biyosensörlerin kinetik ve analitik performansları değerlendirilerek musluk suyu ve göl suyunda katekol; ticari insan serumunda ve yapay idrarda dopamin; şarap ve meyve suyunda (-)-epikateşin tayinine yönelik uygulamalar yapılmıştır.

Bulgular: Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE'nin katekol tayini için doğrusal aralığı 0.1–100 µM, LOD değeri 0.06 µM, duyarlılığı 60.056 µA mM⁻¹ cm⁻²; Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'nin dopamin tayini için doğrusal aralığı 0.01–50 µM, LOD değeri 2.265 nM, duyarlılığı 0.902 µA µM⁻¹ cm⁻²; Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE'nin (-)-epikateşin tayini için doğrusal aralığı 0.1–250 µM, LOD değeri 0.073 µM ve duyarlılığı 0.3264 µA µM⁻¹ cm⁻² olarak belirlenmiştir.

Sonuç: Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE, Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE ve Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE biyosensörlerinin katekol, dopamin ve (-)-epikateşinin tayininde başarılı olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Nanobiyosensör, Lakkaz, Katekol, Dopamin, (-) Epikateşin

ABSTRACT

PREPARATION OF LACCASE-BASED NANOBIOSENSORS FOR DETERMINATION OF CATECHOL, DOPAMIN AND (-)-EPICATECHIN

Evli S. Aydın Adnan Menderes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Chemistry Program, Doctorate Thesis, Aydın, 2022.

Objective: This study was carried out to investigate the usability of laccase-based nanobiosensors for the determination of catechol, dopamine and (-)-epicatechin.

Material and Methods: Laccase/Cys-Ag@Fe₃O₄/Chitosan/SPE, Laccase-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE and Laccase-GO/TiS₂-NAF/SPE electrodes were prepared by the drop-casting method. Optimization experiments were carried out for the detection of catechol, dopamine and (-)-epicatechin, respectively, and kinetic and analytical performances of biosensors were investigated. Application assays were carried out for catechol in tap water and lake water; dopamine in commercial human serum and artificial urine and (-)-epicatechin in red wine and fruit juice.

Results: Linear range, LOD and sensitivity value of Laccase/Cys-Ag@Fe₃O₄/Chitosan/SPE for catechol was determined as 0.1–100 μM , 0.06 μM , and 60.056 $\mu\text{A}\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-2}$, respectively. Linear range, LOD and sensitivity of Laccase-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE for dopamine was determined as 0.01–50 μM , 2.265 nM, and 0.902 $\mu\text{A}\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-2}$, respectively. Linear range, LOD and sensitivity of Laccase-GO/TiS₂-NAF/SPE for (-)-epicatechin was determined as 0.1–250 μM , 0.073 μM , and 0.3264 $\mu\text{A}\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-2}$, respectively.

Conclusion: Laccase/Cys-Ag@Fe₃O₄/Chitosan/SPE, Laccase-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE and Laccase-GO/TiS₂-NAF/SPE biosensors are effective in the determination of catechol, dopamine and (-)-epicatechin.

Key Words: Nanobiosensor, Laccase, Catechol, Dopamine, (-)-Epicatechin

1. GİRİŞ

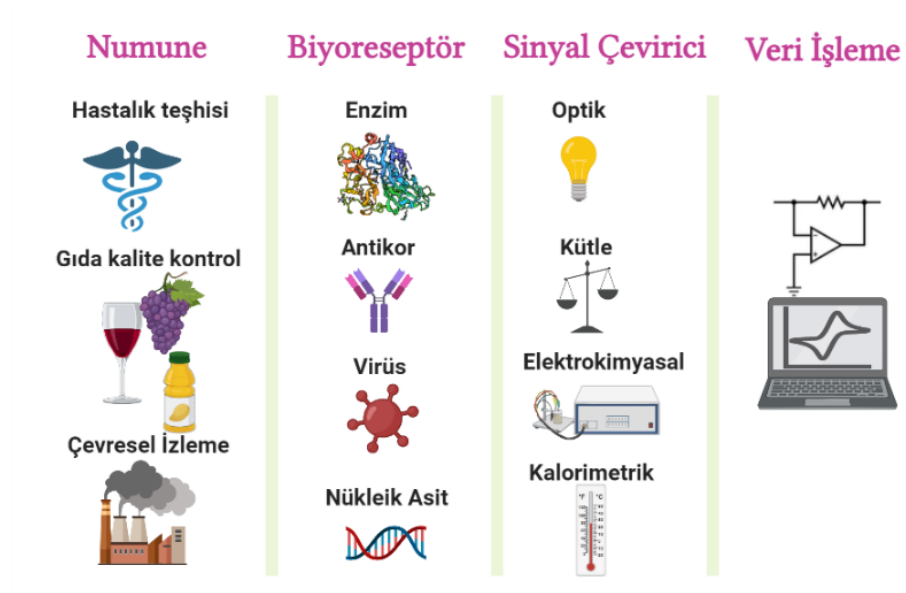
1.1. Biyosensörlerin Tanımı ve Tarihçesi

Seçicilik, bir analitik yöntemin, diğer bileşiklerin girişim etkisi olmaksızın bir numunedeki hedef analiti tayin etme yeteneğidir. Seçicilik, diğer yöntemlere kıyasla biyosensörlerin en önemli avantajlarından birini temsil eder çünkü biyosensörler, önceden ayırma işlemlerine başvurmadan karmaşık bir matriksteki bir analitin tayinini mümkün kılar (Bucur vd., 2021). Biyosensör anahtar kelimesiyle yapılan literatür taraması, bu çalışma alanının şüphesiz ne kadar çekici olduğunu kanıtlamaktadır ve bu alan sınırların kolayca tanımlanamadığı disiplinler arası bir alandır. Biyosensör kavramı zamanla gelişmiş olan bir kavramdır; bazıları için özellikle bu araştırma faaliyetinin başlangıcında, biyolojik numunelerdeki kimyasal türlerin derişimine veya aktivitesine seçici ve geri dönüşümlü olarak yanıt veren bağımsız bir analitik cihazdır. Bu tanımlama, cihazda yer alan biyolojik olarak aktif bir materyalden bahsetmemektedir; bu nedenle biyolojik numunelerde fiziksel veya kimyasal olarak çalıştırılan herhangi bir sensör biyosensör olarak kabul edilebilir. Ancak bir çoğu için bir biyolojik algılayıcının bir dönüştürücü ile entegrasyonu zorunludur ve farklı tanımlar verilse dahi bir biyosensör, basitçe, biyolojik bir algılama elemanının ve bir dönüştürücünün entegrasyonunun söz konusu olduğu bir cihaz olarak tanımlanabilir. Ünlere sağlık, çevre, gıda ve tarım gibi uygulama alanlarındaki farklı analitik problemleri hızlı ve güvenilir bir şekilde çözme kabiliyetlerine borçludurlar (Blum ve Coulet, 2019). Karl Camman, 1977'de (Camman, 1977) biyosensör ifadesini tanımlamıştır ancak IUPAC 1997'ye kadar bir biyosensör tanımı üzerinde hemfikir olmamıştır. Thévenot vd. (2001) ise, aşağıdaki tanımı yapmıştır:

“Bir biyosensör, bir sinyal çevirici ile doğrudan temas halinde bulunan bir biyolojik tanıma materyali kullanılarak, spesifik olarak kantitatif veya yarı-kantitatif analitik bilgi sağlayabilen bağımsız cihazdır. Biyosensörlerin tekrar tekrar kalibre edilebilmeleri nedeniyle, reaktif ekleme gibi ek işlem basamaklarını gerektiren biyoanalitik sistemlerden ayırt edilmesi gerekir. Hem bir ölçümden sonra atılabilen hem de analit derişimini sürekli olarak izleyen bir cihaz, tek kullanımlık bir biyosensör olarak tanımlanmalıdır.

Biyosensörler, biyolojik özgül mekanizmalarına veya alternatif olarak fizikokimyasal sinyal iletim yöntemlerine göre sınıflandırılabilirler. Biyolojik tanıma, izole edilmiş, tasarlanmış veya orijinal biyolojik ortamlarında mevcut olan makromoleküller tarafından katalize edilen bir kimyasal reaksiyona dayanabilir. Sonraki durumlarda, genellikle dengeye ulaşılır ve varsa, sensöre dahil edilen immobilize biyo-kompleksleştirici ajan tarafından analit(ler)in net tüketimine artık gerek yoktur. Biyosensörler, tayin edilecek analitlere veya bu tür analitleri üreten veya tüketen reaksiyonlara göre sınıflandırılabilir. Alternatif olarak; biyolojik tanıma elemanının (biyokimyasal reseptör) bir inhibitörünün veya aktivatörünün dolaylı olarak izlenmesi sağlanabilir” (Thévenot vd., 2001, Renneberg vd., 2007).

Şekil 1.1’de şematize edildiği gibi, analiz edilecek maddenin biyosensör yüzeyindeki biyoreseptörlerle etkileşime girmesi sonucu sinyal çevirici yüzeyinde analit miktarıyla orantılı bir sinyal oluşur ve bu sinyal ölçüm cihazına iletilir. Biyosensörlerin, alternatif ve yaygın olarak kullanılan diğer yöntemlere kıyasla en önemli avantajlarından biri, oldukça düşük maliyetleridir. Ek olarak, biyosensörler genellikle taşınabilirler ve kullanımları kolaydır. Bu nedenle bu cihazların geliştirilmesi biyoteknoloji ve analitik kimyanın önemli bir görevi haline gelmiştir (Kucherenko vd., 2019).



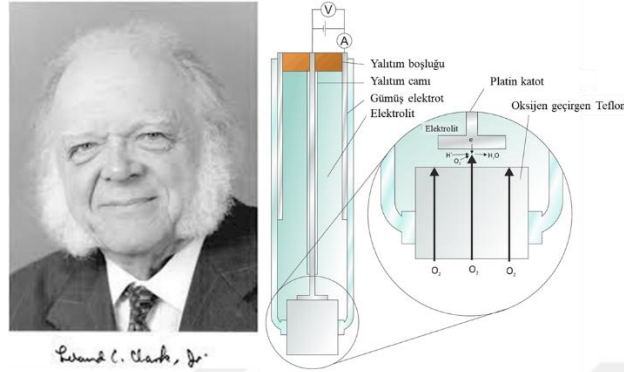
Şekil 1.1. Biyosensörlerin çalışma prensiplerinin şematik gösterimi.

Bir biyosensörün tasarımında dikkat edilmesi gereken özellikler aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Analit, normal saklama koşulları altında spesifik ve kararlı olmalıdır.
- Biyosensör doğru ve tekrarlanabilir bir şekilde yüksek duyarlık göstermeli ve farklı analit derişimleri ile gerçekleştirilen ölçümlerde doğrusallık elde edilmelidir.
- Minimum ön işleme numune analizini mümkün kılacak pH ve sıcaklık gibi fiziksel parametreler optimize edilmelidir.
- Saha uygulamalarında kullanılabilmesi için biyosensörler küçük ve biyoyumlu olmalıdır.
- Üretilen biyosensör taşınabilir, uygun maliyetli ve yeniden hazırlanabilir olmalıdır.
- İnsan numunelerinden alınan analitlerin hızlı ölçümünde kullanılabilmesi için gerçek zamanlı analiz sağlamalıdır (Grieshaber vd., 2008; Turner, 2013).

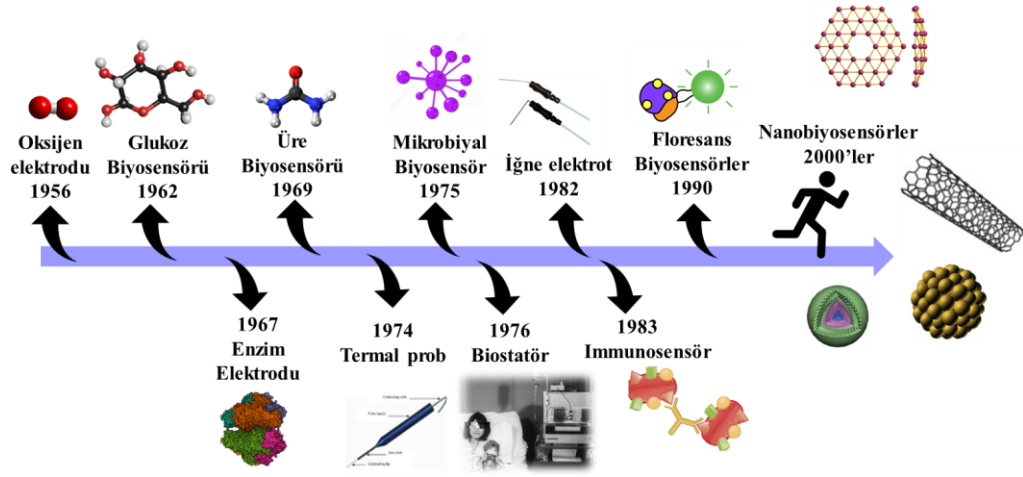
Çalışılan ilk biyosensör, terim o sırada kullanılmamış olsa bile, 1956'da Rochester Üniversitesi'nden Dr. Leland C. Clark'ın kandaki çözünmüş oksijeni ölçmek için bir elektrokimyasal elektrot tasarlamasıyla ve sunmasıyla ortaya çıkmıştır (Resim 1.1). Bu araştırma faaliyetine dayanarak bir biyosensörün ilk kamuoyu açıklaması, Dr. Leland C. Clark'ın 1962'de New York Bilimler Akademisi'ndeki bir konferansta “*biyoalgılayıcılar olarak membran içerisinde tutuklanmış enzimler*” kullanılarak elektrokimyasal sensörlerin nasıl “*daha akıllı*” hale getirileceğini açıklamıştıdır (Kazemi-Darsanaki vd., 2013). Aynı yıl içerisinde, glukoz oksidaz (GOD) enzimini elektrot üzerine immobilize ederek kanın glukoz seviyesini ölçmeyi başardığı ve bu cihazı “*enzim elektrodu*” olarak nitelendirdiği bir makale sunmuştur. Bu amperometrik enzim elektrodunun çalışma prensibi; glukozun yarı-seçici bir membran içerisinde tutuklanan GOD tarafından oksitlenmesi sürecinde O_2 'nin tükenmesinin veya ortaya ürün olarak çıkan H_2O_2 'nin elektrokimyasal olarak izlenmesidir (Bargeron Jr. vd., 1962). Daha sonra 1967'de Updike ve Hicks, “*enzim elektrodu*” terimini, glukozun hızlı ve kantitatif tayini için yine glukoz oksidaz enziminin bir oksijen elektrodunun yüzeyine poliakrilamid jel içinde tutukladıkları benzer bir cihazı tanımlamak için kullandılar (Updike ve Hicks, 1967). Amperometrinin yanı sıra Guilbault ve Montalvo 1969'da potansiyometri yöntemiyle üre derişimini ölçmek için üreaz ile modifiye edilmiş cam elektrotlar kullandılar (Guilbault ve Montalvo, 1969). Birkaç yıl sonra, Yellow Springs Instruments şirketi (YSI), Dr. Clark'ın buluşunu kullanarak glukoz analizör YSI 23006'yı geliştirdi. YSI ilk cihazı 1973'te piyasaya sürdü ancak girişim sorunları nedeniyle geri çekmek zorunda kaldı. Bu

problemin önüne seçici bir membranın eklenmesiyle geçildi ve şirket, 1975'ten sonra oldukça başarılı olan laboratuvar analizörleri serisini yeniden piyasaya sürdü.



Resim 1.1. Dr. Clark ve tasarladığı O₂ elektrodu (National Academy of Engineering, 2007).

1970 yılından itibaren bazı araştırmacılar, bir enzim ve elektrokimyasal sensörlerin birleşimi olan biyosensör kavramını derinlemesine araştırmaya başlamışlardır. O dönemde elektrokimya camiasında İyon Seçici Elektrotlar (ISE) üzerine araştırmalar çok yoğun ve sensör tanımını elektrokimyasal olarak aktif bileşiklere ve hatta glukoz gibi iyonik olmayan bileşiklere genişletme fikri kabul görmeye başlamıştır. ISE geliştirmek için aktif olarak çalışan grupların, elektroanalitik biyosensörlerin geliştirilmesine ilk katkıda bulunanlar olduğunu düşünülmektedir. Rechnitz ve Llenado 1971'de yayınladıkları makalede β-galaktozidaz enziminin hidroliz reaksiyonu sonucu oluşan benzaldehit ve siyanürün ISE ile algılanmasına dayanan bir amigdalin sensörü geliştirdiklerini rapor etmişlerdir (Rechnitz ve Llenado, 1971). Daha sonraki yıllarda, enzimler, organeller, bakteriler, spesifik enzimleri içeren özel biyolojik dokular; potansiyometrik veya amperometrik, ardından optik, termometrik, piezoelektrik vb. cihazlarla birleştirilmiştir (Malcovati vd., 2010). Biyosensörlerin tarihini gösteren genel bir zaman çizelgesi Şekil 1.2'de gösterilmektedir.



Şekil 1.2. Biyosensör araştırmalarının zaman çizelgesi.

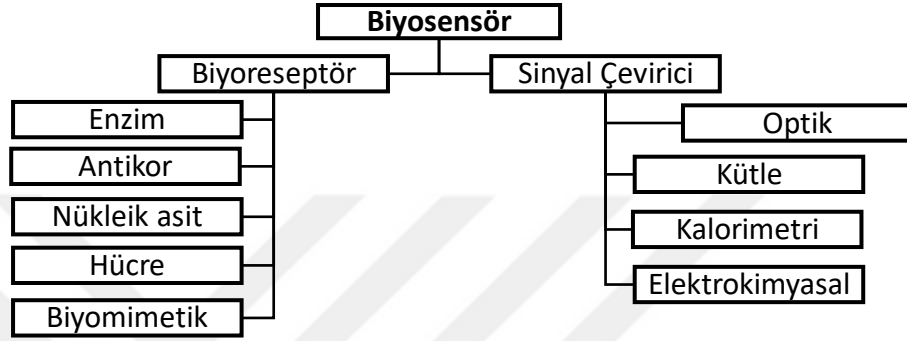
1.2. Biyosensörlerin Çalışma Prensibi ve Sınıflandırılması

Her biyosensör, bir “biyolojik” bileşene ve sinyali algılayan ve ileten fizikokimyasal dönüştürücü olan bir “sinyal çevirici” (transduser) bileşene sahiptir. Fonksiyonu hedef molekül ile spesifik olarak etkileşime girmek olan kısım “biyoreseptör”, fonksiyonu biyolojik cevabı ölçülebilir sinyale dönüştürmek olan kısım ise “sinyal çevirici” olarak adlandırılır. Biyoreseptör analite bağlandığı durumda sensöre “afinite sensörü” denir. Biyoreseptör ve analit, bir substratın derişimini ölçmek için kullanılabilir bir kimyasal değişime neden oluyorsa biyosensöre “metabolik biyosensör” denir. Biyoreseptör analit ile birleşir ve onu kimyasal olarak değiştirmeyip yardımcı bir substrata dönüştürürse biyosensöre “katalitik biyosensör” denir (Karunakaran vd., 2015). Biyoreseptör kısım, kullanılan biyolojik materyalin fonksiyonu ve yapısına göre enzim, antikor, nükleik asit, hücre ve biyomimetik biyoreseptörler olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 1.3). Çoğu sinyal çevirici çeşidi ise dört ana sınıftan birinde kategorize edilebilir. Bu sınıflar şunlardır:

- Etkileşim sonucunda absorplanan ya da açığa çıkan ışık şiddetinin ölçülmesine dayanan optik algılama yöntemleri.
- Kütledeki küçük değişikliklerin ölçümünün piezoelektrik kristallerin kullanımına dayandığı yöntem olan kütle algılama yöntemleri.

• Analit ile biyoreseptör arasında meydana gelen ısı değişiminin belirlenmesi prensibine dayanan kalorimetrik yöntemler.

• Etkileşim sırasında elektroaktif türler harcanırken veya oluşurken ortaya çıkan elektroaktif sinyalin ölçülmesi temeline dayanan elektrokimyasal algılama yöntemleri (Ferrari, 2007).



Şekil 1.3. Biyosensörlerin sınıflandırılması.

1.3. Biyoreseptör Türlerine Göre Biyosensörler

Biyoreseptör veya biyolojik tanıma elemanı, bir biyosensörün önemli ayırt edici özelliği olup hedef analite yönelik tanıma sistemidir. Biyoreseptörler genel olarak beş ana kategoride sınıflandırılabilir ve biyoalgılamada kullanılan en yaygın biyoreseptör biçimleri şu prensiplere dayanmaktadır:

1. Enzimatik etkileşimler.
2. Antikor/antijen etkileşimleri.
3. Nükleik asit etkileşimleri.
4. Hücresel etkileşimler (örneğin, mikroorganizmalar).
5. Biyomimetik materyalleri (sentetik biyoreseptörleri) kullanan etkileşimler.

1.3.1. Enzim Biyoreseptörleri

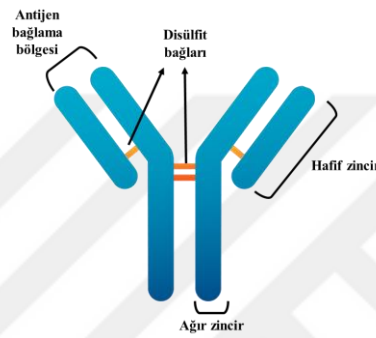
Enzimler, katalitik aktivitelerinin yanı sıra spesifik bağlanma yeteneklerinden dolayı biyosensör uygulamalarında en yaygın kullanılan biyoreseptör molekülleri olmuştur. Katalitik ribonükleik asit moleküllerinin küçük bir grubu dışında, tüm enzimler proteindir ve reaksiyonda tüketilmeden belirli bir substrat molekülünün bir ürüne dönüşümü reaksiyonunu katalize eden biyolojik katalizörlerdir. Enzim, belirli bir hedef analiti, bir kilide uyan bir anahtara benzer şekilde tanır. Enzimler, kimyasal reaksiyonlarına karşı oldukça seçici ve duyarlıdır. Ayrıca diğer biyolojik reseptörlere kıyasla oldukça hızlı hareket ederler ve farklı transdüksiyon mekanizmaları ile kombinasyon halinde kullanılabilirler. Enzim biyoreseptörlerinin çalışma mekanizması; analitin biyoreseptörle saptanabilir bir ürüne dönüştürülmesini, enzim inhibitörü veya aktivatörü olarak görev yapan bir analitin tayinini ve analit ile etkileşim üzerine enzim modifikasyonunun özelliklerinin değerlendirilmesini içerebilir (Karunakaran vd., 2015).

1.3.2. Antikor Biyoreseptörleri

Bir antikor biyoreseptörü diğer bir deyişle bir immünosensör, spesifik bir antijeni tayin etmek için antikorların biyoreseptör olarak kullanıldığı biyosensör çeşididir. İmmün testler en spesifik analitik tekniklerdir, son derece düşük tayin sınırları sağlarlar ve mikroorganizmayı tanıyabilecekleri gibi onlara ait toksinleri, pilileri, sporları, enzimleri ve hatta peptid parçalarını tanıyabilirler (Warsinke vd., 2000; Ghindilis vd., 1998).

Antikorlar veya immüoglobulinler, küresel plazma proteinlerdir (150 kDa). Glikoproteinler olarak da adlandırılırlar ve Y şeklini oluşturan iki ağır zincir ve iki hafif zincirden oluşurlar (Resim 1.2). Antijenler olarak adlandırılan yabancı ajanlara karşı immünolojik tepki ile üretilirler. Antikor, hedef antijene yüksek afinite ile bağlanır ve bu nedenle, diğer girişim yapan türlerin varlığında bile analiti yüksek seçicilik ile tayin edebilir. İmmünosensör gelişiminde kullanılan antikorlar iki çeşittir: poliklonal ve monoklonal. Poliklonal antikorlar, hedef antijenlerin üzerindeki farklı epitoplara

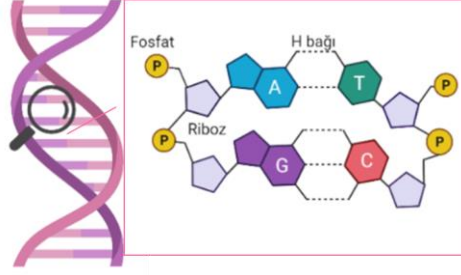
(tamamlayıcı bir antikorun spesifik olarak bağlanabileceği bir antijen üzerindeki küçük bölge) tanıyabildikleri için oldukça duyarlıdır ancak daha az spesifiktirler. Öte yandan monoklonal antikorlar aynı bağışıklık hücresinden üretilirler ve bu sebeple özdeşirler. Antijenlerinin aynı epitopuna bağlanırlar ve bu da onları oldukça spesifik hale getirir. Özellikle monoklonal antikor üretim teknolojisi sayesinde artık herhangi bir antijene özgün monoklonal antikorlar üretilmekte ve üretilen bu antikorlar biyosensör teknolojisinde de kullanılmaktadır (Warsinke vd., 2000).



Resim 1.2. Bir antikorun “Y” yapısının şematik gösterimi.

1.3.3. Nükleik Asit Biyoreseptörleri

Bu tanıma mekanizmasının prensibi, DNA'nın hibridizasyonunu içerir. Adenin:timin (A:T) ve sitozin:guanin (C:G)'in eşleştirilmesi “genosensörler” olarak adlandırılan DNA biyosensörlerinde biyotanın temelini oluşturur ve genetik hastalıkların hızlı ve ucuz test edilmesi amacıyla yönelik olarak geliştirilmektedirler. Bir genosensör, bir genom molekülünü oluşturan nükleotitlerin her birini tayin edebilen bir biyosensördür. Biyolojik tanıma elemanı olarak, tamamlayıcı DNA dizilerini (hedef DNA) tayin edebilen ve “DNA probu” adı verilen tek zincirli DNA kullanılır. Hibridizasyon, amplifikasyon ve rekombinasyon dahil DNA tekniklerinin tümü, DNA'nın çift sarmal yapısına dayanmaktadır ve özellikle biyoalgılama uygulamaları için çok uygundur. Çünkü tamamlayıcı diziler arasındaki bazı eşleştirme etkileşimleri hem spesifik hem de kuvvetlidir (Resim 1.3) (Liu vd., 2012).



Resim 1.3. Bir DNA molekülünün çift sarmallı yapısının ve iki ayrı zincirin birbirleriyle etkileşiminin şematik gösterimi.

1.3.4. Hücre Biyoreseptörleri

Hücre biyoreseptörlerinin prensibi, bütün bir hücre/mikroorganizma ya da belirli türe spesifik olarak bağlanabilen belirli bir hücresel bileşen tarafından biyolojik olarak tanınmaya dayanmaktadır. Bu biyoreseptör türünün avantajı, sinyal amplifikasyonu nedeniyle sıklıkla tayin sınırlarının çok düşük olmasıdır. Bakteriler ve mantarlar, toksisitenin bir göstergesi olarak veya spesifik maddelerin ölçümü için kullanılabilir. Mikroorganizmaların içerdiği spesifik enzimler biyoreseptör olarak görev alabilir. Sinyal üretme mekanizması, hem mikrobiyal hem de enzim biyosensörleri için genel anlamda benzerdir. Mikrobiyal hücre “enzim torbası” olarak kabul edilir. Mikrobiyal biyosensörlerde analit hücreye girer, hücre içi enzimler kullanılarak substratlara dönüştürülür ve sonuç olarak, O₂ veya CO₂ gibi kosubstratlar tüketilirken elektrokimyasal olarak aktif olabilen reaksiyon ürünleri üretilir. Ayrıca hücrelerde bulunan proteinler de spesifik analitin tayini için biyoreseptörler olarak kullanılabilir (Karunakaran vd., 2015).

1.3.5. Biyomimetik Biyoreseptörler

Doğal bir biyosensörü taklit etmek için tasarlanmış bir yapay (insan yapımı) reseptör genellikle bir “biyomimetik reseptör” olarak adlandırılır. Biyomimetik reseptörlerin yapımı

için yıllar boyunca birkaç farklı yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler; aptasensörler ve moleküler baskılanmış polimerlerdir (Hussain vd., 2013).

a. Aptamer Biyoreseptörleri: Aptasensörler

1990'da iki araştırma ekibi, hedef moleküllerine spesifik olarak bağlanan RNA dizilerinin izolasyonu için birbirlerinden bağımsız olarak bir *in vitro* seçim ve amplifikasyon yöntemi keşfetmişlerdir (Cheng vd., 2007; Cox ve Ellington, 2001). Bu fonksiyonel RNA oligonükleotitleri, “uymak” anlamına gelen Latince kökenli *aptus* kelimesinden esinlenilerek “aptamerler” olarak adlandırılır. Daha sonra, proteinler, peptitler, amino asitler, ilaçlar, metal iyonları ve hatta hücreler gibi çok çeşitli hedeflere bağlanabilen DNA ve RNA aptamerleri tanımlanmıştır. Aptamerler, rastgele sentezlenmiş tek zincirli küçük oligonükleotitlerdir (ssDNA veya RNA molekülleri <100 baz). Bu moleküller, hedeflerine yüksek afinite ile bağlanırlar. Antikorlarla karşılaştırıldığında aptamerler çok daha küçüktür ve sentetik yollarla kolayca üretilebilmeleri mümkündür. Aptamerin en büyük avantajı, oligonükleotid yapısı nedeniyle çoklu denatürasyon/rejenerasyon döngülerinden geçebilmesidir, oysa antikor bazlı biyosensörlerin rejenerasyonu zordur (Zhou vd., 2014). Aptamerler, canlı bir organizmanın kullanımını gerektirmeyen, “üstel zenginleştirme yoluyla ligandların sistematik evrimi” (SELEX) adı verilen evrimsel bir yöntemle *in vitro* olarak üretilirler. Herhangi bir hedef için aptamerler, kimyasal olarak üretilen bir oligonükleotit kitaplığından seçilir. SELEX'te yer alan temel adımlar şu şekilde sıralanabilir:

I. Kütüphane oluşturma

Yaklaşık 10^{15} oligonükleotit içeren bir kitaplık oluşturulur. Bunlar, bir bağlanma bölgesi ile çevrili rastgele bir dizi bölgesinden oluşan tek zincirli nükleik asitlerdir.

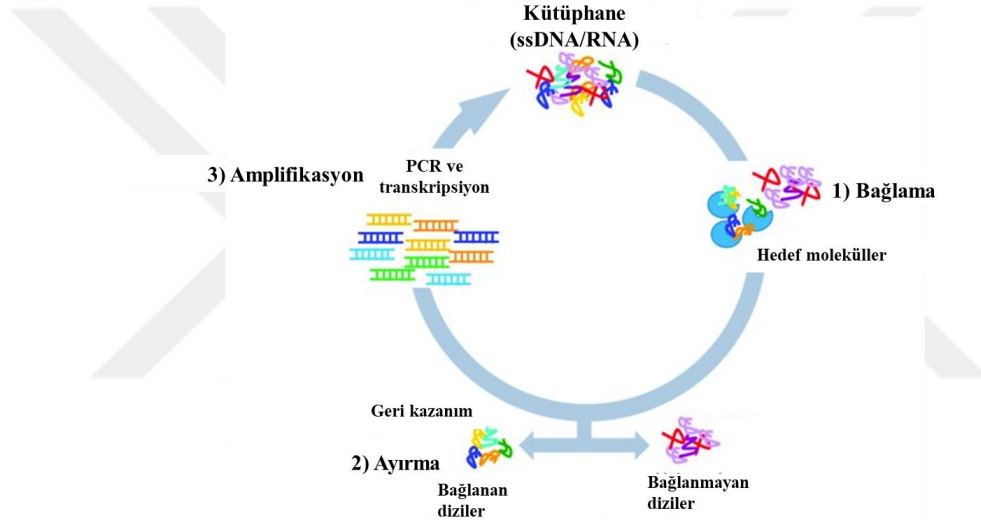
II. Bağlama ve ayırma

Kitaplık, immobilize edilmiş hedef molekül ile inkübe edilir. Birkaç nükleik asit bu hedefe bağlanır ve bunlar aptamerler olarak kabul edilirler. Bağlanmamış nükleik asitler çözeltiden uzaklaştırılır ve bağlı nükleik asitler hedeften ayrılır, buna elüsyon denir.

III. Amplifikasyon

Bağlı nükleik asitler daha sonra yeni bir kitaplık oluşturmak için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak kopyalanır. Bu yeni kitaplık, aptamerlerin kalitesini daha da artırmak için yeni bir SELEX turunda yeniden kullanılır. Tekrarlanan seçim ve amplifikasyon adımları, yarışmacı bağlama yoluyla en yüksek bağlayıcı türlerin tanımlanmasına izin verir (Catuogno ve Esposito, 2017).

SELEX süreci Resim 1.4'de gösterilmektedir.

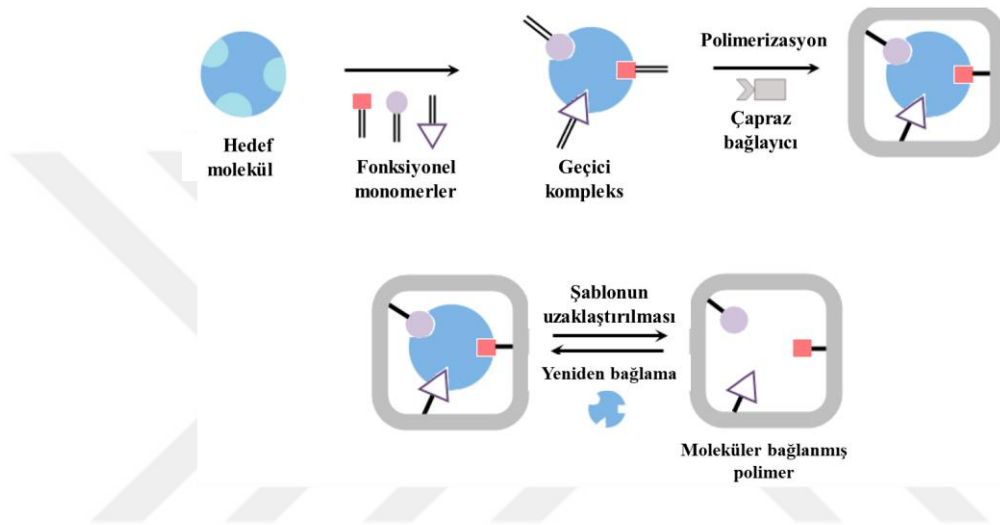


Resim 1.4. Üstel zenginleştirme yoluyla ligandların sistematik evrimi (SELEX) metodunun şematik gösterimi (Catuogno ve Esposito, 2017).

b. Moleküler Baskılanmış Polimerler (MIP)

Moleküler baskılama işlemi, polimerize edilebilir fonksiyonel monomerlerin bir kalıp molekülü etrafında kovalent ya da kovalent olmayan etkileşimlerle düzenlenmesinin ardından polimerizasyonu ve şablonun çıkarılmasını içerir (Resim 1.5). İşlemden sonra kalıp molekülün uzaklaştırılması ile yapıda kalıp moleküle özgü oyuklar oluşmaktadır.

Ayrırma, kimyasal tayin ve kataliz gibi işlemler için kullanılır. Moleküler baskılanmış polimer (MIP) temelli biyosensörlerin, bağlanma afiniteleri iyidir, çok çeşitli kimyasal ve fiziksel koşullar altında sağlam ve kararlıdır. Uygun biyotanıma unsurlarından yoksun analitleri tanımak için tasarlanabilirler. MIP amino asitler, mikotoksinler, nükleotid bazlar, pestisitler, farmasötikler, proteinler ve vitaminler gibi çok çeşitli moleküller ve makromoleküller için sentezlenebilir (Algieri vd., 2014).



Resim 1.5. Moleküler baskılanmış polimerlerin sentezlenmesi prosesi (Saylan vd., 2019).

1.4. Sinyal Çeviri Türlerine Göre Biyosensörler

Sinyal çevirici, biyolojik tanıma işlemi sonucunda ortaya çıkan biyolojik sinyalleri, optik, kütle değişimi, kalorimetrik, elektrokimyasal gibi algılanabilir sinyallere dönüştüren cihazdır. Bununla birlikte, biyosensörlerde kullanılmak üzere sürekli olarak yeni tip sinyal çeviriciler geliştirilmektedir. Çoğu sinyal çevirici şekli dört ana sınıftan birinde kategorize edilse dahi bu ana sınıfın her biri, neredeyse sonsuz sayıda olası algılama metodu veya metod kombinasyonu yaratarak birçok farklı alt sınıf içerir (Karunakaran vd., 2015).

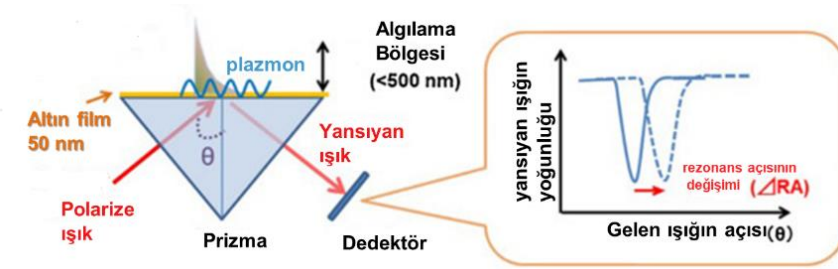
1.4.1. Optik Algılama Yöntemleri

Bu yöntem, ışıkla etkileşime giren ve bu nedenle genellikle fotonun bir alt alanı olarak kabul edilen elektronik cihazların incelenmesi ve uygulanması olan optoelektronığe dayanmaktadır. Bu bağlamda, ışık genellikle gama ışınları, X-ışınları, ultraviyole ve kızılötesi gibi görünmeyen radyasyon biçimlerini içerir. Optoelektronik cihazlar, elektrikten optığe veya optikten elektriğe dönüştürücüler veya bu tür cihazları kullanan aletlerdir. Bunların arasında en yaygın olarak kullanılan optik biyosensörler, optik fiberlerle entegre edilmiş SPR (yüzey plazmon rezonans) veya floresansa dayalıdır. Bu biyosensörlerin prensibi, analit moleküllerinin veya bir kemo-optik dönüştürücü ortamın kırılma indeksi, absorptans ve floresans özelliklerindeki bir değişikliğin ölçülmesine dayanır. Bir optik biyosensörün ana bileşenleri ışık kaynağı, optik iletim ortamı, immobilize biyolojik tanıma elemanı ve optik algılama sistemidir. Optik biyosensörler, farklı parametrelere göre geniş bir şekilde sınıflandırılabilirler. Genel olarak, optik biyoalgılamada uygulanabilecek floresans tabanlı algılama ve etiketsiz algılama olmak üzere iki algılama protokolü vardır. Floresans bazlı algılamada, hedef moleküller veya biyolojik tanıma molekülleri, boyalar gibi floresans etiketlerle etiketlenir; floresansın yoğunluğu, hedef moleküllerin varlığını ve hedef ile biyolojik tanıma molekülleri arasındaki etkileşim gücünü gösterir. Etiketsiz tayin yönteminde, hedef moleküller etiketlenmez veya değiştirilmez ve doğal formlarında tayin edilirler (Bosch vd., 2007).

a. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Temelli Biyosensörler

Yüzey plazmon rezonansı (SPR), enjekte edilen bir analit ile immobilize bir biyomolekül arasındaki bağlanma etkileşimlerini gerçek zamanlı olarak gözlemlemek için invazif olmayan, etiketsiz algılama sağlayan optik bir yöntem olup, reaksiyon sonucu meydana gelen değişiklikleri algılamak için yüzey plazmon dalgalarını (elektromanyetik dalgalar) kullanır. Kısaca, bir hedef analit biyosensör yüzeyindeki immobilize biyomolekül ile etkileşime girdiğinde, biyosensör yüzeyindeki kırılma indisinde bir değişiklik meydana

gelir. Bu değişiklik, yüzey plazmon dalgasının yayılma sabitinde bir varyasyon üretir ve rezonans açısındaki kayma ölçülür. Numunenin absorpsiyon spektrumunu ölçmek için bir spektrofotometre kullanılır. Yüzey plazmon rezonansının çalışma prensibi Resim 1.6'da gösterilmektedir (Mol ve Fischer, 2010).



Resim 1.6. Bir yüzey plazmon rezonansı (SPR) biyosensörünün kısımlarının ve çalışma prensibinin şematik gösterimi (Mol ve Fischer, 2010).

b. Floresans Temelli Biyosensörler

Floresans, özellikle enzimler ve antikorlar kullanıldığında, sinyal iletiminde yaygın olarak kullanılır. Bu yöntem, bir atom veya molekülde elektronik geçişleri başlatmak için harici bir ışık kaynağına (kısa dalga boylu ışık) ihtiyaç duyar ve daha sonra lüminesans (daha uzun dalga boylu ışık) üretir. Biyolojik algılama elemanlarının ve analitlerin çoğu içsel spektral özelliklere sahip olmadığından, floresans reaktifler algılama elemanlarına entegre edilerek (etiketlenerek) optik sinyal elde edilir (Bosch vd., 2007).

c. Kemilüminesans Temelli Biyosensörler

Lüminesans, elektronik olarak uyarılmış bir bileşikten temel duruma dönen ışık emisyonudur. Elektronik olarak uyarılmış bir durum oluşturulduğunda bazı kimyasal

reaksiyonlar sırasında kemilüminesans meydana gelir. Biyolüminesans, bazı canlı organizmalarda meydana gelen özel bir kemilüminesans durumudur ve genellikle enzimleri içerir. Kemilüminesans ölçümleri, foton üretim hızının izlenmesini içerir ve bu nedenle ışık yoğunluğu, reaksiyonun hızına bağlıdır. Sonuç olarak, ışık yoğunluğu, bir lüminesans reaksiyonunda yer alan sınırlayıcı bir reaktifin derişimi ile doğru orantılıdır. Modern enstrümantasyon ile ışık çok düşük bir seviyede ölçülebilir ve bu, ışık yayan reaksiyonlara dayalı çok duyarlı analitik yöntemlerin geliştirilmesine izin verir. Kemilüminesans biyosensörlerde, analit ve kemilüminesans türler ile işaretlenmiş immobilize biyomolekül arasındaki reaksiyon, ışık üretimi ile sonlanır ve yayılan bu ışık, bir foton çoğaltıcı tüp (PMT) kullanılarak tayin edilebilir. Duyarlı bir ışık dedektörüyle bağlantılı optik fiberler, bu tür ışık saçan reaksiyonları içeren biyosensörleri tasarlamak için uygun dönüştürücülerdir (Li vd., 2007).

1.4.2. Piezoelektrik Temelli Biyosensörler

Piezoelektrik temelli biyosensörler, uygulanan bir mekanik stres nedeniyle belirli malzemeler arasında yaratılan potansiyel farkı olarak tanımlanan piezoelektriğin (piezo sıkıştırma veya pres) ölçülmesini temel alır. Piezoelektrik biyosensör, biyoreseptör ve analit etkileşimleri nedeniyle salınan kristal rezonans frekansındaki değişikliklerin ölçülmesi ilkesine dayanan bir mikroeletromekanik sistemler (MEMS) sınıfıdır. Piezoelektrik MEMS biyosensörlerinde, dönüştürücü kuvars gibi piezoelektrik malzemedен yapılır ve biyoreseptör daha sonra doğal frekansta titreşen piezoelektrik malzeme üzerine kaplanır. Piezoelektrik malzemelerin simetri merkezi yoktur ve mekanik olarak gerildiklerinde bir elektrik sinyali üretirler. Kristal, biyoalgılayıcı malzeme ile kaplandığında gerçek frekans, kristalin ve kaplanan biyomalzemenin kütesine bağlıdır. Analitlerin bağlanmasından dolayı kütle arttığında, kristalin salınım frekansı değişir ve ortaya çıkan değişiklik elektriksel olarak ölçülebilir. Böylece analitin kütesinin hesaplanmasını mümkün kılar (Tichý vd., 2010). Kuvars kristali mikroterazi (QCM), kütle ölçümünde “piezoelektrik etkiye” dayanan bir piezoelektrik biyosensörün iyi bir örneğidir. Frekanstaki değişim ile kütledeki değişim arasındaki basit ilişki, QCM’in algılama uygulamalarında yaygın olarak kullanılmasını sağlar (Pandey ve Malhotra, 2019).

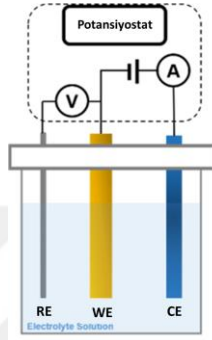
1.4.3. Kalorimetrik Biyosensörler

Tüm kimyasal ve biyolojik reaksiyonlar ısı alışverişini içerir (Xie vd., 1999). Kalorimetrik biyosensörlerin temel prensibi, biyotanıma elemanı ile bir analit arasındaki reaksiyon sonrası sıcaklıktaki değişikliklerin ölçülmesi ile ilgilidir. Sıcaklıktaki bu değişiklik, tüketilen reaktantların veya oluşan ürünlerin sayısı ile ilişkilendirilebilir. Başlangıçta kalorimetrik transdüksiyon enzim temelli biyosensörler için kullanılmış ve daha sonra DNA, hücre ve immünosensörlerde uygulama alanları bulmuştur (Kirchner vd., 2012).

1.4.4. Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler elektrokimyasal dönüştürücü olarak elektrotların kullanıldığı ve bir molekülün floresan olarak etiketlenmesini gerektirmeyen, etkileşim sırasında elektrokimyasal türler harcanırken ve oluşurken ortaya çıkan elektroaktif sinyalin ölçülmesi temeline dayanan algılama yöntemidir. Elektrokimyasal algılama genellikle bir çalışma elektrodu (WE), referans elektrodu (RE) ve bir karşıt elektrot (CE) kullanımını gerektirir. Elektrokimyasal biyosensörlerde reaksiyonlar elektrot yüzeyinde meydana geldiği için elektrot seçimi, biyosensörlerin genel performansında önemli bir role sahiptir. Ayrıca, biyosensörün algılama yeteneği, elektrot malzemesi, yüzey modifikasyonu veya yüzeyin boyutu gibi elektrot özelliklerine bağlıdır (Grieshaber vd., 2008). Başka bir deyişle birçok kimyasal reaksiyon, iyonları veya elektronları üretir veya tüketir, bu da çözeltinin elektriksel özelliklerinde bir miktar değişikliğe neden olur ve algılanabilir bir ölçüm parametresi olarak kullanılabilir. Elektrokimyasal biyosensörlerde transdüksiyon elemanı, biyokimyasal reaksiyonun gerçekleştiği çalışma elektrodudur. Yardımcı elektrot olarak da bilinen karşıt elektrot, elektrokimyasal hücredeki akım devresini kapatmak için kullanılan bir elektrottur. Genellikle platin, altın veya grafit gibi inert malzemelerden yapılır ve elektrokimyasal reaksiyona katılmaz (Thomas ve Henze, 2001). Akım, çalışma elektrodu ve karşıt elektrot arasında aktığından, elektrokimyasal kinetikte sınırlayıcı bir faktör olmaması

için karşıt elektrodun toplam yüzey alanı çalışma elektrodunun yüzey alanından daha yüksek olmalıdır. Referans elektrot, elektrokimyasal hücrede sabit bir potansiyel üretmek için kullanılır (György vd., 2013). En bilinen referans elektrot, arzu edilen ve sabit bir potansiyeli korumak için kullanılan gümüş/gümüş klorür (Ag/AgCl) elektrodudur (Resim 1.7)



Resim 1.7. Bir elektrokimya hücresi ve üçlü elektrot sistemi (A: Akım, V: Potansiyel, RE: Referans elektrot, WE: Çalışma elektrodu, CE: Karşıt elektrot) (Damiati ve Schuster, 2020).

Direnç, potansiyel, akım, kapasitans ve empedans gibi elektrokimyasal değişikliklerin tayinine bağlı olarak biyosensörlerde potansiyometrik, voltametrik, amperometrik, kondüktometrik ve impedimetrik yöntemler olarak sınıflandırma yapılmaktadır (Thévenot vd., 2001).

a. Potansiyometrik Yöntem

Potansiyometrik transdüksiyon ilk olarak 1969 yılında üre tayini için enzim temelli biyosensörün kullanıldığı yöntem olarak rapor edilmiştir (Guilbault ve Montalvo, 1969). Bu yöntemde biyoreseptör, analitik bir sinyal sağlamak için tanıma sürecini potansiyel bir sinyale dönüştürmektedir ve bu biyosensör tipinde ölçülen parametre, bir elektrokimyasal reaksiyonun indirgenme veya yükseltgenme potansiyelidir. Potansiyometrik biyosensör iki

elektrottan oluşur; biyotanıma sürecinden farklı bir potansiyel geliştirmek için kullanılan bir “gösterge elektrodu” ve genellikle sabit bir yarım hücre potansiyeli sağlayan gümüş/gümüş klorür gibi “referans” elektrottur. Ölçüm bu iki elektrot arasındaki potansiyel farkın birikmesine bağlıdır. Çalışma elektrodu bazen iyon seçici elektrot olarak adlandırılan geçirgen bir iletken zardan oluşur. Bir potansiyometrik cihazın potansiyelinin ölçümünün temeli, Nernst eşitliğine dayanır. Bu eşitlikte, ölçülen maddenin derişiminin logaritması ile potansiyel arasında doğru orantı bulunmaktadır.

$aA + ne^- \leftrightarrow bB$ reaksiyonu için Nernst eşitliği Eşitlik 1’de verildiği gibi tanımlanır. Burada E^0 standart redoks potansiyeli, R gaz sabiti, T mutlak sıcaklık, F Faraday sabiti, n reaksiyondaki alınan ve verilen elektronların toplam sayısı ve C_A ve C_B sırasıyla yükseltgenen ve indirgenen türlerin derişimidir.

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln\left(\frac{[C_A]^a}{[C_B]^b}\right)$$

Eşitlik 1

Potansiyometri, logaritmik bir derişim yanıtı ürettiğinden son derece küçük derişim değişikliklerinin algılanmasını mümkün kılar (Pandey ve Malhotra, 2019).

b. Voltametriik Yöntem

Voltametri, hem akım hem de potansiyelin ölçüldüğü, en yaygın elektrokimyasal analiz tekniğidir (Protti, 2001). Voltamogram adı verilen akım–potansiyel grafiği, kimyasal reaksiyon hakkında bilgi sağlar. Tepe akımlarının konumu analitlere özgüdür ve tepe akım yoğunluğu ise analitlerin derişimleriyle orantılıdır. Bu sebeple de voltametri, tek bir elektrokimyasal deneyde farklı tepe potansiyellerine sahip birden fazla bileşiği tayin edebilir ve böylece birden fazla analitin aynı anda tayin edilmesini mümkün kılar.

Voltametrik yöntemler arasında doğrusal tarama voltametri (LSV), döngüsel voltametri (CV), diferansiyel pulse voltametri (DPV) ve kare dalga voltametri (SWV) bulunur.

1. Doğrusal tarama voltametri: En basit tekniktir ve bu yöntemde çalışma elektrodunda potansiyel, hızla lineer olarak taranır ($20\text{--}100\text{ mVs}^{-1}$). Tarama, potansiyel uygulanmasından önce başlar ve sonrasında durur.

2. Döngüsel voltametri: Döngüsel voltametri (CV), redoks çiftlerinin davranışının teorik çalışılmasına ayrılmış bir tekniktir. Döngüsel voltametri voltagramları kapalı bir eğriden oluşur. Tersinir redoks çiftleri hem katodik hem de anodik pik zirveleri gösterirken tersinmez redoks sistemleri sadece bir akım pik zirvesi gösterir. Genellikle bu teknik zayıf duyarlılığı nedeniyle nicel analiz için kullanılmaz.

3. Diferansiyel puls voltametri: Bir dizi periyodik sabit potansiyel darbesinin doğrusal bir taramaya bindirilmesi sonucu tutarlı bir sinyal elde edilir. Bu şekilde akım, her potansiyel değişiminden hemen önce ölçülür ve akım farkı, potansiyelin bir fonksiyonu olarak kaydedilir. Diferansiyel puls voltametri tekniği çok duyarlıdır ve tayin sınırları $10\text{--}100\text{ }\mu\text{gL}^{-1}$ civarındadır (Pandey ve Malhotra, 2019).

4. Kare dalga voltametri: Kare dalga voltametrisinde çalışma elektrodu üzerine simetrik kare dalgalar şeklinde bir potansiyel uygulanmaktadır. Her bir kare dalga döngüsünde ileri yönde uygulanan pulsun ve geri yönde uygulanan pulsun bitişi olmak üzere iki kez akım ölçülür. Elde edilen net akım uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak grafiğe geçirildiğinde kare dalga voltamogramı elde edilir (Aydar, 2019).

c. Amperometrik Yöntem

Amperometrik biyosensörler, sabit bir potansiyel uygulanırken biyoreseptör ile bir elektroaktif türün elektrokimyasal yükseltgenmesi veya indirgenmesinden kaynaklanan akım değişimini ölçer. Akımdaki değişiklik, çözültideki türlerin derişimi ile doğru orantılıdır. Bir amperometrik biyosensörde üç elektrot tipinin tümü (WE, RE ve CE)

kullanılır. Analitin yükseltgenmesi veya indirgenmesi sırasında elektronlar analitten çalışma elektroduna aktarılır. Uygulanan sabit potansiyel, elektroaktif türleri elektron kazanmaya veya kaybetmeye zorlar ve pozitif bir potansiyel uygulandığında bir yükseltgenme reaksiyonu, negatif bir potansiyel uygulandığında ise indirgenme reaksiyonu meydana gelir (Dzyadevych vd., 2008).

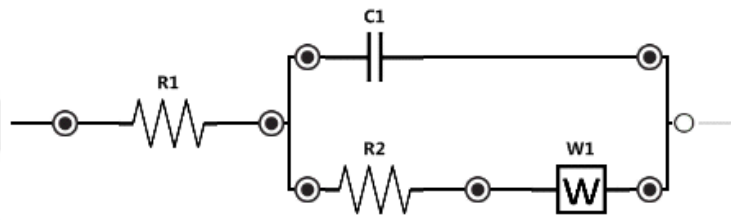
d. İletkenlik Biyosensörleri

İletkenlik biyosensörleri, iyonik türlerin derişimini değiştiren biyolojik tanıma reaksiyonlarını tayin etmektedir. Bu teknikte belirli bir mesafe veya bir ortamla ayrılmış iki elektrot kullanılarak çözeltilinin elektriksel iletkenliğindeki değişiklik ölçülmektedir (Pandey ve Malhotra, 2019). İletkenlik ölçümü için elektrot boyunca bir alternatif akım kaynağı kullanılır ve bu nedenle iyonik bileşimdeki değişiklik ölçülür. Ancak bu algılama yöntemi diğer elektrokimyasal yöntemlere kıyasla daha az duyarlıdır ve tampon kapasitesine verilen cevaba büyük ölçüde bağlıdır. Ancak şimdilerde, performansın ve duyarlılığın iyileştirilmesine yönelik bazı araştırmalar yapılmaktadır (Mahato ve Wang, 2021).

e. Empedans Spektroskopisi

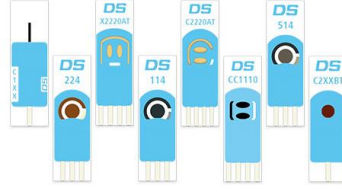
Bir devrenin, elektrik akımının akışına direnme yeteneği empedans olarak tanımlanır. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), elektrotların yapısının ve işlevsel çalışmasının karakterizasyonu için hızlı bir teknik olarak kabul edilir. Biyomalzemelerin elektrotlar üzerine immobilizasyonu, elektrotların kapasitansında ve arayüzey elektron transfer direncinde değişiklikler oluşturarak empedansta ölçülebilir değişikliklere neden olur. Bu nedenle, biyotanıma süreçleri tarafından üretilen arayüzey değişiklikleri, bu elektrokimyasal teknikle tayin edilebilir. Çalışma elektrodu, referans elektrot ve karşıt elektrottan oluşan üç elektrotlu sistemler EIS deneyleri için kullanılır. Sistemin ölçülen empedansı bir elektrik devresi kullanılarak modellenenebilir. EIS, redoks bileşiği ile elektrot

yüzeyi arasındaki elektron transfer direncinden, elektrot ve çözeltideki yüklü iyonlar arasındaki kapasitanstan, elektrotlar arasındaki çözeltinin direncinden ve redoks bileşiğinin elektrot yüzeyine difüzyon hızından kaynaklanan empedanstan oluşur. Şekil 1.4'de gösterildiği gibi R_1 , tipik olarak diğer bileşenlerden çok daha küçük olan elektrotlar arasındaki çözelti direncidir. R_2 , yük transfer direncidir. C , elektrot ile çözeltideki yüklü iyonlar arasındaki kapasitanstır. W , kütle transfer sınırlamalarının etkilerini açıklayan Warburg empedansı adı verilen bir elementtir (Bogomolova vd., 2009).



Şekil 1.4. Empedans ölçümlerinde kullanılan elektrik devresi (R_1 : Elektrotlar arasındaki çözelti direnci, R_2 : Yük transfer direnci, C : Elektrot ile çözeltideki yüklü iyonlar arasındaki kapasitans, W : Warburg empedansı).

Bahsedilen çeşitli sinyal çevirici türleri arasında elektrokimyasal sinyal çeviriciler, uygulama kolaylığı, düşük enstrümantasyon maliyeti, minyatürleşme ve otomasyon yeteneği nedeniyle en çok çalışılanıdır. Ek olarak, 1990'larda ortaya çıkan perde baskılı elektrotlar (Screen-Printed Electrodes, SPE'ler) güvenilirlikleri, hızlı ve yeniden üretilebilirlikleri ile düşük maliyetleri nedeniyle, bu ilgiye büyük ölçüde katkıda bulunmuştur (Resim 1.8). SPE'ler farklı şekillerde ve farklı malzemeler ile tasarlanabilen ve enzimler, antikorlar, DNA gibi çeşitli biyolojik materyallerle modifiye edilebilen elektrot sistemleridir (Arduini vd., 2016).



Resim 1.8. Farklı bileşenler ve şekillerde tasarlanmış perde baskılı elektrotlar (<https://www.metrohm.com/en/products/electrochemistry/electrochemistry-electrodes/>, [Erişim Tarihi: 16/02/2022]).

1.5. İdeal Bir Biyosensörün Sahip Olması Gereken Özellikler ve Biyosensörlerin Uygulama Alanları

1. Doğrusal Aralık: Biyosensör yanıtının doğrusal olarak değiştiği analit derişimlerinin aralığı olarak tanımlanır. Doğrusal kalibrasyon eğrisi, analitin çeşitli derişimleri için elde edilen mevcut yanıtlarla birlikte çizilerek hazırlanır ve aralığın geniş olması beklenir.

2. Tayin Sınırı: Tayin sınırı veya tayin edilebilir en düşük yanıt, bir maddenin, kontrol sinyaliyle ayırt edilebilen en düşük miktardır. Tasarlanan bir biyosensörün tayin sınırının belirli bir derişim değerinin altında olması gerekmektedir.

3. Duyarlık: Genellikle, Y ekseninde gözlenen akıma karşı X ekseninde belirli analitin derişimlerinin çizilmesiyle elde edilen kalibrasyon eğrisinin eğiminden hesaplanır. Eğimin yüksek olması, biyosensörün yüksek duyarlılığını temsil eder.

4. Seçicilik: Birçok analitin tayini sırasında ölçümü engelleyebilecek, analitle bir arada bulunan ve girişim etkisi olabilecek çeşitli substratların etkileri, uygun membranların uygulanmasıyla sınırlandırılabilir. Analit derişiminin aralığı, biyolojik reseptörün özgüllüğü ve dönüştürücünün seçimi seçicilik için önemlidir.

5. Tekrarlanabilirlik: Tekrarlanabilirlik elektrodun aynı koşullar altında arka arkaya yapılan ölçümlerinin sonuçlarındaki sapmanın bir ölçüsüdür ve bu değerin küçük olması ideal bir biyosensörden beklenen bir özelliktir.

6. Kararlılık: Biyosensörün çalışma kararlılığı, sensör geometrisine ve hazırlama yöntemine bağlı olarak önemli ölçüde değişebilir. Elektrot kararlılığının yüksek olması ideal biyosensörler için gereklidir. Kararlılık, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır.

7. Yanıt süresi: Biyosensörün yanıt süresi, kararlı hal yanıt süresi ve geçici yanıt süresi olarak sınıflandırılır. Biyosensörün kararlı durum yanıtının %95'ine ulaşmak için gereken süre, kararlı durum yanıt süresi olarak bilinir. Analitin ölçüm hücresine eklenmesinden sonra kolayca belirlenir. Geçici tepki süresi, analit ilavesini takiben maksimum değerine ulaşmak için çıkış sinyalinin ilk türevine karşılık gelir. Her ikisi de moleküler tanıma sisteminin analite ve aktivitesine bağlıdır, yani aktivite ne kadar yüksekse yanıt süresi o kadar kısadır.

8. Kullanım Ömrü: Biyosensörün kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli unsur, biyolojik çeviricinin aktivitesindeki azalmadır. Bu durum ayrıca biyosensörün, kalibrasyon sıklığı, kararlılık ve tekrarlanabilirlik gibi diğer özelliklerini de etkilemektedir.

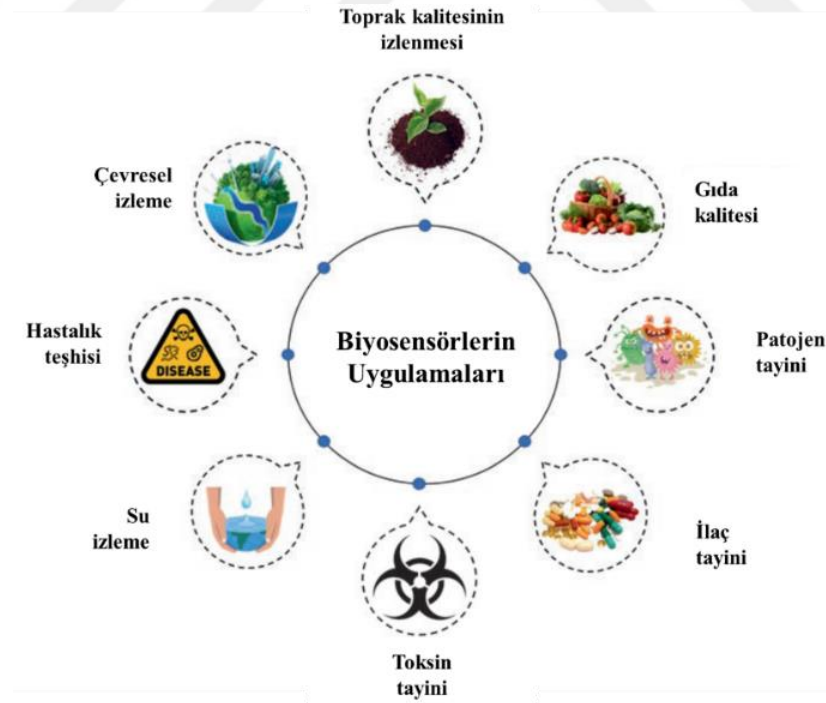
9. Kalibrasyon Gereksinimi: İdeal bir biyosensörün hiç kalibrasyona gerek duymaması ya da kalibrasyon ihtiyacına olabildiğince az gerek duyması istenir.

10. Basitlik ve Ucuzluk: Tasarımı basit ve ucuz, kullanımı kolay biyosensörler ideal biyosensörlerdir. Bu nedenle ilk biyosensörlerdeki karmaşık ve pahalı olan yapılar daha sonra basitleştirilmiş ve olabildiğince maliyeti düşürülmüştür.

11. Küçültülebilirlik ve sterilize edilebilirlik: Elektrotların sterilize edilebilmesi ve boyutlarının küçültülmesi biyosensör tasarımında önemlidir. Buna karşın, biyosensör yapısına giren biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, sterilizasyonu kısıtlayan en önemli parametredir.

Küresel nüfustaki artışla birlikte, çeşitli patojenlerin neden olduğu, yaşamı tehdit eden birçok yeni hastalık ortaya çıkmıştır. Bu tür hastalıklardan kaynaklanan ölümlerin bir kısmı öncelikle teşhisin konulmasındaki gecikme, ilaçların yan etkileri veya tedavi için gerekli

olan materyallerin eksikliğinden kaynaklanmaktadır (Singh vd., 2014). Ayrıca, endüstride kimyasalların aşırı kullanımı sebebiyle çevre kirleticilerinin artması ölüm oranlarında artışa neden olmaktadır. Bu nedenle, kirleticilerin ve patojenlerin salınımını izlemek ve kontrol etmek için hızlı algılama yöntemlerinin geliştirilmesi oldukça önemlidir (Malhotra ve Chaubey, 2003). Biyosensörlerin, karmaşık biyolojik etkileşimlerin hızlı, doğru ve uygun ölçümünü sağlayabilen gelişmiş cihazlar olmaları ve bakım noktasında yerinde teşhis için uzman olmayanlar tarafından kullanılacak kullanıcı dostu ve taşınabilir cihazlar olmaları, biyosensörleri tıbbi teşhisler, çevresel izleme ve gıda endüstrileri gibi çeşitli alanlardaki uygulamalar için geliştirilebilir kılmaktadır (Turner, 2013; Griffiths ve Hall, 1993). Biyosensörlerin uygulama alanlarını özetleyen şematik gösterim Şekil 1.5’de gösterilmektedir. Çeşitli analitlerin tayini için biyosensörlerin kullanılması, test hızını artırabilir ve böylece otomasyon ve tanısal test maliyetlerinin azalması sağlanabilir (Rasooly ve Jacobson, 2006). Ayrıca tüketici talebiyle birlikte artan sağlık maliyetlerini karşılamak için seri üretime uygun, düşük maliyetli, giyilebilir, entegre ve daha seçici biyosensörlere ihtiyaç vardır.



Şekil 1.5. Biyosensörlerin uygulama alanları (Tetyana vd., 2021).

1.6. Nanoteknolojinin Tanımı ve Tarihçesi

Nanoteknolojinin başlangıcı Amerikalı fizikçi ve Nobel Ödülü sahibi Richard Feynman'ın teorilerine atfedilir. 1959'da Feynman, Amerikan Fizik Derneği'nin yıllık toplantısında "*Alta Çok Yer Var (There is Plenty of Room at the Bottom)*" başlıklı bir konferans vermiştir. Sunumu sırasında "*Britannica Ansiklopedisi'nin 24 cildinin tamamını neden bir toplu iğnenin başına yazamıyoruz?*" gibi ve benzeri sorulardan yararlanarak, gelecekte doğa kanunlarına karşı gelmeden "*atom ölçeğinde şeyleri manipüle edip kontrol edebileceğimizi*" ve "*atomları istediğimiz gibi düzenleyebileceğimizi*" önermiştir (Minoli, 2005). Feynman'ın düşüncesinden yola çıkarak ilerleyen Norio Taniguchi, 1974'te ilk olarak "*nanoteknoloji*" tanımını yapmıştır. 1981'de Eric Drexler yazdığı "*Moleküler Mühendislik: Moleküler manipülasyon için genel kapasitelerin geliştirilmesine bir yaklaşım*" isimli makale ile moleküler nanoteknolojinin öncüsü olmuştur. Eric Drexler, moleküler nanoteknoloji fikrinin arkasındaki itici güç olarak bilinir, konuyu kendisinden önceki herkesten çok daha derinlemesine araştırmıştır ve kendisi "*nanoteknolojinin kurucu babası*" olarak kabul edilir (Drexler, 1981). Drexler, 1986'da "*Yaratılış Motorları: Nanoteknolojinin Yaklaşan Çağı*" kitabını yazmıştır. Drexler'in çalışmaları, bilim insanlarına nanoteknolojinin üretim sistemlerini ve kullanım alanlarını daha da geliştirmek için kimyasal bağları ve molekülleri keşfetme konusunda ilham vermiştir. Nanoteknoloji devriminin başlaması için en önemli kilometre taşlarından biri, Nobel Ödülü sahibi fizikçiler Gerd Binnig ve Heinrich Rohrer tarafından 1981'de Taramalı Tünelleme Mikroskopunun icadı olmuştur (Binnig ve Rohrer, 2000). Atomların aletler kullanılarak manipüle edilebileceğine ve doğru bir şekilde konumlandırılabilmesine dair ilk kanıt, 1989 yılında IBM (Uluslararası İş Makineleri) bilim insanlarının 35 ksenon atomunu manipüle etmek ve IBM harflerini oluşturmak için bir Taramalı Tünelleme Mikroskobu kullanmasıdır. Bu gelişmeler 1986'da fullerenin ve birkaç yıl sonra da karbon nanotüplerin keşfine neden olmuştur. Daha sonra yarı iletken nanokristallerin sentezi ve özelliklerinin incelenmesi ve atomik kuvvet mikroskopunun (AFM) icadı nanoteknoloji alanına çok önemli katkılar sağlamıştır (Toumey, 2010).

Nano kelimesi Yunanca'da cüce anlamına gelen *nanos* sözcüğünden gelmektedir ve nanoölçek 1 ve 100 nanometre arasında değişmektedir. Nanometre, metrenin milyarda birini ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) ifade etmektedir. Nanoteknoloji, elektronikten sağlık hizmetlerine kadar çok

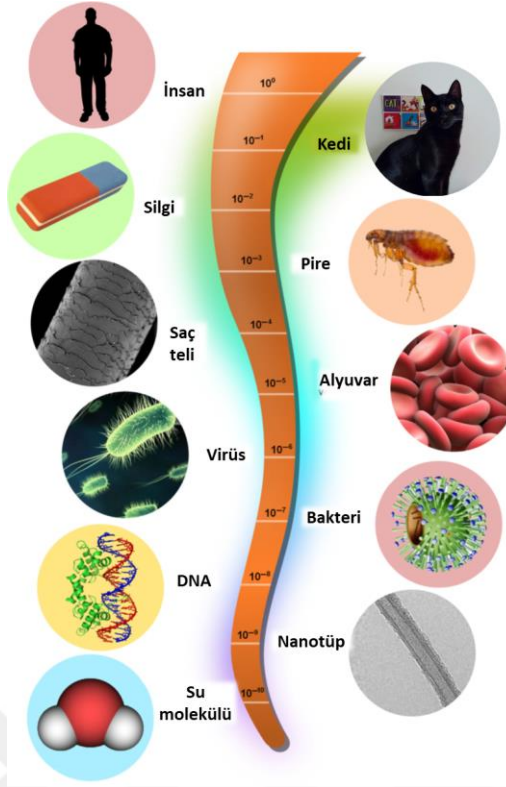
çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılan nano ölçek düzeyinde yapıların tasarımını, üretimini, geliştirilmesini ve uygulamasını tanımlamak için kullanılan genel bir terimdir. Moleküler seviyedeki manipülasyon, makro ölçekte mevcut olmayan fiziksel, kimyasal, manyetik ve yapısal özelliklerle sonuçlanır. Bununla birlikte nanomalzemeler yeni değildir. Çözünebilir altının MÖ 4. ve 5. yüzyıllarda Çin ve Mısır'da kullanıldığı muhtemeldir. Antik Roma'da kullanılmış bir goblet olan *Lycurgus* kupası MS 4. yüzyılda üretilmiştir. Ne gibi bir teknolojiye sahip olduğunun anlaşılması için ışığa tutulması gereken kupa önden aydınlatıldığında yeşil, arkadan aydınlatıldığında ise kırmızı rengini almaktadır. 1950'de bulunan kupanın sırrı ancak 1990'da çözülebilmıştır. Yapılan mikroskop altı araştırmalarla kupadaki camın altın ve gümüş nanopartikülleri içerdiği görülmüştür. *Lycurgus* kupası en eski sentetik nanokompozitlerden biri olarak kabul edilmektedir (Barber ve Freestone, 1990; Mansoori ve Soelaiman, 2005).

Nanoteknoloji için birçok tanımlama mevcut olsa da Ulusal Nanoteknoloji Girişimi (NNI), araştırma, geliştirme ve mühendislik alanlarını birleştiren nanoteknolojinin aşağıdaki maddelerin tümünü içermesi gerektiğini belirtmektedir:

1. Yaklaşık 1–100 nm ölçeğinde atomik, moleküler veya makromoleküler seviyelerde araştırma ve teknoloji geliştirmek.
2. Küçük boyutlarda olmaları nedeniyle yeni özelliklere ve işlevlere sahip yapılar, cihazlar ve sistemler oluşturmak ve kullanmak.
3. Atom ölçeğinde kontrol veya manipüle etme yeteneğine sahip olmak (<https://www.nano.gov>, [Erişim tarihi: 19/02/2022]).

Bu nedenle nanoteknoloji, malzemelerin atomik ölçekte oluşturulması ve hassas bir şekilde işlenmesi olarak da tanımlanabilir ve nanoteknoloji, nano ölçekteki süreçleri kontrol eden nanobilimin uygulanmasıdır (Mansoori ve Soelaiman, 2005).

Resim 1.9'da farklı ölçeklerde nesnelerin ve doğal organizmaların boyutlarının karşılaştırılması verilmiştir.



Resim 1.9. Farklı nesnelerin ve doğal organizmaların boyutları (Loos, 2015).

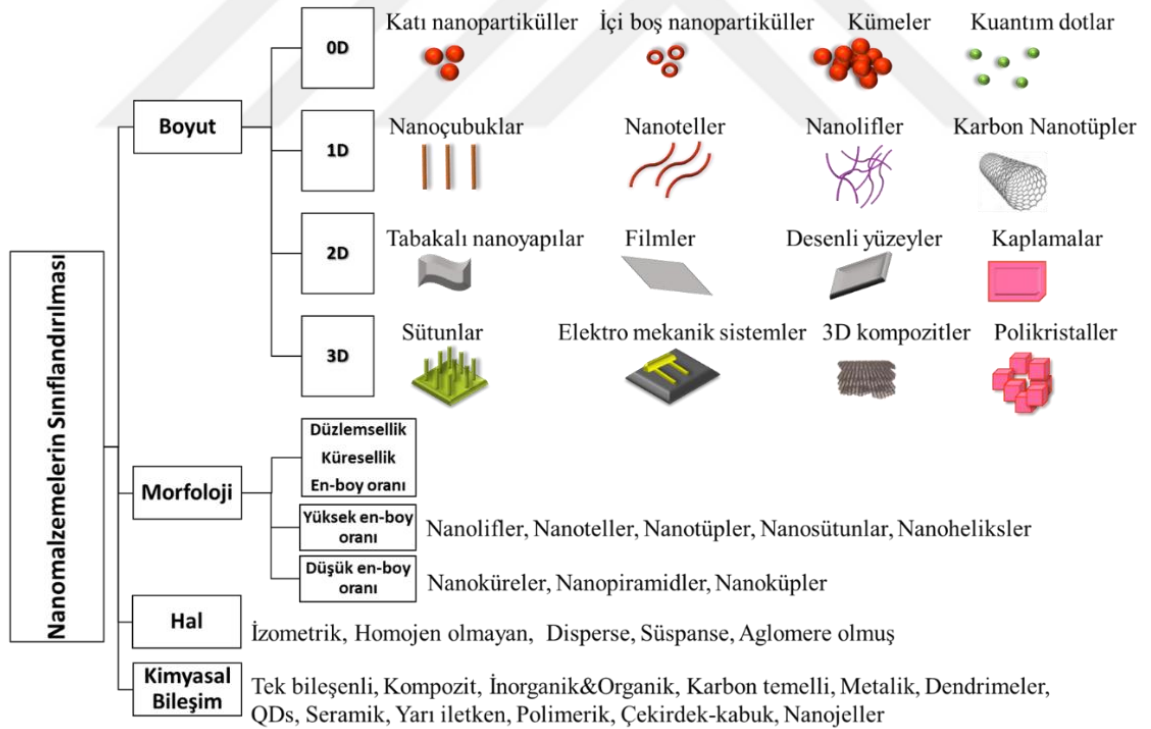
1.6.1. Nanomalzemeler ve Nanomalzemelerin Biyosensörlerde Kullanımı

Nanomalzemeler, boyut, şekil, yüzey alanı ve reaktivite dahil olmak üzere birçok özellik bakımından büyük ölçekli malzemelerden farklıdır ve birçok uygulamada mükemmel performanslarının ana nedeni budur. Nanomateryal bazlı ürünler artık sensörler, elektronik ürünler, boyalar, kozmetikler, enerji depolama ve dönüştürme cihazları, biyomedikal görüntüleme vb. dahil olmak üzere ticari pazarlara girmektedir. Nanoteknoloji alanı son on yılda eşi görülmemiş bir hızla büyümektedir. Boyutları, şekilleri ve özellikleri üzerinde daha iyi kontrol sağlanan nanomalzemelerin sentezinde önemli ilerlemeler kaydedilmekle birlikte yeni malzemelerin geliştirilmesi ve yeni sentez yöntemlerinin bulunması büyük bir araştırma konusudur (Sajid, 2021). Nanomalzemelerin üretimi iki kategoriye ayrılır; yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya yöntemleri (Miller vd., 2004).

Bugüne kadar nanoteknolojinin en yaygın uygulaması olan yukarıdan aşağıya (büyükten küçüğe) yönteminde yapılar, nano ölçekte küçültülür. Büyük bir materyalin (bulk

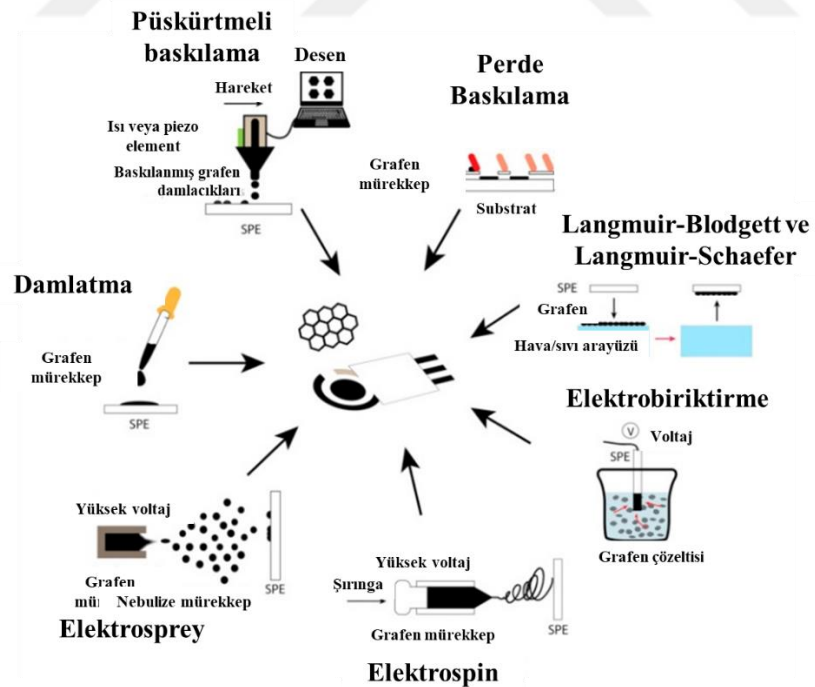
materyal) mekanik ve kimyasal işlemlerle enerji harcayarak, çözgüde ultrasonifikasyon ve mekanik aşındırma gibi yöntemlerle küçültülerek nano boyuta getirilmesi şeklindedir. Bu kategoride en çok kullanılan işlemlerden biri, yarı iletken silikon gibi malzemelerin elektronik cihazlar için işlendiği litografidir. Aşağıdan yukarıya (küçükten büyüğe) yönteminde ise atomlar veya moleküller gibi nanometrik yapılardan, kendi kendine bir araya gelme veya bir araya getirilme süreciyle daha büyük yapılar oluşturulmaktadır. Bu kategori “gerçek” nanoteknoloji olarak kabul edilir, minyatürleştirme sınırlarının ötesindedir ve maddenin aşırı hassasiyetle kontrolüne izin verir. Bu kategoride kullanılan üretim yöntemlerinden bazıları sol-jel, kimyasal buhar biriktirme ve lazer pirolizdir. Bu yöntemlerden bazıları karbon nanotüplerin (CNT'ler) üretimi için kullanılmaktadır.

Nanomalzemeler şekillerine, organik ve inorganik olarak bileşimlerine göre sınıflandırıldığı gibi alternatif bir sınıflandırma da boyutlarına göre sınıflandırmadır. Nanomateryallerin farklı niteliklerine göre sınıflandırıldığı bir şema Şekil 1.6’da görülmektedir.



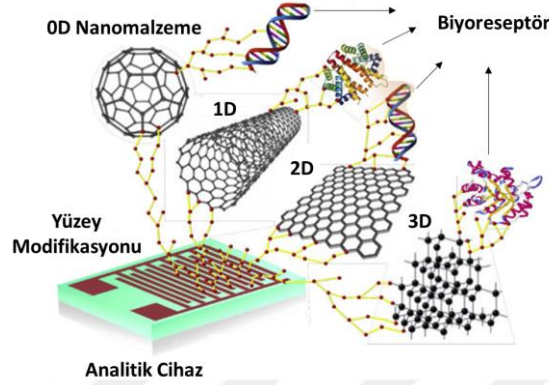
Şekil 1.6. Nanomalzemelerin farklı kriterlere göre sınıflandırılmasının şematik gösterimi (Saleh, 2020).

Nanomalzemeleri geliştirmedeki artan ve heyecan verici stratejiler, biyosensörler alanındaki araştırma faaliyetlerini büyük ölçüde etkilemiştir. Nanomalzemeler, gelişmiş elektrokatalitik aktivite sağlama ve elektrot yüzeyindeki kirlenmeyi en aza indirme gibi avantajları biyosensörlerin tasarlanmasındaki kullanımlarını artırmıştır. Nanomalzemeler ile modifiye edilmiş perde baskılı elektrotlara dayalı biyosensörler literatürde geniş çapta bildirilmiştir. Modifikasyon yöntemleri, manuel veya mürekkep püskürtmeli biriktirme, perde baskılı elektrotların baskısı sırasında mürekkebe nanomalzemenin eklenmesi, elektrodepozisyon, Langmuir Blodgett film yaklaşımı, elektro-sprey ve damlatma gibi tekniklerin kullanımını kapsar (Resim 1.10). Bu yöntemler arasında en çok kullanılan yöntem damlatma yöntemidir ve düşük maliyet, uygulama kolaylığı ve kolay karakterizasyon gibi avantajları olmasının yanında fazladan enstrümantasyon kullanımını gerektirmez. Nanomalzeme ile modifiye edilmiş biyosensörlerin elektrokimyasal davranışını ve nanomalzemenin, biyosensörün analitik özelliklerini nasıl etkilediğini anlamak için döngüsel voltametri, amperometri ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi kullanılmaktadır (Arduini vd., 2016).



Resim 1.10. Elektrotların fabrikasyonunda kullanılan yöntemler (Arduini vd., 2016).

Nanomalzemeler biyosensör kullanımlarında boyutlarına göre sıfır boyutlu (0D), tek boyutlu (1D), iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) olarak sınıflandırılır ve biyosensörler için farklı roller oynarlar (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Biyosensörlerde boyutlarına göre nanomalzemeler.

1.6.1.1. Sıfır Boyutlu (0D) Nanomalzemeler

Sıfır boyutlu (0D) nanomalzemeler nanotoz veya nanodispersiyon şeklinde birbirinden izole halde bulunan malzemelerdir. 0D nanomalzemelerden bazıları; homojen partiküller halinde bulunan kuantum dotlar, nanoküreler, fullerenler, çekirdek-kabuk nanopartiküllerdir (Sajanlal vd., 2011). Bunların arasından özellikle nanopartiküller (NP'ler) biyosensör imalatında önemli bir rol oynamaktadır. Soy metal nanopartiküller, alaşım nanopartiküller ve metal oksit nanopartiküller, farklı bileşenler ve morfolojileri nedeniyle elektroanalitik biyosensörler için farklı avantajlar sunmaktadır. Soy metal nanopartiküller, iyi katalitik performansları ve biyoyumlulukları nedeniyle elektroanalitik biyosensörlerde sıklıkla uygulanmaktadır. Ancak Cu_2O , Co_3O_4 ve Fe_3O_4 gibi metal oksit nanopartiküller, soy metal nanopartiküllere göre cihaz tasarımının maliyetini düşürmede önemli avantajlar sağlamaktadır (Liu vd., 2011).

Manyetik nanopartiküller, süper manyetizma özellikleri, geniş yüzey alanı ve yüksek kütle aktarımına sahip olmaları nedeniyle atık su arıtma, hastalık tedavisi, hastalık teşhisi (manyetik rezonans görüntüleme), hücre etiketleme ve görüntüleme, doku mühendisliği, sensörler, biyosensörler ve diğer tanıma sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Manyetik nanopartiküller, klinik, gıda ve çevresel uygulamalarda çeşitli analitlerin tayini için sensörlerin ve biyosensörlerin duyarlılığını ve kararlılığını artırmak için kullanılmıştır (Rocha-Santos, 2014).

Geçtiğimiz birkaç yılda biyosensör tasarımında, demir oksitler (Fe_2O_3 ve Fe_3O_4); mangan, kobalt, nikel ve magnezyum ferritleri; FePt, kobalt, demir, nikel, CoPt ve FeCo partikülleri ve çekirdek-kabuk nanopartiküllerin $Fe_3O_4@Ag$, $Fe_3O_4@Au$, FePt@Ag ve CdS-FePt heterodimerleri gibi çok işlevli manyetik nanopartiküller sentezlenmiştir. Manyetik nanopartiküller fiziksel yöntemlerle (örneğin, gaz fazı biriktirme ve elektron ışını litografisi), kimyasal yöntemlerle (örneğin, birlikte çökeltme, yüksek sıcaklıkta termal ayrışma ve/veya indirgeme, sol-jel sentezi, akış enjeksiyon sentezi, oksidasyon yöntemi, elektrokimyasal yöntem, aerosol/buhar fazı yöntemi, süper kritik akışkan yöntemi ve nanoreaktörler kullanılarak sentez) ve mikrobiyal yöntemlerle sentezlenebilir.

Süperparamanyetik özelliği, antikorlar ve enzimlerle biyoyumluluğu ve hazırlanma kolaylığı nedeniyle, Fe_3O_4 biyosensör geliştirmede en çok kullanılan manyetik nanopartiküllerden biridir. Bununla birlikte, Fe_3O_4 manyetik dipolar çekimi ve yüzey alanının hacme olan geniş oranından dolayı, biyolojik çözeltilere maruz kaldığında çözeltilerde kümelenmeye neden olabilir. Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerin fonksiyonelleştirilmesi, bu sorunun üstesinden gelebilir ve ayrıca biyoyumluluğu artırabilir. Çekirdek-kabuk yapısındaki Au- Fe_3O_4 , Au- $Fe_3O_4@SiO_2$, $Fe_3O_4@SiO_2$, Ag- Fe_3O_4 ve $Fe_3O_4@SiO_2/MWCNT$ kompozit nanopartiküller gibi çok çeşitli ve sayıdaki fonksiyonelleştirilmiş manyetik nanopartiküller, biyosensör tasarımında kullanılmıştır. Bu şekilde, manyetik nanopartikülün bir başka yapı içerisinde kapsüllendiği bir çekirdek-kabuk stratejisi kullanmak biyoyumluluk, monodispersite, kararlılık ve biyomateryal kullanımı durumunda gerekli olabilecek -COOH gibi gruplar için fonksiyonelleştirme imkanı sağlar (Rocha-Santos, 2014). Özellikle bu amaçla, gümüşün (Ag) metaller arasındaki en iyi iletken olduğu bilgisiyle (Kraus, 1922) Ag nanopartiküller, biyosensörlerdeki altın nanopartiküllerden daha verimli şekilde elektron transferini kolaylaştırabilir (Ren vd., 2005).

1.6.1.2. Tek Boyutlu (1D) Nanomalzemeler

Tek boyutlu (1D) nanomalzemelere örnekler ise nanoçubuklar, nanoteller ve nanotüplerdir. Bu nanomalzemeler nanoelektronikte, nanosistemlerde, nanokompozitlerde, nanoaygıtlarda, alternatif enerji kaynaklarında ve ulusal güvenlik alanlarında oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Sajanlal vd., 2011).

Biyoalgılama alanında yapılan son çalışmalar 1D nano yapılar arasında özellikle nanotellerin oldukça ilgi çekici olduğunu göstermektedir. Nanotellerin temel avantajı yüksek duyarlıktır ve yüzeyinde gerçekleştirilecek işlemlerle kolayca değiştirilebilir özellikleridir. Bu nedenle biyosensörler, numunede çok küçük miktarlarda hedef molekül bulunduğu bile sinyal üretebilir. Nanotellerin diğer bir avantajı, düşük maliyet ile tek bir nanotel yapısında birden fazla materyalin segment olarak kullanılmasıdır. Bu, sinyal artırımıyla birlikte çoklu algılama imkanı da sağlamaktadır. Bu özellikler nanotelleri, biyosensör cihazlarında kullanıldığında muadilleri olan karbon nanotüplere (CNT) göre daha avantajlı kılmaktadır. Sentez sırasında koşullar değiştirilerek, malzeme özellikleri daha hassas bir şekilde kontrol edilebilir ve nanotellerin dışında doğal olarak oluşan oksit tabakası fonksiyonelleştirme ile önlenebilir. Co veya Ni gibi ferromanyetik elementlerden yapılmış kalıp fabrikasyon nanotellerin manyetik özelliklerine geniş en-boy oranlarından dolayı şekil anizotropisi (eş yönsüzlük) hakimdir. Sahip oldukları yüksek manyetizasyon yetenekleri, nanotellerin sulu çözeltilerini de yüksek derecede yönlendirilebilir ve küçük ve harici manyetik alanlarla dahi kolayca manipüle edilebilir hale getirir. Ek olarak, nanoteller fonksiyonelleştirilebilir ve modifiye edilebilirler (Hernández-Vélez, 2006).

Genel olarak, bu tür nanoyapılar iki yöntemle hazırlanabilir: İlki, küçük boyutlu yapıların kendiliğinden birleşerek daha büyük yapıları oluşturduğu "aşağıdan yukarıya" yaklaşımıdır. Diğeri, çok işlevli nano ölçekli yapılar üretmek için büyük sistemlerin daha küçük boyutlara indirildiği "yukarıdan aşağıya" yaklaşımıdır. 1D nano yapılar oluşturmak için iyi bir yöntem boyutların, özelliklerin ve morfolojinin eşzamanlı kontrolünü sağlamalıdır (Yogeswaran ve Chen, 2008). Son yıllarda metalik nanoteller kalıp-yönelmeli elektro-biriktirme, kimyasal metotlar veya kimyasal buhar biriktirmesi gibi birçok teknik kullanılarak üretilmektedir. Nanotellerin kalıp-yönelmeli elektro-birikimi, sadece birikim parametreleri değiştirilerek nanotellerin boyut, çap ve yoğunluklarının kontrolünü mümkün

kıldığı için günümüzde oldukça ilgi çekmektedir. Ayrıca bu yöntem kompleks enstrümanların kullanımını da gerektirmemektedir (Garcia vd., 2014).

1.6.1.3. İki Boyutlu (2D) Nanomalzemeler

2D malzemeler nano boyuttaki film ve kaplamalardır. Günümüzde 2D malzemeler giderek önem kazanmakta ve kullanım alanları artmaktadır. 2D malzemelerin keşfi grafen ile başlamıştır ve sonrasında bor nitrür ve molibden disülfür gibi birçok malzeme bulunmuştur. Novoselov ve çalışma arkadaşlarının (2004) grafitten grafeni mekanik olarak elde etmesinden bu yana 2D nanomalzemeler, giderek artan akademik ve endüstriyel ilgiyi çekmektedir (Sajanlal vd., 2011).

Grafen, yüksek mekanik mukavemet, yüksek termal kararlılık ve yüksek iletkenlik gibi olağandışı özellikler gösteren tek atom kalınlığında ince bir tabakadır. Dahası grafenin fiziksel, optik ve elektronik özelliklerinin benzeri görülmemiş kombinasyonu, grafen benzeri 2D nanomalzemeler olarak adlandırılan benzer katmanlı yapı özelliklerine sahip diğer 2D nanomalzemelerin keşfini teşvik etmiştir. 2D nanomalzemelerin olağanüstü özelliklerinden hareketle, mekanik soyma, kimyasal buhar biriktirme (CVD), kimyasal sentez vb. gibi çeşitli hazırlama yöntemleri geliştirilmiştir. Bu 2D nanomalzemeler, özellikle yüksek ve özgül yüzey alanları ve kolay fonksiyonelleştirilme gibi özellikleri nedeniyle biyosensörler alanında çok çeşitli umut verici uygulamalara sahip olmuştur. 2D geçiş metal dikalkojenit (GMDK) nanoyapılar çevresel ve biyolojik analizlerde, biyotıpta, elektronik cihazlarda ve hidrojen üretiminde yaygın olarak uygulanmıştır. (Li vd., 2016a).

1.6.1.4. Üç Boyutlu (3D) Nanomalzemeler

3D nanomalzemeler lif yapılı, çok katmanlı ve polikristal malzemelerdir. 3D nanomalzemeler son derece geniş yüzey alanı/hacim oranına sahip olmaları ve daha önce

diğer boyutlu nanomalzemelerde de vurgulandığı gibi fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak dikkate değer özellikleri ve fonksiyonelleştirilebilmeleri, biyoyumlulukları ve materyal bileşimindeki çeşitlilikleri nedeniyle doku mühendisliği, ilaç salımı ve biyosensör uygulamalarında kapsamlı bir şekilde çalışılmakta ve kullanılmaktadır (Sajanlal vd., 2011).

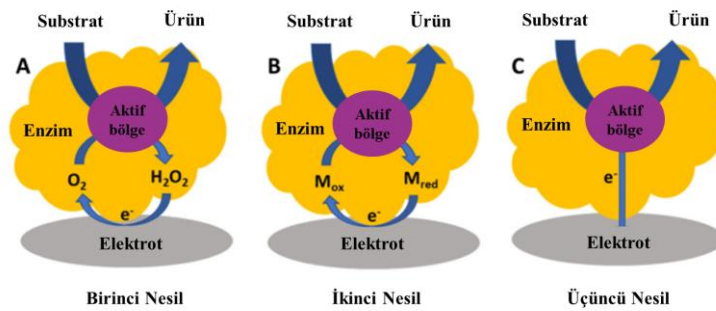
1.7. Enzimler ve Enzim Temelli Biyosensörler

Enzimler, her tür organizmanın hücre sel yolaklarındaki metabolik biyoreaksiyonların biyokatalizini gerçekleştiren karmaşık biyomoleküllerdir. Enzimler, reaksiyonlar tarafından kalıcı olarak değiştirilmeden veya tüketilmeden ayrıca tepkenler ve ürünler arasındaki kimyasal dengeyi bozmadan tepkimelerin aktivasyon enerjilerini düşürerek tepkime hızlarını arttırlar. Modern analitik bilimde enzimler biyotanıma elemanı olarak elektroanalizde benzersiz ve büyüleyici özelliklerinden dolayı bir kilometre taşı oluşturur (Rodriguez-Delgado vd., 2015).

En yaygın olan glukoz biyosensörünün dışında laktat, piruvat, kolesterol, etanol, kreatinin, glutamat, kolin, fenolik bileşikler ve asetilkolini tanımaya yönelik biyosensörler de sadece klinik değil aynı zamanda gıda ve çevre alanlarındaki uygulamalara yönelik ticari olarak mevcuttur. Perde baskılı elektrotların daha fazla geliştirilmesiyle enzim temelli biyosensörler laboratuvar uygulamalarından sonra marketlerde uygulama bulmaya başlamıştır (Arduini vd., 2016).

Enzimatik biyosensörlerin sınıflandırılması iletilen sinyale bağlı olarak optik, piezoelektrik, termal/kalorimetrik veya elektrokimyasal olabilir. Bunların arasında elektrokimyasal enzim temelli biyosensörler, enzimlerin yüksek katalitik aktivitesi, seçiciliği ve ayrıca saflaştırılmış enzimlerin ticari olarak temin edilebilirliği nedeniyle en gelişmiş ve ticari olarak başarılı biyoanalitik cihazlardandır. Elektrokimyasal enzim temelli biyosensörlerin prensibi, genelde enzimatik kataliz yoluyla elektronların açığa çıkmasına dayanır. Hedef analit, aktif elektrot yüzeyinde meydana gelen reaksiyonda yer alır ve bir potansiyel oluşturmak için açığa çıkan elektronlar, ölçülebilir bir sinyal vermek için referans elektrottan geçer (Rodriguez-Delgado, 2015). Bu cihaz türlerindeki ana prensip, bir redoks

enzimi ile bir elektrot arasındaki iletişim olup, Resim 1.11’de ana hatları verilen geleneksel üç ana elektron transferi yolu şeklindedir. Yani enzimatik biyosensörler üç nesil olarak sınıflandırılabilir. Birinci nesil enzimatik biyosensörler, elektron donörü olarak oksijeni kullanır ve azalan oksijeni veya serbest kalan H_2O_2 'i algılar. Bu gruba giren oksidazlar arasında kolin oksidaz, piruvat oksidaz, laktat oksidaz ve glutamat oksidaz bulunur. Kolay uygulanabilirlikleri, iyi stabilite ve duyarlılıkları nedeniyle enzimatik biyosensörler için temel olan uygulamadır. İkinci nesil biyosensörlerde bir aracı (ferrosen türevleri, ferrosiyaniür vb.) kullanır ve bu nedenle oksijenden bağımsızdır. Aracı, immobilizasyonunun zayıf stabilitesi ve olası toksisitesi nedeniyle *in vivo* uygulamalarda daha az kullanılır. Üçüncü nesil biyosensörler, enzimin redoks merkezi ile elektrot arasında doğrudan elektron aktarımının gerçekleştiği biyo-elektrokatalize dayanır. Aracısız olmaları bakımından ilk iki nesilden daha üstündür ve bu nedenle doğrudan elektron transfer (DET) biyosensörleri olarak da adlandırılırlar (Tan vd., 2021).

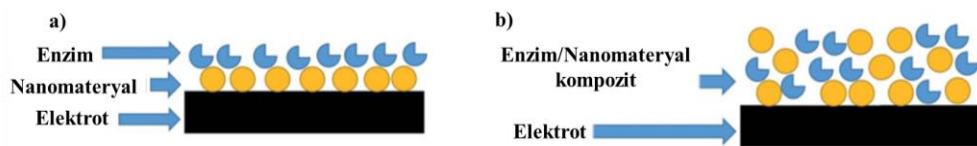


Resim 1.11. Enzim biyosensörlerinin farklı nesillerinin şematik gösterimleri (Tan vd., 2021).

Geleneksel enzim temelli biyosensörler sınırlı duyarlılığa, seçiciliğe ve kararlılığa sahiptir. Bu nedenle biyosensörlerin geliştirilmesine yönelik farklı yaklaşımlar düşünülmektedir. Biyosensörlerde umut vaat eden yeni bir yaklaşım, benzersiz fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip çeşitli türlerdeki nano ölçekli malzemelerin aktif algılama materyali olarak kullanılmasıdır (Arduini vd., 2016). Nanoteknolojideki son gelişmeler, elektrokimyasal biyosensör uygulamaları için yararlı fonksiyonlara sahip çok sayıda yeni malzeme ve istenen özelliklere sahip cihazların tasarımında gelecek vadeden yollar

sunmuştur. Nano sistemler, elektronların verimli taşınması için kullanılabilen en küçük boyutlu yapılardır ve bu nedenle nano ölçekli cihazların işlevi ve entegrasyonu için kritik öneme sahiptirler. Biyosensörlerde nanomalzemeler duyarlık, tayin sınırı (LOD), doğrusal tayin aralığı, seçicilik, tekrar kullanılabilirlik, kararlılık, yanıt süresi vb. gibi biyosensörlerin temel analitik özelliklerini geliştirmek için kullanılır. Nanomalzemelerin özellikle yüksek yüzey-hacim oranı, sinyal çeviricinin duyarlı yüzeyinde önemli bir artış ve daha etkili enzim immobilizasyonu sağlar. Ek olarak nanomalzemeler, biyosensörlere yüksek elektriksel iletkenlik, manyetik özellikler, katalitik aktivite vb. özellikler sağlar. Nanomalzemelerin yüzeyleri, biyosensörlerde ve diğer biyoteknolojik uygulamalarda biyomateryal ile etkileşim için gerekli olan farklı kimyasal gruplarla kolayca modifiye edilebilir (Kucherenko vd., 2019).

Bir elektrokimyasal dönüştürücü, biyomateryal immobilizasyonundan önce nanomalzemeler ile modifiye edilebilir veya biyoreseptör bileşeni nanomalzemelere immobilize edilip sinyal dönüştürücü yüzeyine kompozit şeklinde entegre edilebilir. Resim 1.12a'da gösterildiği gibi nanomalzemeler sabit veya değişken voltaj uygulanarak doğrudan dönüştürücü yüzeyinde sentezlenir ve daha sonra enzimler nanomalzemeler üzerine immobilize edilir. Enzimler, karboksil ($-COOH$), amino ($-NH_2$), tiyol ($-SH$), vb. gibi birçok işlevsel gruba sahip olduğu için nanometaryaller üzerine kolayca immobilize edilebilirler. Alternatif olarak, öncelikle nanomalzemeler sentezlenir ve sinyal çevirici yüzeyine immobilizasyonundan önce enzim çözeltisi ile karıştırılır ve damlatma yöntemi gibi yöntemlerle elektrotların modifikasyonu gerçekleştirilir (Resim 1.12b) (Kucherenko vd., 2019).



Resim 1.12. a) Nanomalzeme ile modifiye edilmiş elektroda enzim immobilizasyonu, b) elektrodun enzim/nanomalzeme kompoziti ile modifikasyonu (Kucherenko vd., 2019).

Nanomalzemelerin enzimatik biyosensörlerde uygulanmasının sonuçları aşağıdaki gibidir (Kerman vd., 2008):

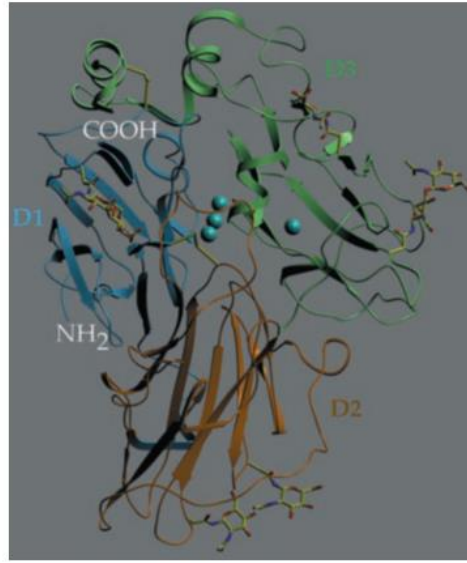
- Enzimatik reaksiyonda açığa çıkan veya kullanılan elektronların, elektrot yüzeyi ile enzim arasındaki transferinin artırılması.
- Elektrot yüzeyine daha fazla miktarda enzim molekülünün immobilizasyonuna olanak sağlaması.
- Enzimlerin kararlılığının artırılması.
- Ek kimyasal reaksiyonların katalizi.

1.8. Lakkaz Enzimi Hakkında Genel Bilgiler

Yoshida (1883) *Rhus vernicifera* ağacından elde edilen kauçukta lakkazı ilk kez tanımlayan kişidir. On yıl sonra enzimin katalitik mekanizmasını bildiren Bertrand (1894) tarafından ilk kez izole edilmiş ve saflaştırılmıştır. Bitkiler, mantarlar, prokaryotlar ve eklem bacaklılardan izole edildiklerinden dolayı lakkazların neredeyse her yerde bulunan enzimler olduğu kabul edilmektedir (Giardina vd, 2010). Mantar kaynaklı lakkazların çoğu, pH 4.0 civarında asidik izoelektrik nokta (pI) ile yaklaşık 60-70 kDa'lık hücre dışı monomerik küresel proteinlerdir (Marques de Souza ve Peralta, 2003). Literatürdeki çalışmalar lakkazların yaygın olarak *Trametes versicolor*, *Aspergillus oryzae*, *Coriolus hirsutus*, *Cerrena unicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Rhus vernicifera*'dan ticari olarak temin edilebildiğini bildirmektedir (Rivera-Hoyos vd., 2013).

Lakkazların çeşitli endüstriyel sektörlerde kullanılan monofenoller, difenoller, polifenoller, aminofenoller, metoksi fenoller gibi çok çeşitli fenolik bileşikler, aromatik aminleri ve askorbik asit gibi substratları oksitleme kabiliyeti, bu enzimlerin biyoteknolojik uygulamalardaki potansiyelini artırmıştır. Lakkaz, ağartma ve lignini parçalamak için tekstil, kağıt hamuru ve kağıt endüstrilerinde; boya giderimi ve atık su arıtımında; biyoyakıt hücrelerinin geliştirilmesinde; gıdalardaki ve çevre uygulamalarındaki fenolik bileşiklerin saptanmasında ve tıbbi uygulamalar için biyosensörlerin tasarımında yaygın olarak kullanılmaktadır (Rivera-Hoyos vd., 2013).

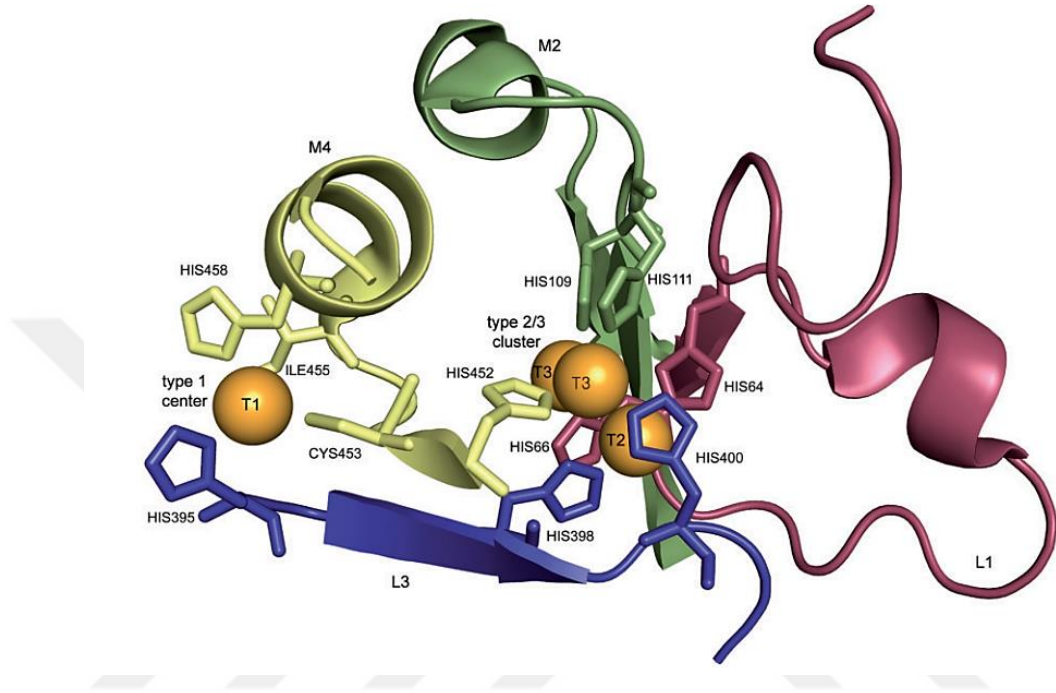
Piontek vd. (2002) *Trametes versicolor* fungusundan saflaştırılan lakkaz enzimini (TvL) kristalize etmişler ve yapısını aydınlatmışlardır. Bu kristalografik yapı dört bakır atomunu ve beş farklı N-glikozilasyon bölgesinde bulunan 7 adet N-asetil glukozamin birimlerini göstermektedir. Resim 1.13’de bu enzimin 65 x 55 x 45 Å boyutlarında üç adet β-fiçı yapısında kümeye sahip olduğu görülmektedir (Resim 1.13).



Resim 1.13. *Trametes versicolor* lakkazının kümelerini (D1: mavi, D2: kahverengi, D3: yeşil), bakır atomlarını (mavi küreler), karbohidrat birimlerini ve disülfid bağlarını gösteren üç boyutlu yapısı (Piontek vd., 2002).

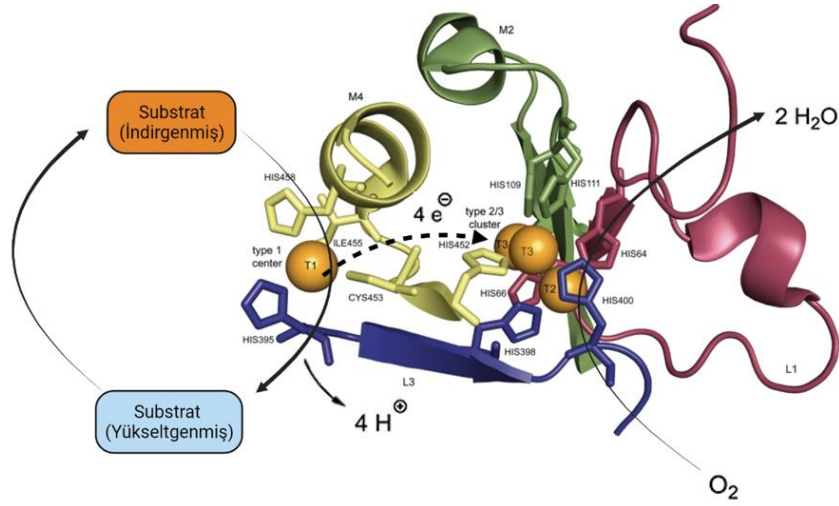
Lakkaz, bir oksidoredüktaz (EC 1.10.3.2) ve aynı zamanda mavi bakır protein olarak ve hatta katalize edebildiği geniş substrat çeşitliliği nedeniyle bir polifenol oksidaz olarak sınıflandırılabilir. Lakkazlar, herhangi bir kofaktör veya peroksit molekülü gerektirmeden, moleküler oksijenden suya dört elektronun aktarılmasıyla birlikte substratların yükseltgenmesini gerçekleştirebilen oksidatif enzimlerdir ve çok sayıda karmaşık organik ve inorganik molekülleri oksitledikleri için doğada önemli bir rol oynarlar. Lakkazlar, *orto* ve *para* difenolik bileşikler için bir afiniteye sahiptir ve *orto*- ve *para*-substitüye mono- ve polifenolik substratların hidroksil grubundan bir hidrojen atomunun uzaklaştırılmasını katalize ederler. Katalitik aktivite için, aktif protein birimi başına minimum dört Cu

atomuna ihtiyaç vardır. Bakır atomlarının üç bölgesi [Tip 1 (T1), Tip 2 (T2) ve Tip 3 Cu çifti (T3)], UV/görünür ve elektronik paramanyetik rezonans (EPR) spektroskopisi kullanılarak ayırt edilebilir (Resim 1.14) (Rivera-Hoyos vd., 2013).



Resim 1.14. *Trametes versicolor* lakkazının bakır bağlanma bölgeleri. Bakır merkezleri turuncu, L1, M2, L3 ve M4 sırasıyla pembe, yeşil, mavi ve açık sarı ile gösterilmektedir (Sirim vd., 2011).

Bir Cys ve iki His ile bağlı Tip I bakır bölgesi (T1) enzimin yoğun mavi renginden sorumludur, ~600 nm'de güçlü bir absorpsiyona sahiptir ve Elektron Paramanyetik Rezonans (EPR) ile saptanabilir. İki His ile bağlı Tip II bakır bölgesi (T2) görünür spektrumda absorpsiyon göstermez (renksizdir) ancak saptanabilir EPR özelliği vardır. Tip III bakır bölgesi, spektroskopik olarak karakterize edilen bir çift anti-ferromanyetik olarak bağlanmış bakır atomundan (her biri üç His ile bağlı) oluşur (Madhavi ve Lele, 2009). Lakkaz biyokatalizi, enzimin moleküler oksijen varlığında oksitlenmesi sonucu meydana gelir (Bento vd., 2005). Bu mekanizma, bakır atomları ile gerçekleşmektedir ve Lee vd. (2002) tarafından gösterilmiştir (Resim 1.15).



Resim 1.15. Lakkazın kataliz reaksiyonunun basitleştirilmiş bir mekanizması (Sirim vd., 2011, Rodríguez-Delgado vd., 2015).

Lakkaz enziminin elektrokatalitik mekanizması, T1 bölgesinin Cu atomu tarafından substrattan bir elektron alınmasıyla başlar ve böylece T1 bölgesi indirgenmiş, substrat da yükseltgenmiş olur. Ardından indirgenmiş T1 bölgesinden, T2 ve T3 bakır bölgelerine elektron transferi gerçekleşir. T3 bakırının görevi, T2 bakırının varlığının gerekli olduğu aerobik oksidasyon işleminde iki elektronu kabul etmektir. Oksijenin suya indirgenmesi T2 ve T3 kümesinde gerçekleşir (Rodríguez-Delgado vd., 2015). Lakkaz enzimlerinin enzimatik reaksiyonu “iki-bölge Ping-Pong Bi-Bi” reaksiyon mekanizmasına göre gerçekleştirdikleri bildirilmiştir. Enzime yeni bir substrat bağlanmadan ürünler salınmaktadır (Alcalde, 2007).

1.8.1. Lakkaz Temelli Amperometrik Biyosensörler

Lakkaz temelli biyosensörlerin birçok avantajı vardır. Yardımcı substrat olarak H_2O_2 'e ve tirozinaz ve peroksidazların aksine katalizi için herhangi bir kofaktöre ihtiyaç duymayan bu biyosensörlerin tasarımı da basittir. Enzim temelli biyosensörlerde analit ortamında çok küçük miktarlarda bulunan girişim yapan maddelerin etkisi, substrat spesifikliğinden dolayı lakkaz biyosensörleri için oldukça azdır. Ayrıca, katalizin

gerçekleşmesi için gerekli olan moleküler oksijen, çözelti ortamında mevcuttur (Rodriguez-Delgado vd., 2015).

Polifenolik bileşiklerin ölçümü, enzimatik reaksiyonun ürünleri olarak üretilen kinonların indirgenme akımının izlenmesine veya enzimin hedef analit tarafından inhibe edilmesine dayanır. Bir enzimatik biyosensör ile bir numunenin (gıda, çevresel, farmasötik veya klinik) analizinde az miktarda substrattan olası en büyük ölçülebilir bir sinyalin üretilmesi özellikle arzu edilir. Lakkaz temelli bir biyosensörün tasarımında maksimum verime ulaşmak için en önemli etken elektrokimyasal tekniğin seçimidir. Elektroanalitik uygulamalar için kullanılan her tekniğin kendine özgü avantajları ve özellikleri vardır ancak basitliği ve yüksek duyarlılığı nedeniyle amperometri en çok kullanılan tekniktir. Amperometrik biyosensörler, potansiyelin zamanın bir fonksiyonu olarak sabit tutulduğu özel bir voltametrik sensör sınıflandırmasıdır. Uygun potansiyelde, elektrot yüzeyinde redoks türlerinin oksidasyonu veya indirgenmesi ile üretilen akım ölçülür (Chawla vd., 2012a). Gözlemlenen akımın, elektroaktif türlerin derişimi ile doğrusal bir ilişkisi vardır. Kısaca istenen potansiyel, amperometrik ölçüm sırasında ihmal edilebilir kapasitif iç akımında (I_c) sabitlenir bu da arka plan sinyalini en aza indirir ve duyarlılığı büyük ölçüde geliştirir. Oksidoredüktaz enzimi ve amperometrik sinyal çeviricilerin kombinasyonu oldukça sık çalışılan enzimatik elektrot kavramıdır. Lakkaz temelli biyosensörler, elektrot ve enzim arasında doğrudan elektron transferinin meydana geldiği üçüncü nesil tiptedir. Bu bağlamda lakkazın diğer enzimlere göre ek kofaktörler olmadan elektron transfer reaksiyonlarını katalizleme yeteneği, moleküler oksijen varlığında fenoller ve o, m, p-benzendiollerini oksitleme yeteneği ve yüksek stabilitesi onu biyoalgılama uygulamaları için güçlü ve popüler bir aday yapmaktadır (Yashas vd., 2018).

Biyoalgılama verimi için uygun elektrokimyasal analiz yönteminin seçimiyle birlikte, verimin lakkaz temelli biyosensörlerin elektroaktif yüzeyinde meydana gelen enzimatik reaksiyona bağlı olmasından dolayı, immobilizasyon stratejileri ve nanomalzemelerin seçimi de kilit noktadır. Etkili bir immobilizasyon yöntemi, biyosensörün uzun süreli kullanımı, uzun süreli depolama ömrü ve çalışma stabilitesi açısından oldukça önemlidir. İdeal destek materyali inert, stabil ve mekanik kuvvetlere karşı dayanıklı olmalıdır. Şekil, dağılım, gözenek boyutu ve yüzey alanını dikkate almak önemlidir. Bir enzimin kararlılığı, seçiciliği ve aktivitesi, immobilizasyon tekniklerinin uygun destek seçimi ile birleştirilmesiyle geliştirilir.

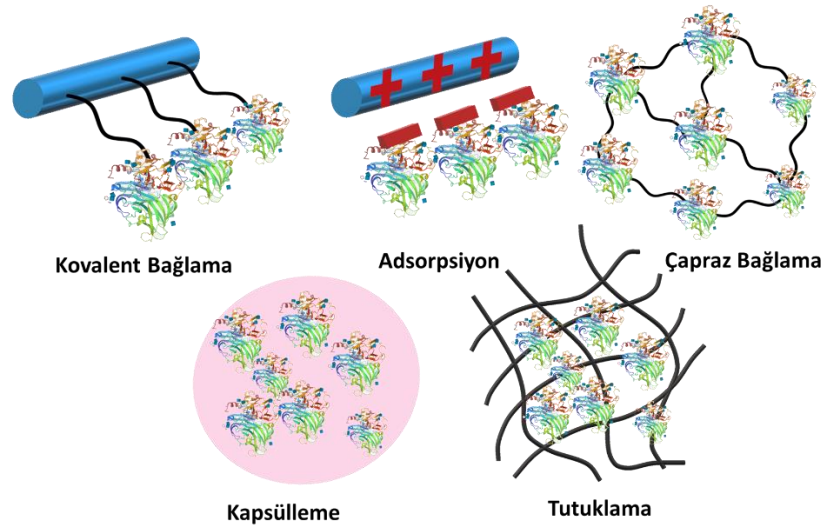
İmmobilizasyon yönteminin seçimi biyolojik materyalin yapısına ve uygulamasına bağlıdır. Biyoalgılama uygulamaları için kullanılan sinyal dönüştürücü tipini, analitin fizikokimyasal özelliklerini ve biyosensörün çalışacağı çalışma koşullarını hesaba katmak gerekir; tüm bu hususlar, biyolojik elementin maksimum aktivite sergilemesine izin verecek ve cihazın stabilitesine ve yeniden kullanılabilirliğine yardımcı olacaktır. Biyosensörlerdeki yaygın lakkaz immobilizasyon yöntemleri kovalent bağlanma, adsorpsiyon, çapraz bağlama, kapsülleme ve tutuklamadır (Şekil 1.8).

Kovalent bağlanma, destek materyalindeki grupların kimyasal aktivasyonuna dayanır ve bu gruplar enzimdeki aktif bölgenin dışındaki fonksiyonel gruplarla reaksiyona girerler. Bu yöntem yüksek stabilite sunar ve enzimin sıcaklık, pH ve diğer koşulların etkilerine karşı bir miktar direnç göstermesine izin verir.

Adsorpsiyon basit, düşük maliyetli ve hızlı bir immobilizasyon yöntemidir. Enzim, van der Waals ve hidrojen bağları gibi iyonik etkileşimler veya zayıf kuvvetler yoluyla destek materyaline bağlanır.

Çapraz bağlama yönteminde, enzim molekülleri arasında molekül içi bağlar oluşturmak için çift işlevli reaktifler kullanılır. Bu çapraz bağlayıcılar arasında dialdehitler, diiminoesterler, diizosiyanatlar ve karbodiimid tarafından aktivasyon söz konusudur. Bu tür immobilizasyonda oluşan çapraz bağlanmış enzim, uç pH ve sıcaklık koşullarına karşı dirençlidir. Bununla birlikte, bu yöntemde büyük miktarlarda enzime ihtiyaç vardır.

Kapsüllemeye, enzim, polimer gibi yarı geçirgen bir malzemedan yapılmış mikro boyutlu kürelerin çekirdeği içinde sınırlandırılır. Tutuklama yönteminde ise biyoaktif madde, bir monomer çözeltisi ile karıştırılır ve daha sonra polimerize edilir. Böylece biyomateryal, polimerik jel içinde hapsedilir (Rodriguez-Delgado vd., 2015).



Şekil 1.8. İmmobilizasyon yöntemleri.

1.9. Polifenoller Hakkında Temel Bilgiler

Gıda ve bitkilerdeki fenolik grupları içeren bileşikler, antiinflamatuvar, antihistaminik, antioksidan ve antikanser aktiviteleri nedeniyle insan sağlığına faydalıdır ve bu nedenle serbest radikalleri yok etmek ve kardiyovasküler hastalıklardan korunmak için günlük olarak küçük miktarlarda tüketilmeleri önerilir (Gamella vd., 2006). Biyolojik olarak aktif fenolik bileşikler arasında nörolojik süreçlerle bağlantılı olan katekolaminler (örneğin dopamin) bulunur. Fenolik bileşiklerle ilgili bir diğer konu ise çevresel bir bakış açısıyla ortaya çıkmaktadır. Petrokimya ürünleri, boyalar, tekstil ürünleri, eczacılık ürünleri ve plastikler dahil olmak üzere endüstriyel atık kaynaklarında fenolik bileşiklerle karşılaşmaktadır (Annachhatre ve Gheewala, 1996).

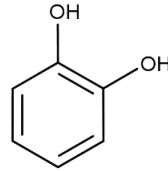
Polifenollerin tayini için kapiler elektroforez, spektrofotometri, kemilüminesans ve kromatografi gibi çeşitli geleneksel analitik yöntemler kullanılır (Ropero vd., 2008). Bu teknikler zahmetli ve kapsamlı numune hazırlama protokollerini içerir, büyük miktarda kimyasal tüketir, analiz için uzman operatör gerektirir ve saha analizinde kullanım için uygun değildir. Sayılan tüm dezavantajların önüne geçebilmek için alternatif bir yol, yüksek

duyarlık ve seçicilik sunan, düşük maliyetle tasarlanabilen elektrokimyasal biyosensörlerin kullanılmasıdır (Cajthaml vd., 2009; Ropero vd., 2008).

Lakkaz ve fenolik substratlar arasındaki oksidatif reaksiyon, fenolik bileşiklerin oksidasyonunu ve O₂'in suya indirgenmesini sağlar ve böylece ölçülebilir bir elektrik sinyali oluşur. Ayrıca enzimin redoks-aktif bölgesi ile elektrot arasındaki elektron transferinin verimliliğini artırmak üzere uygun enzim immobilizasyonu teknikleri ile duyarlık, tayin sınırı (LOD), doğrusal tayin aralığı, seçicilik, tekrar üretilebilirlik, kararlılık, yanıt süresi gibi biyosensörlerin temel analitik özelliklerini iyileştirmek için çeşitli nanomalzemeler geliştirilmiştir (Zhang vd., 2020a).

1.9.1. Katekol

Pirokatekol veya 1,2-dihidroksibenzen olarak da bilinen katekol toksik bir organik bileşiktir. Üç izomerik benzendiolün orto izomeridir (Resim 1.16).



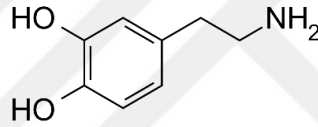
Resim 1.16. Katekolün kimyasal yapısı

Son yıllarda ahşap koruyucuları, tekstil ürünleri, yüzey aktif maddeler, reçineler, herbisitler ve pestisitler gibi ürünleri içeren çeşitli endüstrilerde fenolik bileşiklerin yaygın olarak kullanılması nedeniyle çevresel ve toksikolojik sorunlar da artmaktadır. Fenolik bileşiklerden katekol, boyalar, böcek ilaçları, farmasötikler, kozmetikler ve benzeri çeşitli endüstrilerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Karami ve Taher, 2019). Katekol, ateroskleroz, kardiyovasküler, Parkinson, Alzheimer ve kanser gibi çeşitli patofizyolojik hastalıklara sebep olmaktadır. Ekolojik sistemdeki yüksek toksisitesi ve düşük

parçalanabilirliği nedeniyle önemli bir çevresel kirletici olarak kabul edilmiştir. Bu nedenle, katekol tayini için duyarlı, hızlı, kolay ve düşük maliyetli bir yöntem geliştirmek önemlidir. Katekol, mükemmel bir elektrokimyasal aktiviteye sahiptir. Bu nedenle katekol gibi fenolik bileşiklerin tayini için geleneksel analitik yöntemlerden ziyade elektrokimyasal biyosensörler oldukça ilgi çekmektedir. Özellikle gıda ve çevre numunelerinde katekolün tayini için amperometrik biyosensörler geliştirilmektedir (Sadeghi vd., 2015).

1.9.2. Dopamin

Dopamin (DA), 3,4-dihidroksifenetilamin, hücreler arasındaki iletimde görevli ve insan vücudunda bulunan bir katekolamin nörotransmitterdir (Resim 1.17).

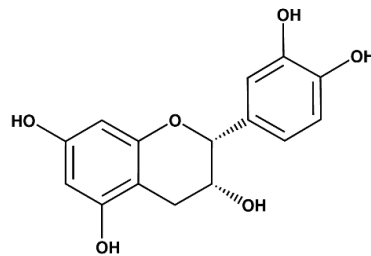


Resim 1.17. Dopaminin kimyasal yapısı

Dopamin, biyojenik amin sınıfına ait bir birincil amindir ve merkezi sinir, böbrek, hormonal, kardiyovasküler ve endokrin sistemlerin işleyişinde önemli bir rol oynar. İnsan vücudundaki düşük dopamin seviyesi, Parkinson, şizofreni ve Huntington hastalıklarının gelişimine sebep olmaktadır (Wardak vd., 2020). Dopamin normalde idrarda 0.3–2.6 µM/gün, kanda ise 0.2–0.4 µg/mL derişimlerinde bulunur ve meydana gelecek değişiklikler, yukarıda bahsedilen hastalıklarla ilişkili olabilecek paroksizmal veya kalıcı hipertansiyona neden olabilir. Dopamin ölçümü genellikle sıvı kromatografi ve kapiler elektroforez gibi geleneksel analitik tekniklerle gerçekleştirilir. Düşük tayin sınırlarına rağmen, bu tekniklerin büyük ekipman ve uzun analiz süreleri gibi bazı önemli sınırlamaları vardır. Bu nedenlerden dolayı bu biyobelirtecin daha hızlı ve daha uygun tayini için biyosensörlerin geliştirilmesi çok önemlidir. Enzim modifiye çalışma elektrodu ile referans elektrot arasına bir indirgenme potansiyelinin uygulandığı amperometri temelli dopamin tayini oldukça spesifik bir yöntemdir (Rubio-Govea vd., 2020).

1.9.3. (-)-Epikateşin

(-)-Epikateşin (flavon-3-ol), flavonoidlerin bir alt sınıfı olan flavanol grubuna aittir (Resim 1.18) ve yeşil çay, üzüm ve kakaoda bulunur. Rein vd. (2000) insan plazmasındaki farklı (-)-epikateşin derişimlerinin antioksidan etkisini belirlemekle beraber, birçok araştırmacı, (-)-epikateşince zengin yeşil çayın insanda *in vivo* trombosit antiagregasyon etkisi gösterebildiğini rapor etmişlerdir (Del Rio vd., 2013). Flavonoidler, bitkilerin ikincil metabolizmalarının ürünleri olarak üretilen geniş bir polifenolik bileşik grubudur. Şimdiye kadar, yaklaşık 20.000 flavonoid yapısı tanımlanmıştır (Buckingham ve Munasinghe, 2015), bu da flavonoidleri bilinen en zengin doğal polifenolik madde sınıfı haline getirmektedir. Bitkilerdeki rolleri; çeşitli stres faktörlerinden (örneğin ultraviyole ışık, toksinler veya oksidatif stres) korunma, sinyal iletimi, çiçek ve meyvelerin renk ve aromasının modülasyonu ve çevredeki bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalarla etkileşimdir. Bitkilerdeki işlevlerine ek olarak flavonoidler, hayvanlarda ve insanlarda metabolik ve fizyolojik süreçleri önemli ölçüde etkileyen çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir. Son yirmi yılda yapılan çok sayıda çalışma, (-)-epikateşin dahil olmak üzere yüksek flavan-3-ol alımının kardiyovasküler hastalıklara ve metabolik bozukluklara karşı koruma sağlayabileceğini göstermiştir. Ayrıca, birkaç epidemiyolojik ve klinik çalışma, (-)-epikateşin içeren gıdaların kan basıncını düşürme kapasitesini belirlemiştir (Bernatova, 2018; Buckingham ve Munasinghe, 2015). Bu sebeple (-)-epikateşin tayini için elektrokimyasal biyosensör sistemlerinin geliştirilmesi oldukça önemlidir.



Resim 1.18. (-)-Epikateşinin kimyasal yapısı.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Literatür araştırmasında, 2001 yılından bu yana lakkaz temelli biyosensörlerin geliştirilmesindeki bilimsel üretimin önemli ölçüde büyüdüğü görülmektedir. Karşılaştırmalar sonucu, lakkaz temelli optik ve termal biyosensörlerin elektrokimyasal biyosensörlere kıyasla daha az ilgi görmekte olduğu söylenebilir. Ayrıca yapılan çalışmalarda en çok kullanılan immobilizasyon tekniğinin kovalent bağlama, en çok kullanılan nanomalzemelerin de karbon temelli nanomalzemeler olduğu tespit edilmiştir. Elektrokimyasal teknikler, lakkaz temelli biyosensörler açısından en çok çalışılan tekniktir ve bunların arasında en fazla ilgiyi gören elektrokimyasal teknik ise amperometri tekniğidir.

2.1. Katekol Tayini Çalışmaları

Fu vd. (2015) gümüş nanopartiküller (AgNPs) içeren karboksimetil selüloz (CMC) ile modifiye edilmiş elektrospun selüloz nano lifleri hazırlamışlar ve lakkazı elektrostatik etkileşimler ile bu nanokompozite immobilize etmişlerdir. Selüloz nanolifler, elektro-eğirme tekniği kullanılarak deasetilasyon kombinasyonu ile hazırlanmıştır. Döngüsel voltametri deneyleri ile, AgNPs-CMC/selüloz nanoliflere lakkazın immobilizasyonunun gerçekleştiğini ve lakkaz ile elektrot arasındaki doğrudan elektron transferinin kolaylaştığını bildirmişlerdir. Lakkaz/AgNPs-CMC/selüloz/camsı karbon elektrot, 1.64 μM (S/N=3) tayin sınırı ve 4.98 μM –3.65 mM arasında geniş bir doğrusal aralığın yanı sıra iyi tekrarlanabilirlik, yeniden üretilebilirlik, kararlılık ve seçicilik özelliklerini sergilemiştir.

Sadeghi vd. (2015) sundukları çalışmada katekol için *Paraconiothyrium variabile* kaynağından saflaştırılan lakkaz ile yeni bir biyosensör geliştirmişlerdir. Saflaştırılmış enzim, karbon pasta elektrot yüzeyinde tek adımlı bir elektrobiriktirme ile çapraz bağlama reaktiflerini gerektirmeyen Fe_3O_4 /polianilin/kitosan (Fe_3O_4 /PANI/CS) biyokompozit matriks filmi içerisinde tutuklanmıştır. Oluşturulan biyokompozit tabakasının karakterizasyonunu, taramalı elektron mikroskobu (SEM), elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ve döngüsel voltametri (CV) ile gerçekleştirmişlerdir. Amperometri

yöntemiyle biyokompozit bileşimi, enzim miktarı ve çözelti pH'ına göre optimize edilen biyosensör, katekol için 0.5–80 μM arasında doğrusal bir derişim aralığı ve 0.4 μM 'lik bir tayin sınırı sergilemiştir. Araştırmacılar tasarlanan biyosensörün çay yaprağı örneklerinde katekol tayini için uygulanabilirliğini rapor etmişlerdir.

Romero-Arcos vd. (2016) tarafından sol-jel yöntemi ile sentezlenen TiO_2 'e lakkazın immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem iki farklı biyosensör (TiO_2 /Lakkaz ve TiO_2 /NAF/Lakkaz) geliştirmek için kullanılmış ve bu iki farklı elektrot katekolün tayini için NAF/Lakkaz sistemiyle karşılaştırılmıştır. Elektrotların elektrokimyasal davranışı, EIS ve CV kullanılarak incelenmiştir. TiO_2 /NAF/Lakkaz temelli biyosensörün, 22 günlük bir sürenin ardından duyarlık, kararlılık ve tayin sınırı açısından iyi elektrokimyasal özellikler sunduğu bildirilmiştir.

Sarika vd. (2017) sulu çözeltilerde katekol analizi için lakkaz temelli NiO ve $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanokompoziti ile modifiye karbon pasta elektrotlara dayalı amperometrik biyosensör tasarlamışlar ve biyosensörün performansını CV ve EIS tekniklerini kullanarak değerlendirmişlerdir. Biyosensörün yanıtının 6 saniye içinde kararlı hal durumuna ulaştığını ve 0.95 μM tayin sınırı ile $1.415 \text{ AM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ duyarlığa sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Palanisamy vd. (2017) çalışmalarında katekolün tayini için grafen-selüloz mikrofiberler (GR-CMF) üzerine immobilize lakkaz temelli perde baskılı elektrot içeren bir biyosensör tasarlamışlardır. CV sonuçları ile lakkaz immobilize GR-CMF ile modifiye perde baskılı elektrotları, GR-CMF kompoziti ile modifiye edilmiş perde baskılı elektrotlar ile karşılaştırmışlar ve katekole karşı 7 kat daha yüksek katalitik aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir. Optimize koşullar altında, katekolün nicel tayini için amperometrik *i-t* yöntemi kullanılmış ve biyosensörün duyarlığı, cevap süresi ve tayin sınırı değerleri sırasıyla $0.932 \mu\text{M}\mu\text{A}^{-1}\text{cm}^{-2}$, 2 saniye ve 0.085 μM olarak bildirilmiştir.

Zheng vd. (2018) sundukları çalışmada setiltrimetilamonyum bromür-polivinilpirolidon-sikloheksan-etanol-su vezikül-mikroemülsiyon kompozit agregasyonunu basit bir solvotermal yolla şablon olarak kullanarak çiçek şekilli kabuk-çekirdek SiO_2 nanokürelerini (FYSSns) sentezlemişlerdir. FYSSn'ler sıralı radyal mezokanallar ($\sim 7 \text{ nm}$), büyük boşluklar (100-120 nm) ve ince silika kabukları (20–30 nm) ile çiçek şeklinde (260–320 nm) olan çekirdek-kabuk yapıları sergilemiştir. Araştırmacılar lakkaz immobilizasyonu için destek materyali olarak kullanılan FYSSn'lerin katekol tayini için elektrokimyasal

biyosensör uygulamalarında kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Optimize edilmiş koşullar altında biyosensörün 12.5–450 μM katekol derişimi aralığında geniş doğrusal aralık ve 1.6 μM 'lik düşük tayin sınırı gösterdiğini bildirmişlerdir. Biyosensörün bu performansının, FYSSn'lerin geniş spesifik yüzey alanı ve mezokanal yapısı gibi avantajlarına bağlı olabileceğini ifade etmişlerdir.

Zhang vd. (2020a) katekolün tayini için MoS_2 nanotabakalar ve Au nanopartiküller ile hazırladıkları nanokompozitleri kullanarak yeni bir lakkaz temelli biyosensör tasarlamışlardır. Deneysel sonuçlarda, MoS_2 'ün geniş özgül yüzey alanına, iyi biyoyoumluluğa sahip olduğunu ve lakkazın immobilizasyonu için geniş yüzey alanı sağladığını göstermişlerdir. Ayrıca altın nanopartiküller, MoS_2 'ün iletkenliğini artırmış ve biyosensörün algılama duyarlılığını geliştirmiştir. MoS_2 nanotabakalar ve altın nanopartiküllerin kompozit olarak hazırlanması, lakkaz temelli biyoelektrodun 2 μM (S/N=3) tayin sınırı ile 2–2000 μM derişimleri aralığında katekolün, DPV tekniği ile tayin edilmesini mümkün kılmıştır. Biyosensörün seçiciliği için AuNPs- MoS_2 -Lac/GCE ile katekolün ve katekole benzer kimyasal yapıların amperometrik yanıtları araştırılmıştır.

Castrovilli vd. (2020) lakkaz enziminin siyah karbon nanopartiküller (carbon black) ile modifiye edilmiş perde baskılı elektrotlar üzerine immobilizasyonu için elektrosprey yöntemini kullanmışlardır. Sonuçlarda, lakkaz enziminin elektrosprey iyonizasyon sürecinden ve biriktirilmesinden sonra aktivitesini sürdürdüğünü ve biyosensörün depolama (oda sıcaklığında 3 aya kadar) ve çalışma (aynı elektrotta 25 ölçüme kadar) açısından yüksek performans gösterdiğini bildirmişlerdir. Lakkaz temelli biyosensörün kurşun, kadmiyum, atrazin ve paraokson girişimi olmaksızın 2.0 μM tayin sınırı ile 2.5–50 μM doğrusal aralığında katekol tayini için içme suyu ve atık sularda uygulanabilir olduğu gösterilmiştir.

Liu vd. (2020) yeni bir aloe vera benzeri 3D Au–ZnO nanokompoziti ile ITO elektrotları modifiye etmişler ve sularda katekolün gerçek zamanlı tayinini gerçekleştirmişlerdir. ZnO zayıf elektriksel iletkenliğe sahip olduğu için Au nanopartiküllerini Au–ZnO mikro/nanoyapıları oluşturmak için ZnO dizilerinde biriktirmişlerdir. Geniş bir spesifik alana sahip aloe vera benzeri ZnO ve yüksek iletkenliğe sahip Au nanopartiküller ile enzimatik reaksiyonlarda hem yüksek elektrokataliz hem de hızlı elektron transferi gözlemlenmiştir. Lakkaz immobilizasyonundan sonra hazırlanan biyosensörün, diğer dihidroksibenzenler ve fenollerin bulunduğu ortamda 131 $\mu\text{A}\text{mM}^{-1}$ 'lik

yüksek duyarlığa ve ayrıca 75 nM–1100 µM derişimleri arasında son derece geniş bir doğrusal aralığa ve ultra düşük tayin sınırına (25 nM) sahip spesifik bir tanıma sergilediğini bildirmişlerdir. Ek olarak, gerçek göl numunelerinde katekol tayini için deneyler gerçekleştirmişlerdir.

Cevher vd. (2021) çalışmalarında yeni bir monomerin (6,9-bis(4-heksiltiofen-2-il)-11H-indeno[2,1-b]kinoksalin-11-on (M1)) sentezini ve karakterizasyonunu bildirmişler ve bu monomeri elektrot yüzeyinde elektrokimyasal olarak polimerize ederek (PM1) lakkazın immobilizasyonu için bir algılama platformu olarak kullanmışlardır. PM1/Lakkaz'ın, amperometrik yöntemlerle su numunelerinde katekol tayini için yeni bir algılama platformu olarak ilk kez araştırıldığını bildirmişlerdir. Optimize edilmiş koşullar altında, 0.005–0.175 mM derişimleri arasında doğrusal aralığa sahip biyosensörün, 9.86 µM tayin sınırı ve 153.6 µAmM⁻² değerindeki yüksek duyarlık ile iyi stabilite ve seçicilik sergilediğini rapor etmişlerdir.

Chandran vd. (2021) çalışmalarında lakkazın immobilizasyonu için Au/Mxene nanokompozitini kullanmışlar ve katekol tayini için camı karbon elektrot (GCE) yüzeyini modifiye etmişlerdir. Au nanopartiküllerinin biyoyumlu yüzeyinin adsorbe edilmiş enzimin biyolojik elektrokatalitik aktivitesini korumasına izin verdiğini ve ayrıca elektronların elektrot yüzeyine ulaşımını kolaylaştırdığını bildirmişlerdir. Katekolün Lakkaz/Au/MXene/GCE elektrotu ile elektrokimyasal oksidasyonu, 0.05–0.15 µM katekol derişimi aralığında, 0.05 mA/µM'lik nispeten yüksek bir duyarlık ve 0.05 µM'lik bir tayin sınırı ile iyi kararlılık ve tekrarlanabilirlik sergilediğini rapor etmişlerdir. Bu nedenle, Lakkaz/Au/MXene/GCE biyosensörünün, çevre kirliliğini en aza indirmek için endüstriyel atık sularında ve su kaynaklarında katekolün tayini için potansiyel bir sistem olduğunu rapor etmişlerdir.

Amorim vd. (2021) ilk kez, *Rhus vernifcera* lakkazının kaju sakızı (gum) nanopartiküllerine immobilizasyonunu ve bu sistemin katekolün tayini için bir elektrokimyasal biyosensörün tasarımı ve geliştirilmesinde biyolojik algılama elemanı olarak kullanılabilirliğini bildirmişlerdir. Lakkaz-kaju sakızı nanopartiküllerini nanoçöktürme yöntemiyle hazırlamışlardır. Enzimatik nanopartiküllerin hazırlanmasında doğal bir ürünün kullanılmasının avantajını, sentezinin kolay olması ve immobilizasyon veriminin yüksek olması şeklinde vurgulamışlardır. Katekol tayini için bir amperometrik biyosensörün geliştirilmesinde biyo-tabaka olarak başarıyla uygulanan bu biyosensör, düşük

tepki süresi (6 saniye), iyi duyarlık ($7.86 \mu\text{A}\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-2}$), geniş lineer aralık (0.25–200 μM) ve tayin sınırı (50 nM) göstermiştir.

Nochit vd. (2021) tarafından atık sularda katekol tayinine yönelik çok duvarlı karbon nanotüp kağıt tabanlı (MWCNT-ePAD) elektrokimyasal algılamaya dayalı yeni bir platform geliştirilmiştir. ePAD (elektrokimyasal kağıt temelli cihaz), kromatografi kağıdı üzerinde üretilmiştir ve çalışma elektrodu ve karşıt elektrot olarak grafit mürekkebi kullanılmıştır. Referans elektrodu olarak Ag/AgCl kullanılmıştır. MWCNT-ePAD biyosensörünün fenolik bileşiklere karşı duyarlığı, çok duvarlı karbon nanotüplerin çalışma elektrodu üzerine modifiye edilmesi ile geliştirilmiş ve fenolik bileşiklerin enzim katalizli reaksiyon ürünlerinin tayini kronoamperometri ile yapılmıştır. Araştırmacılar MWCNT-ePAD biyosensörünü, 0.25 mg/L'lik bir tayin sınırı ile 0.8 ila 3.0 mg/L derişimleri arasında katekolün tayini için kullanmışlardır. MWCNT-ePAD biyosensörünün tekrar üretilebilirliğini ve kullanım ömrününün 30 günden fazla olduğunu rapor etmişlerdir. Ek olarak, geliştirilen biyosensörü, Folin-Ciocalteu yöntemine kıyasla tutarlı sonuçlarla atık sudaki katekolün tayini için kullanmışlardır.

2.2. Dopamin Tayini Çalışmaları

Cesarino vd. (2013) çok duvarlı karbon nanotüplerin (MWCNT), polipirolün (PPy) ve lakkazın (Lac) elektrobiriktirme yöntemi ile platin (Pt) elektrot yüzeyine modifiye edildiği yeni bir biyosensör geliştirmişlerdir ve bu nörotransmitter biyosensörünü, diferansiyel puls voltametri (DPV) yöntemi ile idrar örneklerinde dopamin tayini için uygulamışlardır. Pt/MWCNT/PPy/Lakkaz biyosensörünün, idrarda dopaminin izlenmesi için yeterli bir seviye olan 0.14 μM 'lık bir tayin sınırı sergilediğini rapor etmişlerdir. Geleneksel yöntemlerden daha avantajlı olduğu bildirilen biyosensörün, yeniden üretilebilirlik ve tekrarlanabilirlik denemelerinin standart sapma değerlerini sırasıyla %2.9 ve %1.7 olarak bildirmişlerdir. Önerilen biyosensörün, idrarda dopamin tayininde başarılı bir şekilde kullanıldığını ve elde edilen sonuçların HPLC yöntemi ile elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğunu bildirmişlerdir.

Wang vd. (2014) dopaminin duyarlı bir şekilde tayini için biyomedikal biyosensör uygulaması olarak fitik asit ile fonksiyonelleştirilmiş silika nanopartiküllerin (SiO₂-PA NP'ler) tasarımını ve sentezini rapor etmişlerdir. SiO₂-PA nanopartiküller ve lakkaz arasındaki biyoyumluluğu dairesel dikroizm spektrumları ile araştırmışlardır. Biyosensörün geniş bir lineer aralık (0.99–103.10 µM) ve 0.26±0.003 µM düşük tayin sınırı ile dopamin için iyi elektrokatalitik aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir. SiO₂-PA nanopartiküllerin iyi biyoyumluluğa sahip olduğunu bildiren araştırmacılar ayrıca biyosensörün, farmasötik örneklerde ve tavşan kanı serum örneklerinde dopaminin belirlenmesi için başarıyla test edildiğini rapor etmişlerdir.

Hua vd. (2015) sundukları çalışmada lakkazı (Lac) immobilize etmek için beta-siklodekstrin (β-CD) ve benzaldehit (BA) kompleksi sentezlemişler ve elde edilen CDBA-Lac kompleksini, bir elektropolimerizasyon işlemi yoluyla indirgenmiş grafen oksit (rGO) ile modifiye edilmiş perde baskılı karbon elektrotlar (SPE'ler) üzerine yerleştirmişlerdir. Tasarlanan Lac tabanlı biyosensörde, β-CD'nin, lakkazın biyoaktivitesini koruması için biyoyumlu bir mikro-ortam sağladığını ve indirgenmiş grafen oksitin, elektron transfer hızını arttırmak için mükemmel iletkenliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir. Dopaminin modifiye elektrot üzerindeki elektrokimyasal davranışını CV ve DPV ile araştırmışlardır. Bu biyosensörde 0.1 mM askorbik asit varlığında dopaminin 0.03 µM (S/N=3) tayin sınırı ile 0.1–70 µM aralığında doğrusal olarak tayin edilebildiğini rapor etmişlerdir. Son olarak, önerilen bu biyosensör, tatmin edici sonuçlarla insan idrar örneklerinde dopaminin tayini için başarıyla kullanılmıştır.

Silva ve Vieira (2016) poli(allilamin hidroklorür) (AuNP-PAH) içerisinde stabilize edilmiş altın nanopartikülleri, genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalardan (*Aspergillus oryzae*) elde edilen lakkazın immobilizasyonu için bir destek olarak kullanmışlardır ve kare dalga voltametri yöntemi ile dopamin tayini için yeni bir biyosensörün geliştirilmesinde başarıyla uygulamışlardır. Biyosensörün elektrokimyasal karakterizasyonunu, CV ve elektrokimyasal EIS ile gerçekleştirmişler ve elektrot modifikasyonu için kullanılan nanomalzemenin elektron transferini kolaylaştırdığını göstermişlerdir. Optimize edilmiş koşullar altında biyosensör, dopamin için 0.26 µmolL⁻¹lık bir tayin sınırı ile 0.49–23.0 µmolL⁻¹ derişimleri arasında doğrusal bir aralık göstermiştir. Önerilen biyosensörün, farmasötik numunelerde dopamin tayini için uygulanabilirliğini denemişler ve sonuçların, spektrofotometrik bir yöntem kullanılarak elde edilenlerle uyumlu olduğunu bildirmişlerdir.

Numuneler için elde edilen %97.6 ve %105.5'lik geri kazanımlar ile önerilen yöntemin pratik uygulamalar için uygun olduğunu bildirmişlerdir. Biyosensörün iyi analitik performansını, lakkazın nanomalzeme üzerine etkin bir şekilde immobilizasyonuna ve Au nanoparçacıklarının ve PAH polimerinin varlığından dolayı protein ile elektrot yüzeyi arasındaki elektron transferinin kolaylaşmasına atfetmişlerdir.

Li vd. (2016b) paladyum nanopartikül-bakteriyel selüloz (PdBC) hibrit nanoliflerini *in situ* kimyasal indirgeme yöntemi ile sentezlemişlerdir. Biyoalgılama platformu oluşturmak için elde edilen PdBC nanoliflerini, lakkaz (Lac) ve Nafion™ ile karıştırdıktan sonra elektrot yüzeyine damlatmışlardır. İnsan idrarında dopamin tayini için kullanılan biyosensörün yüksek duyarlık ($38.4 \mu\text{A}\text{mM}^{-1}$), düşük tayin sınırı ($1.26 \mu\text{M}$) ve geniş doğrusal aralık ($5\text{--}167 \mu\text{M}$) gösterdiğini rapor etmişlerdir. Biyosensörün iyi tekrarlanabilirlik, tekrar hazırlanabilirlik, seçicilik ve kararlılık gösterdiğini bildirmişlerdir.

Kohori vd. (2018) camsı bir karbon (GC) elektrot yüzeyinde grafen oksit (GO) veya indirgenmiş grafen oksit (rGO) ve lakkaz (Lac) biriktirilmesine dayalı olarak biyoelektrotlar geliştirmişlerdir ve sonuçlara göre lakkaz enziminin immobilizasyonu için rGO'nun başarıyla uygulandığını ve dopamin tayini için analitik sinyali geliştirdiğini bildirmişlerdir. GC/rGO/Lak biyosensörünü, sentetik idrar ve serum numunelerinde dopamin tayini için kullanmışlar ve 91.0 nM değerinde bir tayin sınırı bildirmişlerdir.

Li vd. (2018) sıralı mezokanallara ve ince tabakalar arası büyük boşluklara sahip $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{vmSiO}_2$ mikroküreleri, adım adım çözelti fazı arayüz biriktirme yoluyla sentezlemişlerdir. Fe_3O_4 nanopartiküllerini Stöber yöntemiyle SiO_2 ile kaplayıp, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{vmSiO}_2$ hazırlamak için şablon olarak setil trimetilamonyum klorür birikimi ile son katmanı tekrar mezogözenekli SiO_2 ile kaplamışlardır. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{vmSiO}_2$ mikrokürelerinin yüksek mıknatıslanma ve düzenli mezokanal formda iyi tanımlanmış bir çekirdek-kabuk yapısı gösterdiğini bildirmişlerdir. Lakkazın kovalent bağlanma yoluyla immobilize edildiği $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{vmSiO}_2$ mikrokürelerini kullanarak dopamin tayini için camsı karbon elektrot (GCE) yüzeyini modifiye etmişlerdir. Biyosensörün elektrokimyasal özellikleri EIS ve CV ile araştırılmış ve $1.5\text{--}75 \mu\text{M}$ doğrusal aralık ve $0.177 \mu\text{M}$ tayin sınırı değerleri bildirilmiştir. Tasarlanan biyoalgılama platformunun askorbik asit varlığında güçlü seçicilik özelliklerini vurgulamışlardır. Lakkaz biyosensörünü, farmasötik örneklerde dopaminin tayini için kullanmışlardır ve pratik uygulamada örnekler için %98.7–100.5 geri kazanım elde edildiğini rapor etmişlerdir.

Josypčuk vd. (2018) L-DOPA, dopamin, noradrenalin ve adrenalin tayini için iki enzimden biri (lakkaz veya tirozinaz) tarafından modifiye edilmiş iki farklı mezogözenekli silika tozundan birini (SBA-15 veya MCM-41) içeren mini reaktörlere dayalı dört farklı biyosensör tasarlamışlardır. Bu biyosensörlerin çalışma potansiyellerini, akış hızlarını, enjekte edilen hacimlerini, reaktör hacimlerini ve analit derişimlerini optimize etmişler ve kovalent bağlı lakkaz (Lac) ve MCM41 silika tozu ile tasarlanan sistemin, katekolaminlerin tayini için en verimli yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Dopamin için %100, L-DOPA için %32.1, noradrenalin için %26.2 ve adrenalin için %0.71 geri kazanımın sağlanan bu biyosensörün dopamin için tayin sınırını 5.46 μM olarak rapor etmişlerdir.

Coelho vd. (2019) lakkaz enzimini, mantar kaynaklı (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glukan olan bir botryosphaeran (ekzopolisakkarit) filmini kullanarak çok duvarlı karbon nanotüplerle modifiye camı karbon elektrot üzerine immobilize etmişler ve EIS ve TEM ile biyosensörün karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Elektroanalitik tekniklerle enzim derişimi, pH değeri ve işlemsel parametreler gibi deneysel değişkenleri optimize etmişlerdir. Kare dalga voltametriyi kullanarak, 0.127 μmolL^{-1} tayin sınırı ile 2.99–38.5 μmolL^{-1} aralığında dopamin derişimine karşı cevabın doğrusal olduğunu bildirmişlerdir. Bu biyosensör, farmasötik ve sentetik biyolojik numunelerde dopamin tayininde başarıyla uygulanmış ve diğer fenolik bileşiklerin yanı sıra ürik asit ve askorbik asit varlığında bile iyi seçicilik göstermiştir. Ayrıca araştırmacılar bu biyosensörün, dopaminin analitik sinyalini kullanarak spironolaktonun dolaylı belirlenmesinde 0.94 μmolL^{-1} 'lik bir tayin sınırı ile uygulanabilirliğini değerlendirmişlerdir. Ticari farmasötik numunelerinde spironolakton analizinde elde edilen sonuçların tatmin edici olduğunu vurgulamışlardır.

Rubio-Govea vd. (2020) sundukları çalışmada çiçek (MoS₂-F) ve şerit (MoS₂-R) olmak üzere iki farklı morfolojide sunulan iki boyutlu MoS₂ ile karbon kağıt elektrotlarının modifikasyonunu içeren yeni bir lakkaz temelli amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. *Pycnoporus sanguineus* CS43 mantarından elde edilen iki lakkaz izoformu (LacI ve LacII) ilk kez biyolojik bir tanıma unsuru olarak değerlendirilmiş ve performansları *Trametes versicolor* (TvL) ticari lakkazı ile karşılaştırılmıştır. LacII ile modifiye edilen biyosensörlerin, dopaminin non-invaziv tayini için literatürde bildirilen en iyi değer olan 10 nM'lik düşük tayin sınırı (LOD) sergilediğini rapor etmişlerdir. LacII ve TvL enzimleri ile modifiye edilmiş elektrotların uygulanabilirliklerini değerlendirmek için elektrotlar sentetik idrar numunelerinde test edilmiş ve sırasıyla 0.67 ve 2.67 μM LOD değerleri elde edilmiştir.

Bu değerler normalde gerçek idrar numunelerinde bulunan ortalama dopamin derişimlerinin altında bir değerdir.

Wardak vd. (2020) ok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT) ile modifiye camsı karbon elektrotlar üzerine lakkazı yumuşak plazma polimerizasyon tekniği kullanarak başarıyla biriktirmişler ve dopamin tayini için uygulanabilirliğini ve girişim denemelerini değerlendirmişlerdir. Optimal koşullar altında oluşturulan biyosensörün [3 kV'luk bir voltajda ve 30 saniyelik biriktirilmeyele üretilen korona deşarjı (yüksek gerilimli bir iletkenin, etrafını saran hava gibi akışkanların iyonlaşmasıyla oluşan elektriksel bir deşarjdır), helyum akış hızı 10 L/dk, lakkaz çözeltisi akış hızı 200 $\mu\text{L/dk}$] 0.1 $\mu\text{mol/dm}^3$ –10 $\mu\text{mol/dm}^3$ ve 10 $\mu\text{mol/dm}^3$ –50 $\mu\text{mol/dm}^3$ derişimleri arasında iki lineer aralığa sahip olduğunu bildirmişlerdir. Dopamin tayin duyarlığı 3.63 $\mu\text{Adm}^3/\mu\text{mol}$ ve 1.33 $\mu\text{Adm}^3/\mu\text{mol}$ olarak bildirilen GCE/Lakkaz biyosensörün MWCNT ara katmanının uygulanması ile dopamin tayin duyarlığının 0.1 $\mu\text{mol/dm}^3$ ila 6 $\mu\text{mol/dm}^3$ arasında doğrusal bir aralık için 22.35 $\mu\text{Adm}^3/\mu\text{mol}$ değerine arttığını gözlemlemişlerdir.

Sorrentino vd. (2020) grafenin *Pleurotus ostreatus* kaynaklı kendiliğinden oluşan sınıf I hidrofobin Vmh2 ile biyofonksiyonelleştirdiğini bildirmişler ve böylece füzyon proteini Lak-Vmh2'yi kullanarak lakkazı çok katmanlı grafen (FLG) üzerine immobilize etmişlerdir. Sunulan yöntemin kolay, evre dostu ve çok yönlü olduğunu bildirmişlerdir. Hazırlandığı şekliyle Lak-Vmh2/FLG, katekol ve dopamin gibi fenolik bileşikler için bir elektrokimyasal sensör oluşturmak üzere camsı karbon (GC) elektrotların modifikasyonu için kullanılmıştır. Dopamin için K_m değerini 3.0 mM, tayin sınırını 20 μM , dopamine karşı biyosensörün duyarlığını 16.4 $\mu\text{AM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ ve doğrusal aralık değerini 20–250 μM olarak bildirmişlerdir.

Soldatkin vd. (2021) diferansiyel ölçüm yöntemi ile kondüktometrik analiz yöntemini kullandıkları çalışmada, bir *Sitall* substratı üzerinde biriktirilen iki çift iç içe geçmiş altın elektrodu, bir kondüktometrik dönüştürücü olarak kullanmışlardır. Biyosensörün biyolojik tanıma elemanı, glutaraldehit kullanılarak immobilize edilen lakkaz olup, çözelti parametrelerinin (iyonik kuvvet, pH ve tampon kapasitesi) biyosensör performansı üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Biyosensörün, 1 mM'a kadar lineer aralıkla dopamine (tayin sınırı, 7.8 μM) karşı yüksek duyarlık gösterdiğini bildiren araştırmacılar ayrıca seçicilik ve yeniden kullanılabilirlik ölçümleri gerçekleştirmişlerdir. Önerilen biyosensörün, farklı koşullar altında uzun süreli raf ömrünü değerlendirmişlerdir. Geliştirilen kondüktometrik

biyosensörün biyolojik ve farmasötik numunelerdeki dopamin derişimini ölçmek için uygun olduğunu rapor etmişlerdir.

2.3. Epikateşin Tayini Çalışmaları

Jarosz-Wilkolazka vd. (2004) sundukları çalışmada *Cerrena unicolor*'dan elde edilen ve oldukça aktif bir enzim olan lakkazı grafit elektrot yüzeyine immobilize etmişler ve akış enjeksiyon sistemine yerleştirilen elektrot, flavonoidler dahil polifenollerin tayini için bir biyosensör görevi görmüştür. Tayin için hedef bileşikler olarak kateşin hidrat, epikateşin, epikateşin gallat, prodelphinidin ve kafeik asit kullanmışlardır. Gerçekleştirilen araştırmalar ile *C. unicolor*'dan elde edilen lakkazın, akış enjeksiyon sisteminde flavonoidlerin ve ilgili bileşiklerin belirlenmesi için biyosensörlerin tasarımında kullanılabileceği gösterilmiştir. Lakkaz ile modifiye edilen elektrotlar, hem basit bileşikler (kafeik asit) hem de üç veya daha fazla fenolik ve fenolik olmayan halkalı bileşikler için farklı duyarlıkta yanıt vermiştir. Araştırmacılar epikateşin için K_m değerini $178 \mu\text{M}$, doğrusal tayin aralığını $2\text{--}60 \mu\text{M}$ ve tayin sınırını $2.44 \mu\text{M}$ olarak bildirmişlerdir.

ElKaoutit vd. (2008) elektrokimyasal dönüştürücü olarak üç farklı fenol oksidaz içeren ve “Sonogel-Karbon elektrodu” olarak adlandırdıkları yeni bir elektrot tasarımını başarıyla geliştirmişlerdir. Bu amaçla *Trametes versicolor* lakkazını (Lac), Mantar tirozinazını (Tyr) ve yaban turpu peroksidazını (HRP) kullanmışlardır. İmmobilizasyon aşamasında, elektrot yüzeyinde Nafion™ kullanılmış ve gerçek bira numunelerinde beş ayrı polifenol için biyosensör yanıtları değerlendirilmiştir. Araştırmacılar geliştirilen biyosensörlerin, test edilen polifenollerin nanomolar derişimlerine duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Nafion™-Lac/Sonogel–Carbon temelli biyosensörün (-)-epikateşin için tayin sınırı, duyarlığı ve doğrusal çalışma aralığı sırasıyla $0.16 \mu\text{molL}^{-1}$, $28.139 \mu\text{molL}^{-1}$ ve $0.04\text{--}8 \mu\text{molL}^{-1}$ olarak sunulmuştur. Araştırmacılar biyosensörlerin stabilitesi ve tekrarlanabilirliğini, doğrudan gerçek bira numunelerine uygulayarak değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar Nafion™-Lac/Sonogel-Carbon sisteminin, en az üç hafta boyunca yanıtının %84'ünü koruduğunu göstermişler ve sekiz bira markasında polifenol indeksi tahminini klasik yöntemle elde edilenlerle karşılaştırmışlardır.

Rahman ve Noh (2008) lakkazın doğrudan elektrokimyasının Au nanopartikül (AuNP) ile kapsüllenmiş dendrimerler (Den) tarafından desteklendiği çalışmalarında, Den-AuNP'leri hazırlamak için, Au(III) iyonlarını önce dendrimerin içinde azot içeren ligandlar ile koordine etmişler ve daha sonra AuNP'leri oluşturmak üzere indirgenme işlemini gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar dendrimerin içinde kapsüllenen AuNP'lerin boyutunun 0.4 nm olduğunu bildirmişlerdir. Daha sonra, enzimin kovalent olarak immobilizasyonunu gerçekleştirerek lakkazın doğrudan elektrokimyası ile elektrokatalitik prosese dayalı bir kateşin biyosensörü geliştirmişlerdir. Girişim etkileri çeşitli fenolik ve polifenolik bileşiklerin varlığında incelenmiş ve biyosensörün genel uygulanabilirliği, gerçek kateşin örneklerinin analizi ile değerlendirilmiştir. Araştırmacılar kateşin analizi için doğrusal aralık ve tayin sınırı değerlerini sırasıyla 0.1–10 μM ve 0.003 μM olarak rapor etmişlerdir.

Vasilescu vd. (2016) hazırladıkları molibden disülfür (MoS_2) ve grafen kuantum dotlardan (GQD'ler) oluşturulan bir nanokompoziti, karbon bazlı perde baskılı elektrotların iletkenliğini artırmak ve aynı zamanda lakkaz immobilizasyonu için uyumlu destek materyali oluşturmak için kullanmışlardır. Modifiye edilmiş elektrodun elektroanalitik performansı üzerinde farklı modifikasyon adımlarının etkisini UV-Vis absorpsiyon, floresan spektroskopisi, taramalı elektron mikroskopu, transmisyon elektron mikroskopu, X ışını kırınımı, elektrokimyasal empedans spektroskopisi ve döngüsel voltametri ile değerlendirmişlerdir. Geliştirilen lakkaz biyosensörünün, 0.38–100 μM derişim aralığında kafeik aside verimli bir şekilde yanıt verdiği, 0.32 μM tayin sınırına ve 17.92 $\text{nA } \mu\text{M}^{-1}$ duyarlığa sahip olduğu gösterilmiştir. Önerilen analitik biyosensörün, kırmızı şarap örneklerinde toplam polifenolik içeriğin belirlenmesi için başarıyla uygulandığı ve (-)-epikateşin için 2.86–100.00 μM aralığında doğrusal bir yanıtı sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca biyosensörün duyarlılığı 16.42 $\text{nA} \mu\text{M}^{-1}$, tayin sınırı 2.04 μM ve K_m değeri 121.80 μM olarak bildirilmiştir.

Vlamidis vd. (2017) grafen oksit (GO) ve çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT'ler) ile modifiye edilmiş camısı karbon elektrotlara (GCE) dayalı amperometrik biyosensörler geliştirmişlerdir. Tirozinaz (Tyr) veya lakkaz (Lac) enzimlerini iki farklı biyoreseptör tipi olarak kullanarak iki farklı biyosensör tasarımını sunmuşlardır. Modifiye edilmiş GC üzerine enzim immobilizasyonunu, farklı ajanlar kullanarak optimize etmişlerdir ve bu biyosensörleri, katekol ve pirogallol, epikateşin, gallik asit, 1,2-dihidroksibenzoik asit, kafeik asit, klorojenik asit, rutin, kateşin ve dopamin gibi diğer

polifenollerin tayini için kullanmışlardır. Araştırmacılar sonuç olarak, meyve suyu örneklerinde epikateşin eşdeğeri olarak toplam polifenol derişimini sunmuşlar ve bu biyosensörlerin pratik uygulanabilirliklerini göstermişlerdir.

Literatürde lakkaz temelli (-)epikateşin içeren çalışmalar sınırlı sayıda yer alırken, tirozinaz temelli biyosensörlerin hazırlanmasını içeren çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmalarda elektrotlar üzerine tirozinaz enziminin immobilizasyonuna ilişkin çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Örneğin:

Arrechi vd. (2010) gıda numunelerinde fenolik bileşiklerin tayini için amperometrik biyosensör olarak kullanılmak üzere tirozinaz ile modifiye edilmiş bir elektrot modelini sunmuşlardır. Enzimi, elektro-eğirme ile hazırlanan poliamidik nanolifli bir zarla kaplanmış camı bir karbon elektrot üzerine damlatma yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Biyosensörün, 16 saniyelik bir yanıt süresi ile 0.05 µM'lik bir tayin sınırı ve 100 µM'ye kadar doğrusallık sergilediğini bildiren araştırmacılar bu biyosensörün polimerik mikrokapsüllerde kapsüllenmiş fenollerin salım kinetiğini gerçek zamanlı olarak izlemek için başarıyla kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Singh vd. (2013) kateşin tayini için destek materyali olarak nanopartikül (gümüş nanopartiküller, Au NPs)-polimer (polipirol, PPy) kompozit kullanarak kateşin tayini için bir elektrokimyasal biyosensör tasarlamışlardır. Kompoziti elektrokimyasal olarak sentezlemişler ve kompozit materyalin polimerizasyonu sırasında tirozinaz enzimini tutuklamışlardır. Gerçekleştirilen elektrokimyasal çalışmaların sonuçlarında, polimer matriksinde altın nanopartiküllerin (AuNP'ler) varlığının iletkenlikte ve akım yoğunluğunda artışa yol açtığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar AuNP'ler-PPy kompozitinin, enzim immobilizasyonu için geniş yüzey alanı sağladığını ve nanopartiküllerin (NP'ler) varlığında biyosensör yanıtında neredeyse %10'luk bir artış gösterdiğini ve dolayısıyla elektron transferini kolaylaştırdığını bildirmişlerdir. Doğrusallığın, 1×10^{-9} M– 1×10^{-8} M derişimleri arasında olduğunu ve duyarlık değerinin 6.8×10^{-5} AM⁻¹, tayin sınırı ve K_m değerlerinin sırasıyla 1.2×10^{-9} M ve 4.5×10^{-9} M olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, cevap süresi yaklaşık 10–12 saniye olan bu biyosensörün su ve elma sularında kateşin tayini için kullanılabilirliğini rapor etmişlerdir.

Hidayat vd. (2020) çeşitli yeşil çay numunelerinin toplam polifenol içeriğini (TPC) değerlendirmek için immobilize tirozinaz ve 3-metil-2-benzotiazolinon hidrazon temelli

basit bir kağıt sistemine dayanan kolorimetrik biyosensör geliştirmişlerdir. Kağıt temelli biyosensörün desenli biyoalgılama bölgesi, skanometrik bir yöntem kullanılarak daha fazla renkli görüntü analizine izin vermiş ve kateşine duyarlı bir yanıt gösterdiğini rapor etmişlerdir. Bu renk değişiminin numunelerin toplam polifenol içeriğine bağlı olduğunu bildiren araştırmacılar, biyosensörün skanometrik kurulumdaki analitik performansını optimize etmişlerdir. Biyosensörün, 0.08–1.03 mM kateşin derişimleri arasındaki doğrusal aralık için 13 dakikalık bir cevap süresi, 0.071 mM tayin sınırı (LOD) ve %3.11 standart sapma değeri ile tekrarlanabilirlik gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar yeşil çay içeceklerinin toplam polifenol içeriğini biyosensör tarafından değerlendirmişler ve sonuçları UV/Vis spektrofotometrik yöntem sonuçları ile karşılaştırmışlardır.

Das vd. (2021) biyoalgılama platformu olarak herhangi bir enzimin kullanılmadığı çalışmalarında yeşil çayda (-)-epikateşinin seçici tayini ve nicel tahminini yapmak üzere uygun maliyetli ve tekrarlanabilir bir elektrot üretmek için moleküler baskılı polimer (MIP) teknolojisini kullanmışlardır. MIP-Q@G malzemesini elde etmek için şablon olarak etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ve optik olarak aktif olmayan quersetin ile kopolimerize edilmiş akrilamid (AAm) kullanmışlardır. Sensör, 0.33 μM 'lik düşük tayin sınırına ek olarak, 1 μM –100 μM ve 100 μM –500 μM arasında iki geniş doğrusal aralığı sergilemiştir. Araştırmacılar elektrodun LOQ değerini 1.09 μM olarak rapor etmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1. Kimyasallar

Demir(III) klorür heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), demir(II) klorür tetrahidrat ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) Merck (Darmstadt, Almanya)'dan; Whatman siklopor polikarbonat membran ($0.2 \mu\text{m}$, 25 mm), amonyak (NH_3), gümüş nitrat (AgNO_3), sodyum bor hidrür (NaBH_4), L-sistein (L-Cys), kitosan, lakkaz enzimi (*Trametes versicolor*) (0.78 U/mg), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC), N-hidroksisüksinimid (NHS), nikel(II) sülfat (NiSO_4), nikel(II) klorür (NiCl_2), borik asit (H_3BO_3), alümina, dikloro metan (CH_2Cl_2), izopropil alkol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$), ticari insan serumu, kükürt tozu, grafen tozu, fosfor pentaoksit (P_2O_5), potasyum persülfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), sülfirik asit (H_2SO_4), potasyum permanganat (KMnO_4), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroklorik asit (HCl), magnezyum sülfat (MgSO_4), oleilamin ($\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{N}$), sikloheksan (C_6H_{12}), potasyum klorür (KCl), Nafion™, sodyum dodesilsülfat, askorbik asit (AA), ürik asit (AA), serotonin, gallik asit (GA), pyrogallol, guaiacol, p-Cresol, 2-Aminofenol, laktik asit, sitrik asit, sodyum bikarbonat, üre, kalsiyum klorür, sodyum klorür, magnezyum sülfat, sodyum sülfat, potasyum dihidrojen fosfat, dipotasyum hidrojen fosfat, amonyum klorür, glukoz Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya)'dan temin edilmiştir. Oktadesen ($\text{C}_{18}\text{H}_{36}$), potasyum ferrosiyaniür ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), potasyum heksasiyanoferrat ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), (-)-epikateşin, dopamin, katekol, titanyum tetraklorür (TiCl_4) Boston Chemical (ABD)'dan, 40 nm çaplı alüminyum oksit (Al_2O_3) Roth (Karlsruhe, Almanya)'dan, hidrojen tetrakloroaurat (HAuCl_4) Alfa Aesar (Haverhill, Massachusetts, ABD)'dan temin edilmiştir.

3.1.2. Cihazlar

Deneyleerde ADÜ Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan Palm Sens4 potansiyostat, Beko no frost buzdolabı, 0.1 mg duyarlıkta Radwag (AS220 C/2) analitik terazi, Memmert (Beschicung-Loading Model 100-800) etüv, Sigma (3-30 KS) santrifüj cihazı, Hanna (pH 211) pH metre, Shimadzu (UV-1900i) UV-Vis spektrofotometre, IKA (C-MAG HS7) sıcaklık ayarlı manyetik karıştırıcı, Ultrasonic (LC30) ultrasonik banyo, GFL (2001/4) saf su cihazı, Isolab (CAPP) otomatik pipetler, Millipore Simplicity UV ultra saf su cihazı ve Heidolph Reax top vorteks, vakum etüvü (Nüve-EV018), vakum pompası (Vacuumbrand ME2) ve perde baskılı karbon elektrotlar (SPE) (Methrom, DS110) kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Göl Suyu ve Musluk Suyunda Katekol Tayini için Lakkaz İmmobilize Cys-Ag@Fe₃O₄ Manyetik Nanopartiküllerle Modifiye Perde Baskılı Elektrotların Hazırlanması

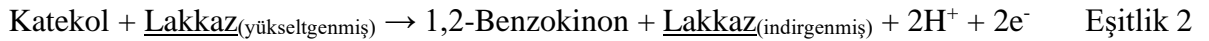
3.2.1.1. Cys-Ag@Fe₃O₄ Manyetik Nanopartiküllerin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Lakkazın Manyetik Nanopartiküllere İmmobilizasyonu

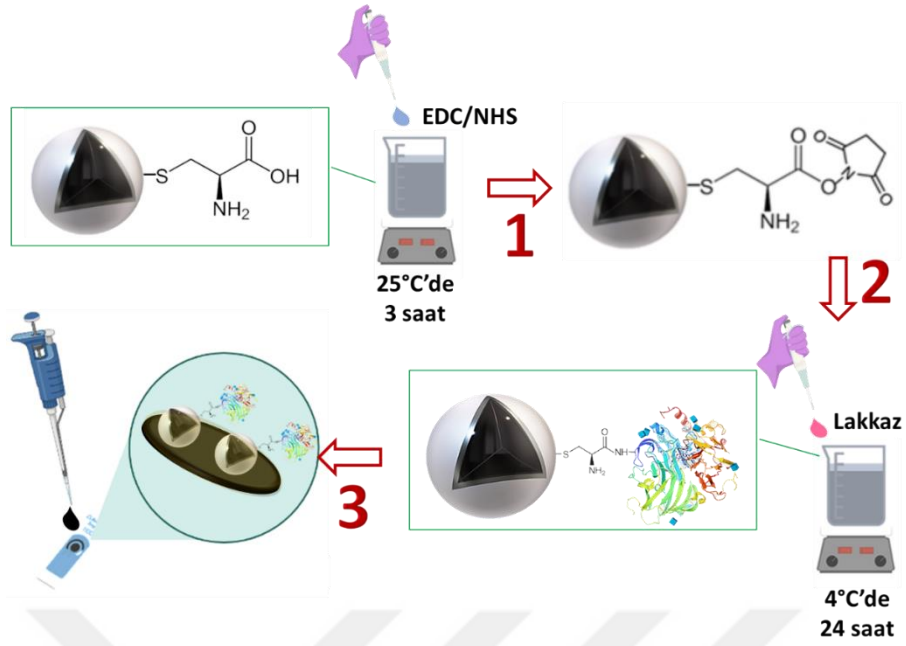
Dört mmol FeCl₃.6H₂O ve 2 mmol FeCl₂.4H₂O 50 mL ultra saf su içerisinde 90°C sıcaklıkta çözüldükten sonra bu çözelti üzerine 2.5 mL %24'lük NH₃ çözeltisi yavaşça ilave edildi ve manyetik karıştırıcıda 40 dakika boyunca karıştırıldı. Bu sürenin sonunda manyetik nanopartiküller mıknatıs yardımıyla ayrıldı ve 100 mL ultra saf su ile (18.2 MΩ cm) yıkandıktan sonra (5 kez) ultra saf su ile disperse edildi. Fe₃O₄ manyetik nanopartiküllerin gümüş ile kaplanması için 0.064 M, 20 mL AgNO₃, 100 mL ultra saf suda

disperse edilen manyetik nanopartiküller üzerine eklendi ve 5 dakika boyunca karıştırıldı. Karışıma 0.3 mM (50 mL) NaBH_4 damla damla eklenerek 30 dakika karıştırıldıktan sonra nanopartiküller mıknatıs yardımıyla ayrıldı ve sırasıyla 100 mL etanol ve su ile yıkama işlemi yapıldı (3 kez). Yıkama işleminin ardından nanopartiküller 100 mL ultra saf su ile disperse edildi (Tahmasebi ve Yamini, 2012). Gümüş kaplı manyetik nanopartiküllere lakkazın immobilizasyonunu gerçekleştirmek için nanopartiküller L-sistein ile fonksiyonelleştirildi. Bu amaçla, hazırlanan Ag kaplı manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllerin 100 mL'lik çözeltisi üzerine 0.1212 g L-sistein ve 6 mg NaBH_4 eklendi. Karışım manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırıldı ve bu sürenin sonunda bir magnet yardımıyla ayrılan nanopartiküller 100 mL saf su ile yıkandı (3 kez) (Benvidi ve Jahanbani, 2016). Yıkama işlemi yapıldıktan sonra $\text{Ag}@Fe_3O_4$ manyetik nanopartiküller 100 mL ultra saf suda disperse edildi. L-sistein bağlı $\text{Ag-Fe}_3\text{O}_4$ manyetik nanopartiküllere lakkazın immobilizasyonu için EDC (1-Etil-3-dimetilaminopropil karboimid) ve NHS (N-Hidroksisüksinimid) kimyasından yararlanılarak, L-sisteinin sahip olduğu $-\text{COOH}$ grubunun aktivasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla L-sistein fonksiyonelleştirilmiş $\text{Cys-Ag}@Fe_3O_4$ nanopartiküller, 30 mM NHS ve 150 mM EDC çözeltisi (1 mL'de) ile 3 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Bu sürenin sonunda, 2 mg/mL lakkaz çözeltisinden eklendi ve 24 saat boyunca 4°C 'de inkübe edildi. Bağlanmaya katılmayan lakkazı uzaklaştırmak için nanopartiküller ortamdan magnet yardımıyla ayrıldı ve pH 5.5 asetat (ABS) tamponu ile yıkandı. Çözelti 4°C 'de buzdolabında saklandı (Karami ve Taher, 2019). Manyetik nanopartiküllere immobilizasyonu gerçekleştirilmiş lakkaz miktarını hesaplamak için Bradford (1976) ve Lowry (1951) yöntemleri denendi. Ancak enzim preparatının oldukça saf olması nedeniyle bu yöntemlerle uygun sonuçlar elde edilemedi. Bu nedenle protein miktarı hesaplamasında 280 nm'de absorpsiyon ölçümlerinden yararlanıldı (Yavaşer, 2019). Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin boyut ve şekil özelliklerini belirlemek için Taramalı Elektron Mikroskobu tekniğinden yararlanılmak üzere ve manyetik özelliklerini belirlemek için Elektron Spin Rezonans Spektroskopisi tekniğinden yararlanılmak üzere Selçuk Üniversitesi, İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne gönderildi.

3.2.1.2. Perde Baskılı Elektrotların Lakkaz İmmobilize Cys-Ag@Fe₃O₄ Manyetik Nanopartiküller ile Modifikasyonu ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Lakkaz immobilize 2 mg/mL Cys-Ag@Fe₃O₄ manyetik nanopartiküller, %0.5'lik kitosan çözeltisiyle karıştırıldı (1:1) ve SPE'ler üzerine bu çözeltiden 7.5 µL damlatıldı. Elektrotların kuruması için oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. Hazırlanan elektrot, Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE olarak isimlendirildi (Şekil 3.1.) Yalın perde baskılı elektrotlar ve farklı bileşimlere sahip nanomalzemelerle modifiye edilmiş perde baskılı elektrotların etkin elektroaktif yüzey alanlarını karakterize etmek için her adımda, [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ dönüşümüne dayalı, 5 mM [Fe(CN)₆]^{3/4-} ve 0.1 M KCl içeren 50 mM pH 7.4 fosfat (PBS) tampon çözeltileri ile CV ölçümleri 50 mV/s tarama hızı ile -0.4 V–0.8 V potansiyel aralığında gerçekleştirildi. EIS ölçümleri ise 5x10⁻²–1x10⁵ Hz aralığında 0.2 V potansiyelde gerçekleştirildi. Ayrıca, lakkaz enziminin katekol tayininde kullanılabilirliğini değerlendirmek için elektrotlar sırasıyla, modifiye edilmemiş yalın SPE, Cys-Ag@Fe₃O₄ manyetik nanopartiküller ile modifiye edilmiş SPE'ler ve lakkaz immobilize Cys-Ag@Fe₃O₄ manyetik nanopartiküller ile modifiye edilmiş SPE'ler olarak isimlendirilerek, her bir elektrot için 50 mM pH 5.5 ABS tamponu içerisinde 50 µM katekol ile CV ölçümleri gerçekleştirildi. Böylece lakkaz enziminin reaksiyon akımını ne kadar değiştirdiğine karar vermek üzere -0.5 V ve 0.8 V aralığında ve 50 mV/s tarama hızında çalışıldı. Katekol tayini için lakkazın substratlarıyla arasındaki mekanizma, katekolün 1,2-benzokinona oksidasyonu ve elektrot yüzeyinde oksijenin suya elektrokatalitik indirgenmesiyle koordine edilir (Eşitlik 2 ve 3).





Şekil 3.1. Cys-Ag@Fe₃O₄ manyetik nanopartiküllere lakkazın immobilizasyonu ve elektrodun modifikasyonu.

3.2.1.3. Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/SPE'lerin Optimizasyonu

Katekolün lakkaz temelli biyoelektrotlar tarafından yükseltgenip, elektrot üzerinde yeniden indirgendiği reaksiyonu etkileyebilecek tüm faktörler parametre olarak çalışıldı. Bu amaçla, enzimatik reaksiyonun ürünleri, amperometrik yöntem ile tayin edildi. Amperometrik yanıtı lakkaz derişimi, Ag@Fe₃O₄ manyetik nanopartikül derişimi ve ortam pH'nın etkisi incelendi ve böylece her bir parametre için optimum çalışma aralığı belirlendi. Bu amaçla, -50 mV sabit potansiyelde, modifiye edilen her bir elektrot yüzeyine 50 mM pH 5.5 ABS tamponu damlatıldı ve sistemin dengeye gelmesiyle belirlenen akım değeri kaydedildi. Ardından, elektrot yüzeyinde 50 µM katekol olacak şekilde katekol eklemesi yapıldı. Enzimatik reaksiyon tamamlandıktan sonra yeni bir denge durumuna ulaşıldığında elde edilen akım farkı değerleri, parametre değerlerine karşı nA olarak grafiğe geçirilerek, optimum çalışma koşulları belirlendi. Her ölçümden sonra, elektrotlar tampon çözelti ve saf su ile yıkandı. Ölçümler 3 kez tekrar edildi.

Katekolün enzimatik oksidasyon reaksiyonundaki rolü nedeniyle ilk olarak lakkaz aktivitesinin etkisi değerlendirildi. Bölüm 3.2.1.1.'de anlatıldığı gibi 1 mg/mL derişimdeki Cys-Ag@Fe₃O₄ manyetik nanopartiküllere lakkaz immobilizasyonu, 50 mM pH 5.5 ABS tampon çözeltisinde gerçekleştirildi. Sırasıyla 3.12; 4.0; 5.85; 8.0 U aktivite değerleri incelendi. İkinci bir optimizasyon çalışması ise Cys-Ag@Fe₃O₄ manyetik nanopartiküllerin miktarının belirlenmesi için yapıldı. Optimum lakkaz aktivitesi seçilerek, manyetik nanopartiküllerin derişimi değiştirildi. Bu amaçla 0.1; 1.0; 2.0 ve 4.0 mg/mL manyetik nanopartikül derişimleri ile çalışıldı ve lakkazın manyetik nanopartiküllere immobilizasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra hazırlanan lakkaz bağlı nanopartiküller ile modifiye edilen elektrotlar için yukarıda belirtilen koşullarda (-50 mV sabit potansiyelde, oda sıcaklığında) amperometrik ölçümler gerçekleştirildi. Son olarak, lakkazın aktivitesine ortam pH'sının etkisini incelemek için 50 mM ABS tamponu çözeltisinde (pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5) ve 50 mM PBS tamponu çözeltisinde (pH 6.0; 6.5; 7.0) 50 µM katekol varlığında daha önce belirtilen sabit koşullar altında amperometrik ölçümler gerçekleştirildi ve katekolün en yüksek akım farkı gösterdiği pH, optimum olarak belirlendi.

3.2.1.4. Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE'lerin Kinetik ve Analitik Performansları

Göl suyu ve musluk suyunda katekol tayinine yönelik geliştirilen lakkaz immobilize Cys-Ag@Fe₃O₄ manyetik nanopartiküller temelli biyosensörün analitik ve katalitik karakterizasyonu, katekol için bir kalibrasyon grafiğinin hazırlanması ile yapıldı. Bu kalibrasyon grafiği için daha önce belirtilen amperometrik koşullarda, 50 mM pH 5.5 ABS tampon çözeltisine farklı derişimlerde katekol eklenmesiyle ölçümler gerçekleştirildi. Farklı katekol derişimlerine ait kronoamperometrik akım-zaman (*i-t*) grafiklerinden, her bir ilaveden sonra elde edilen akımdan denge akımının çıkarılması ile hesaplanan akım farkları katekol derişimine karşı grafiğe geçirildi. Ayrıca bu değerler kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve elektrot yüzeyindeki enzimin kinetik parametreleri olan K_m^{app} ve I_{max} değerleri belirlendi. Tayin sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) elektrodun amperometrik cevapları ile elde edilen kalibrasyon grafiğinin eğimi (m , elektrot duyarlılığı) ve standart sapma değeri yardımıyla, $LOD=3 \times S.S/m$ ve $LOQ=10 \times S.S/m$ eşitlikleri kullanılarak hesaplandı (Li vd., 2015). Hazırlanan modifiye elektrotların cevap süresi,

kronoamperometrik yöntemle elde edilen *i-t* grafikleri yardımıyla belirlendi. Bu amaçla elektrot için kararlı hal akımı elde edildikten sonra elektrot üzerine katekol ilave edildi ve akım cevabının tekrar kararlı hale gelmesi için geçen süre kaydedildi. Bu sürenin %95'i hesaplandı ve cevap süresi olarak belirlendi.

Lakkaz immobilize Cys-Ag@Fe₃O₄ manyetik nanopartiküller ile modifiye SPE'lerin işlemsel stabilitesini incelemek için, optimum koşullarda (25°C'da, 50 mM pH 5.5 ABS tamponu ve -50 mV sabit potansiyelde), 50 µM katekol için aynı elektrotla ard arda 12 kez ölçüm alındı ve elde edilen sonuçlarla SPE'lerin tekrar kullanılabilirliğini gösteren grafik çizildi. Ayrıca biyosensör tasarımında önemli bir parametre olan tekrar üretilebilirlik çalışmaları yapıldı. Bu amaçla, optimum koşullarda 5 özdeş elektrot hazırlandı ve bu elektrotların 50 µM katekol için amperometrik yanıtları incelendi. Seçicilik, çeşitli çevre numunelerinde bulunan toksik kimyasalların belirlenmesi için önemli bir parametredir. Bu nedenle, tasarlanan biyosensörlerin katekol tayini için güvenilir, kararlı ve seçici olduğunu göstermek için 100 µM askorbik asit (AA), 100 µM ürik asit (AA), 100 µM gallik asit (GA), 100 µM pyrogallol, 100 µM guaiacol, 100 µM p-Cresol, 100 µM (-)-epikateşin ve 100 µM 2-aminofenol bileşiklerinin amperometrik yanıtları ölçüldü ve girişim etkileri yüzde olarak hesaplandı. Ayrıca tasarlanan biyosensörün depo kararlılığı belirlendi ve bu amaçla hazırlanan elektrotlar +4°C'de saklandı ve 50 µM katekol için amperometrik yanıt 1. gün, 5. gün, 15. gün, 30. gün ve 60. gün gibi farklı zaman aralıklarında kaydedildi ve akım değerleri yüzde olarak zamana karşı grafiğe geçirildi.

3.2.1.5. Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE'lerin Göl Suyu ve Musluk Suyunda Katekol Tayini İçin Uygulanabilirliğinin Araştırılması

Gerçek su numunelerinde katekolün tayini için tasarlanan biyosensörün analitik uygulanabilirliği göl suyu ve musluk suyu kullanılarak araştırıldı. Geri kazanımlar, gerçek su numunelerine bilinen derişimlerde katekol eklendikten sonra numunelerdeki katekolün, optimum koşullar altında amperometrik yöntem ile belirlenmesiyle elde edildi. Standart ekleme deneyleri için 1 µM, 10 µM ve 100 µM olacak şekilde üç farklı katekol derişimi seçildi. Musluk suyu numuneleri, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Kimya Bölümü,

Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'ndan (Aydın, Türkiye), göl suyu numuneleri ise Ödemiş Gölcük Gölü'nden (İzmir, Türkiye) temin edildi. Ayrıca, biyosensörün uygulama sonuçları Folin-Ciocalteu yöntemi ile karşılaştırmalı analiz yapılarak değerlendirildi. Bu amaçla, 1–100 µM aralığında hazırlanan katekol kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak gerçek su numunelerinde katekol miktarı spektrofotometrik olarak tayin edildi. Bu amaçla 0.25 mL musluk suyu ve göl suyu örneklerine, 11.25 mL saf su ve 0.25'şer mL ticari olarak temin edilen Folin-Ciocalteu reaktifi eklendi. Üç dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra üzerlerine 0.75'şer mL %2'lik Na₂CO₃ eklendi ve elde edilen karışım karanlıkta iki saat boyunca çalkalayıcıda çalkalandı. Bu sürenin sonunda oluşan rengin absorbansı 760 nm'de saf suya karşı okundu (Singleton vd., 1999). Deneyler 3 kez tekrarlandı ve her iki yöntem için sonuçlar karşılaştırıldı.

3.2.2. Ticari Serum ve Yapay İdrarda Dopamin Tayini için Lakkaz İmmobilize Ni/Au/PPy-COOH Nanoteller ile Modifiye Perde Baskılı Elektrotların Hazırlanması

3.2.2.1. Ni/Au/PPy-COOH Nanotellerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Aktivasyonu

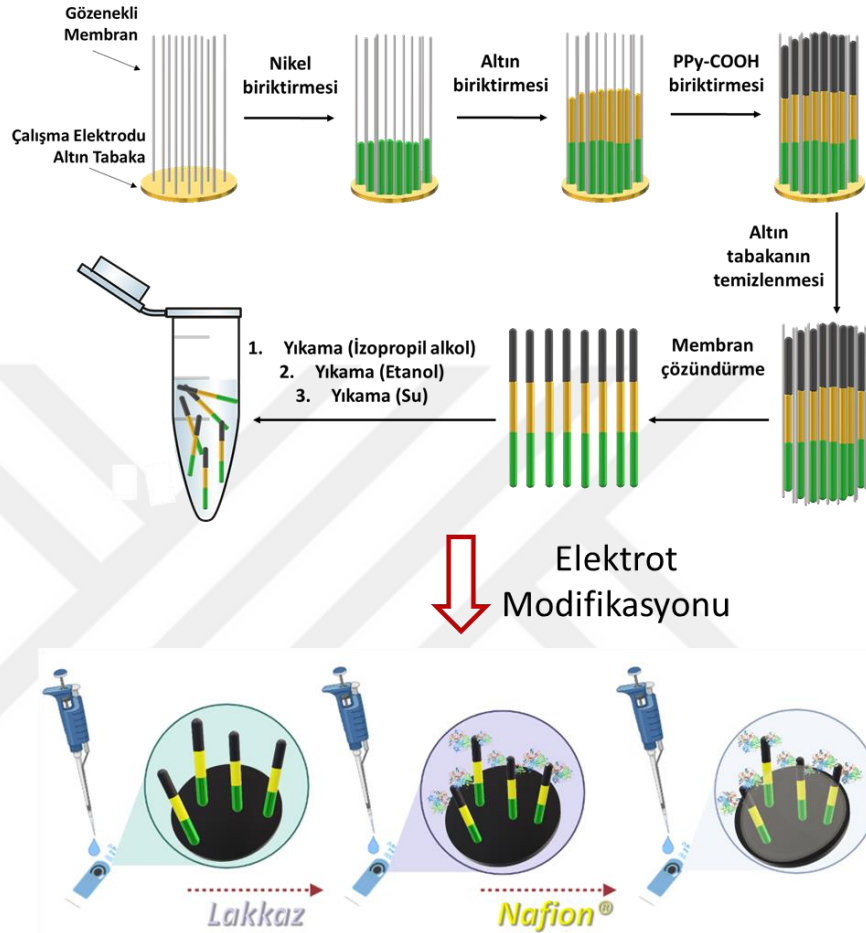
Ni/Au/PPy-COOH nanoteller, 200 nm gözenek çapına sahip ve 25 mm çapındaki polikarbonat membran içerisinde nikel, altın ve PPy-COOH'ın ardışık elektro biriktirmesi ile hazırlandı. Elektrobiriktirme işleminden önce, membranın bir yüzü çalışma elektrodu olarak kullanılmak üzere altın ile kaplandı. Membranın altın ile kaplanması, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nde gerçekleştirildi. Daha sonra membran, bir Teflon kaplama hücresine yerleştirildi ve bu sisteme elektriksel iletkenliğin oluşması için alüminyum folyo ile bir ara bir katman ile eklenerek çalışma elektrodu olarak kullanıldı. Ni, nikel standart çözeltisi kullanılarak -6 mA'de kronopotansiyometri tekniği ile biriktirildi. Daha sonra Ni segmentinin üzeri -0.95 V potansiyelde ve 2 C toplam yükte, altın çözeltisi [5 g/L (0.0127 M) kloroaurik asit ve 10 g/L (0.162 M) borik asit] ile kronoamperometri tekniği ile kaplandı. Ardından Ni/Au segmentinin üzeri PPy-COOH ile KNO₃ (7.58 mg), sodyum

dodesil sülfat (SDS) (0.288 g), poli(3,4-etilendioksitiyofen (EDOT) (12.8 µL) ve pirol 2-karboksilik asit (3.3 mg) içeren çözelti kullanılarak (toplam hacim 10 mL saf suda) 0.8 V'ta 3 C toplam yükte kronoamperometrik teknik ile kaplandı. Elektro-biriktirme işlemlerinin sonunda membran, Teflon kaplama hücrelerinden alınarak saf su ile yıkandı. Daha sonra altın tabaka alümina ile sıyrıldı ve polikarbonat membranı çözmek için membran, 1 mL'lik Ependorf tüpüne alınarak üzerine 1.0 mL diklormetan eklendi ve 30 dakika çalkalandı. Ardından 8000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılarak süpernatant atıldı. Diklormetan ile yıkama işlemi 2 kez tekrarlandı. Daha sonra 1.0 mL izopropil alkol ile yıkama yapıldı ve 9000 rpm'de 2 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Ardından, teller 1.0 mL etil alkol ile yıkandı ve 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Son olarak 1.0 mL su ile yıkanan teller 12000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Su ile yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Saf su içinde süspansiyon halindeki teller kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı (Uygun vd., 2017). Sentezlenen nanotellerin boyut ve şekil analizleri için Taramalı Elektron Mikroskopu tekniğinden yararlanıldı (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Malzeme Araştırma Merkezi). Nanotellerin manyetik özelliklerini belirlemek için Elektron Spin Rezonans Spektroskopisi tekniğinden yararlanılmak üzere örnekler Selçuk Üniversitesi, İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne gönderildi. Ni/Au/PPy-COOH nanotellerin aktivasyonu için EDC/NHS kimyası kullanıldı. Tampon çözelti ile yıkanan nanoteller, bir mıknatıs yardımıyla çöktürüldü ve 500 µL 30 mM NHS ve 150 mM EDC içeren çözelti (100 mM pH 5.0 ABS tamponunda) eklenerek yeniden süspansiyon edildi. Aktivasyon işlemi için çözelti 3 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

3.2.2.2. Perde Baskılı Elektrotların Modifikasyonu ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Perde baskılı elektrodun çalışma elektrodu kısmına 10 µL aktive edilen Ni/Au/PPy-COOH nanotellerden damlatıldı ve vakum etüvü yardımıyla kurutuldu (15 dakika boyunca, 25°C'de, -0.5 bar basınçta). Daha sonra 10 µL 5 mg/mL lakkaz (50 mM pH 5.5 ABS tamponunda) damlatıldı ve vakum etüvünde aynı koşullar altında kurutuldu. Son olarak, 5 µL %1'lik Nafion™ (50 mM pH 5.5 ABS tamponunda) çözeltisinden damlatıldı ve vakum

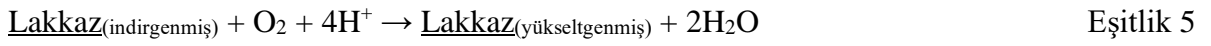
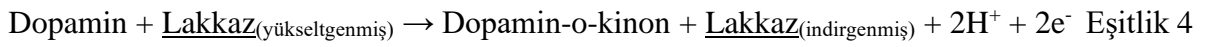
etüvünde yukarıda belirtilen koşullarda kurutuldu. Hazırlanan elektrot Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE olarak isimlendirildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Ni/Au/PPy-COOH nanotellerin hazırlanması ve elektrot modifikasyonun şematik gösterimi.

Yalın perde baskılı elektrotların, Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE ve Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin yük transfer özelliklerini karakterize etmek için CV ve EIS ölçümleri, 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ ve 0.1 M KCl içeren 50 mM pH 7.4 PBS tampon çözeltilerinde yapıldı. CV ölçümleri 50 mV/s tarama hızı ile -0.4 V–0.8 V potansiyel aralığında gerçekleştirildi. EIS ölçümleri ise 5×10^{-2} – 1×10^5 Hz aralığında 0.2 V potansiyelde gerçekleştirildi. Yalın ve modifiye elektrotların farklılaşması, etkin elektroaktif yüzey alanını karakterize etmek için her adımda CV ölçümleri ile kontrol edildi. Bu aşamada

lakkaz enziminin dopamin tayininde kullanılabilirliğini değerlendirmek için elektrotlar sırasıyla, modifiye edilmemiş yalın SPE, Ni/Au/PPy-COOH nanoteller ile modifiye edilmiş SPE'ler ve Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH nanoteller ile modifiye edilmiş SPE'ler olarak seçildi. Her bir elektrot için, 50 mM pH 6.5 PBS tampon çözeltisi içinde 10 µM dopamin varlığında CV ölçümleri gerçekleştirildi ve böylece lakkaz enziminin reaksiyon akımını ne kadar değiştirdiğine karar verildi. Bu amaçla -0.4 V–0.8 V aralığında ve 50 mV/s tarama hızında çalışıldı. Dopaminin elektrokimyasal oksidasyonu esas olarak, tüm katekolaminlerin tipik reaksiyonunda olduğu gibi katekol kısmının orto-kinona oksidasyonudur (Eşitlik 4 ve 5).



3.2.2.3. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin Optimizasyonu

Dopaminin elektrokimyasal tayinin temelini oluşturan ve fizyolojik koşullar altında gerçekleşen $2\text{e}^-/2\text{H}^+$ redoks reaksiyonu sayesinde elde edilen akım; uygulama potansiyeli, ortam pH'ı, elektroaktif moleküllerin derişimine bağlıdır ve optimize koşullar bu bileşiklerin tayinin en doğru şekilde mümkün kılar. Bu amaçla, enzimatik reaksiyonun ürünleri amperometrik yöntem ile tayin edildi ve amperometrik yanıtta çalışma potansiyelinin, Ni/Au/PPy-COOH nanotel derişiminin, ortam pH'ının, dopamin derişiminin ve diğer elektroaktif türlerin varlığının etkisi incelendi. Böylece her bir parametre için optimum çalışma koşulu belirlendi.

Dopaminin enzimatik reaksiyonundaki önemli rolü ve ayrıca diğer elektroaktif türlerin girişim etkisinin önemi nedeniyle ilk olarak çalışma potansiyelinin etkisi değerlendirildi. Potansiyeldeki herhangi bir değişim, akımda değişikliğe sebep olacağından sabit dopamin derişiminde (10 µM DOP) farklı potansiyel aralıklarında (-0.1; -0.125; 0.15; -0.2 V) modifiye edilen her bir elektrot yüzeyine 50 mM pH 6.5 PBS (fosfat) tamponu damlatıldı ve sistem dengeye geldiğinde saptanan akım değeri kaydedildi. Ardından, elektrot yüzeyinde 10 µM dopamin olacak şekilde stok dopamin çözeltisinden ekleme yapıldı ve yeni bir denge

durumuna ulaşıldığında her iki denge durumu arasındaki fark μA olarak kaydedildi. Elde edilen veriler, potansiyel değerlerine karşı akım olarak grafiğe geçirilerek, optimum çalışma potansiyeli belirlendi. İkinci bir optimizasyon çalışması ise kullanılacak Ni/Au/PPy-COOH nanotel miktarının belirlenmesi için yapıldı. Bu amaçla SPE'ler üzerine Bölüm 3.2.2.1'de anlatıldığı gibi optimum koşullar altında, 0.08; 0.12; 0.16; 0.24 ve 0.32 mg/mL derişimindeki Ni/Au/PPy-COOH nanotel çözeltilerinden damlatıldı ve daha sonra sırasıyla 5 mg/mL lakkaz ve %1'lik Nafion™ ile modifikasyon gerçekleştirildi. Modifiye edilen elektrotlar için daha önce belirlenen optimum çalışma potansiyelinde ve sabit dopamin derişiminde (-0.2 V sabit potansiyelde, 10 μM dopamin) amperometrik ölçümler gerçekleştirildi. Elde edilen veriler, nanotel miktarı değerlerine karşı akım değişimi μA olarak grafiğe geçirilerek, optimum nanotel derişimi belirlendi. Son olarak, lakkaz enziminin aktivitesine ortam pH'nın etkisini incelemek için 50 mM ABS tamponu çözeltilerinde (pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5), 50 mM PBS tamponu çözeltilerinde (pH 6.0, 6.5, 7.0 ve 7.5) ve 50 mM karbonat tamponu çözeltilerinde (pH 8.0) 10 μM dopamin varlığında daha önce belirtilen sabit koşullar altında (-0.2 V sabit potansiyelde, 0.16 mg/mL nanotel derişimi, 5 mg/mL lakkaz ve %1'lik Nafion™ ile modifiye edilmiş elektrotlar ile) amperometrik ölçümler gerçekleştirildi ve dopaminin en yüksek duyarlılığının gözlemlendiği pH, optimum olarak belirlendi.

3.2.2.4. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin Kinetik ve Analitik Performansları

Ticari serum ve yapay idrarda dopamin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün analitik ve katalitik karakterizasyonu, dopamin için bir kalibrasyon grafiğinin hazırlanması ile yapıldı. Bu kalibrasyon grafiği için daha önce belirtilen amperometrik koşullarda, 50 mM pH 6.5 PBS tampon çözeltilerine farklı derişimlerde dopamin eklenerek ölçümler gerçekleştirildi. Farklı dopamin derişimlerine ait kronoamperometrik akım-zaman ($i-t$) grafiklerinde, her bir ilaveden sonra elde edilen akımdan, son durumda ulaşılan denge akımının çıkarılması ile hesaplanan akım farkları (Δi , μA) dopamin derişimine (μM) karşı grafiğe geçirildi. Ayrıca bu değerler ile Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve elektrot yüzeyindeki enzimin kinetik parametreleri olan K_m^{app} ve I_{max} belirlendi. Tayin sınırı (LOD) ve ölçüm sınırı (LOQ) elektrodun amperometrik cevapları ile elde edilen kalibrasyon

grafiğinin eğimi (m , elektrot duyarlılığı) ve standart sapma yardımıyla, $LOD=3 \times S.S/m$ ve $LOQ=10 \times S.S/m$ eşitlikleri kullanılarak hesaplandı. Hazırlanan modifiye elektrotların cevap süresi, kronoamperometrik yöntemle elde edilen $i-t$ grafikleri yardımıyla belirlendi. Bu amaçla elektrot için kararlı hal akımı elde edildikten sonra elektrot üzerine dopamin ilave edildi ve akım cevabının tekrar kararlı hale gelmesi için geçen süre kaydedildi. Bu sürenin %95'i hesaplandı ve cevap süresi olarak belirlendi.

Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin tekrar kullanılabilirliğini incelemek için, optimum koşullarda ($25^{\circ}C$ 'da, 50 mM pH 6.5 PBS tamponu ve -0.2 V sabit potansiyelde), 10 μM dopamin için aynı elektrotla ard arda 15 ölçüm alındı ve elde edilen sonuçlarla elektrodun tekrar kullanılabilirliğini gösteren grafik çizildi. Ayrıca biyosensör tasarımında önemli bir parametre olan tekrar üretilebilirlik çalışmaları yapıldı. Bu amaçla, optimum koşullarda 5 özdeş elektrot hazırlandı ve bu elektrotların 10 μM dopamin için amperometrik yanıtları incelendi. Tasarlanan biyosensörlerin dopamin tayininde güvenilir, kararlı ve seçici olduğunu göstermek için insan serumundaki normal miktarları referans alınarak 0.5 mM ürik asit (UA), 0.05 mM askorbik asit (AA), 0.25 mM L-sistein (Cys), 1.5 μM serotonin (SER) ve 5.5 mM glukoz (GLU) bileşiklerinin sırasıyla reaksiyon ortamına eklenmesiyle elde edilen amperometrik yanıtlar yüzde olarak hesaplandı. Ayrıca tasarlanan biyosensörün depo kararlılığının belirlenmesi için hazırlanan elektrotlar $+4^{\circ}C$ 'de saklandı ve 10 μM dopamin için amperometrik yanıt 1. gün, 5. gün, 10. gün, 15. gün, 30. gün, 45. gün ve 60. günde kaydedildi.

3.2.2.5. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin Ticari Serum ve Yapay İdrarda Dopamin Tayini İçin Uygulanabilirliğinin Araştırılması

Dopaminin biyolojik sıvılarda tayini için tasarlanan biyosensörün analitik uygulanabilirliği ticari insan serumu ve yapay idrar kullanılarak araştırıldı. Ticari insan serumu Sigma'dan temin edilirken, yapay idrar örneği laboratuvarında hazırlandı. Özetle, 1.1 mM laktik asit, 2.0 mM sitrik asit, 25 mM sodyum bikarbonat, 170 mM üre, 2.5 mM kalsiyum klorür, 90 mM sodyum klorür, 2.0 mM magnezyum sülfat, 10.0 mM sodyum sülfat, 7.0 mM potasyum dihidrojen fosfat, 7.0 mM dipotasyum hidrojen fosfat ve 25 mM

amonyum klorür 1 L ultra saf su içerisinde çözöldü. Çözeltinin pH'ı 0.1 M'lık HCl ile 6.0'a ayarlandı ve yapay idrar olarak kullanıldı (Mohammadi vd., 2015). Geri kazanımlar, biyolojik örneklere bilinen derişimlerde dopamin eklendikten sonra dopaminin, optimum koşullar altında amperometrik yöntem ile belirlenmesiyle elde edildi. Standart ekleme deneyleri için 0.01 µM, 0.1 µM ve 1.0 µM olacak şekilde üç farklı dopamin derişimi seçildi ve 50 mM pH 6.5 PBS tampon çözeltisi ile 2 kat seyreltilmiş serum örneği ve seyreltilmeyen idrar örneğine dopamin eklemeleri yapıldı. Ticari serum ve yapay idrar için elde edilen sonuçlar çizelge haline getirilerek karşılaştırıldı.

3.2.3. Şarapta ve Meyve Suyunda (-)-Epikateşin Tayini için Lakkaz Temelli GO/TiS₂ Nanokompozitlerle Modifiye Perde Baskılı Elektrotların Hazırlanması

3.2.3.1. GO/TiS₂ Nanokompozitlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

GO/TiS₂ nanokompozitlerin sentezi için öncelikle sırasıyla 2D grafen ve TiS₂ nanotabakalar sentezlendi. Grafen oksit sentezi için, 80°C'ye ayarlanmış bir su banyosu içerisinde 1 g P₂O₅, 1 g K₂S₂O₈ ve 3 mL H₂SO₄ çözeltisi içeren bir beher yerleştirildi. Çözelti 80°C'de sabit tutulduktan sonra içerisinde 2 g grafit tozu yavaşça eklendi ve 1 saat su banyosunda bekletildi. Bu sürenin sonunda çözelti su banyosundan alınıp, 6 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi ve ardından nötr pH elde edilene kadar saf su ile yıkama işlemi yapıldı. Elde edilen katı, buz banyosunda 23 mL H₂SO₄ ve 3 g KMnO₄ ile karıştırıldı. Daha sonra çözeltinin sıcaklığı 35°C'ye çıkarıldı ve üzerine 92 mL H₂O eklendi ve 2 saat boyunca bu sıcaklıkta bekletildi. Bu süre sonunda çözelti üzerine 500 mL H₂O ve 5 mL H₂O₂ (%30'luk) eklendi. Elde edilen katı 1:10 (v/v) HCl ile yıkandı ve kurutuldu (Hummers ve Offeman, 1958).

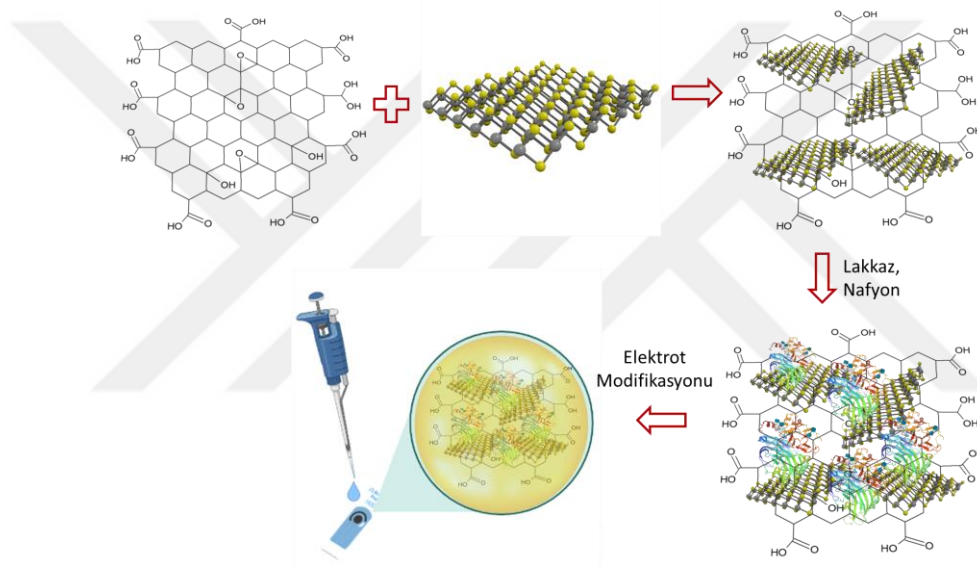
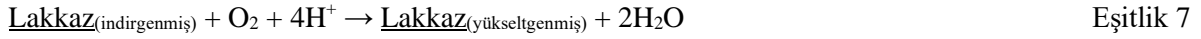
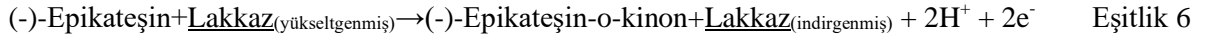
TiS₂ nanotabakaların sentezi Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Organik Kimya Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. TiS₂ nanotabakaların sentezi için öncelikle oleilamin ve oktadesen çözeltileri nem gidermek için 30 dakika boyunca MgSO₄ (hidratsız) ile karıştırıldı. MgSO₄ süzölerek uzaklaştırıldı ve 20

mL oleilamin, 10 mL oktadesen ve 1 mmol $TiCl_4$ üç boyunlu balon içerisine alındı. Bu çözelti $140^\circ C$ 'de 30 dakika boyunca argon gazı altında manyetik olarak karıştırıldı. Sıcaklık hızlıca $300^\circ C$ 'ye yükseltildi ve 30 dakika daha karıştırıldı. Ayrı bir beherde 5 mL oleilamin içerisine 2 mmol kükürt tozu eklendi ve bu çözelti bir enjektör yardımıyla yaklaşık 20 dakika içerisinde damla damla üç boyunlu balondaki çözelti içerisine eklendi. Ekleme işlemi bittikten sonra balon $300^\circ C$ 'de 90 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve bu sürenin sonunda soğutuldu. Elde edilen çözelti, 12000 g'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi ve elde edilen katı organik safsızlıkları uzaklaştırmak için önce 20 mL sikloheksan ile daha sonra üç kez 20 mL etanol ile yıkandı (Hao vd., 2017). Sentezlenen nanotabakaların morfolojilerini ve bileşimini belirlemek için Atatürk Üniversitesi, Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne gönderilerek Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) tekniğinden yararlanıldı. GO/ TiS_2 nanokompozit sentezi için 1:1 (v/v) etanol:su çözeltisinde 0.5 mg/mL GO ve 0.5 mg/mL TiS_2 disperse edildi ve 2 saat boyunca 40 kHz şiddetinde ultrasonikatör içerisinde tutuldu (Pal vd., 2021). Elde edilen koloidal dispersiyon lakkazın adsorpsiyonu için kullanıldı. Bu amaçla kompozitler çöktürüldü ve 1 mL 10 mg/mL lakkaz çözeltisi (50 mM pH 5.0 ABS tamponunda) ile muamele edildi. Bu çözelti üzerine %5'lik Nafion™ (50 mM pH 5.0 ABS tamponunda) çözeltisinden 200 µL damlatıldı ve 30 dakika buz banyosunda bekletilerek kararlı bir jel yapısı hazırlandı.

3.2.3.2. Perde Baskılı Elektrotların Modifikasyonu ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Bölüm 3.2.3.1'de hazırlanan jelden perde baskılı elektrot üzerine 7 µL damlatılarak 1 gece $+4^\circ C$ 'de bekletildi (Zhang vd., 2020a). Hazırlanan elektrot Lakkaz-GO/ TiS_2 -NAF/SPE olarak isimlendirildi (Şekil 3.3). Yalın ve modifiye elektrotların farklılaşması, etkin elektroaktif yüzey alanını karakterize etmek için, her adımda CV ve EIS ölçümleri ile kontrol edildi. Bu aşamada lakkaz enziminin (-)-epikateşin tayininde kullanılabilirliğini değerlendirmek amacıyla elektrotlar sırasıyla, modifiye edilmemiş yalın SPE, TiS_2 nanotabakalar ile modifiye edilmiş SPE'ler, GO ile modifiye edilmiş SPE'ler, GO/ TiS_2 nanokompozitlerle ve lakkaz adsorbe GO/ TiS_2 nanokompozitlerle modifiye edilmiş SPE'ler

olarak hazırlandı. Hazırlanan elektrotlar ile 50 mM pH 5.0 ABS tampon çözeltisi içinde 100 μM (-)-epikateşin varlığında CV ölçümleri gerçekleştirildi ve lakkaz enziminin reaksiyon akımını ne kadar değiştirdiğine karar verildi. Deneyle -0.4 V ve 0.8 V potansiyel aralığında 100 mV/s tarama hızında gerçekleştirildi. Elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektrokatalitik mekanizma Eşitlik 6 ve 7’de verilmiştir.



Şekil 3.3. GO/TiS₂ nanokompozitlerinin hazırlanması ve elektrodun modifikasyonu.

3.2.3.3. Lakkaz-GO/TiS₂/NAF/SPE’lerin Optimizasyonu

Diğer elektroaktif türlerin girişim etkisinin önemi nedeniyle ilk olarak çalışma potansiyeli değerlendirildi. Potansiyeldeki herhangi bir değişim, cevap akımında değişikliğe sebep olacağından farklı potansiyel değerlerinde (-0.1, -0.2, 0.3, -0.4, -0.5, -0.6, -0.7, -0.8, -0.9 V), modifiye edilen her bir elektrot yüzeyine 100 μL 50 mM pH 5.0 ABS tamponu damlatıldı ve sistemin dengeye gelmesiyle belirlenen akım değerleri kaydedildi. Ardından, elektrot yüzeyinde 100 μM (-)-epikateşin olacak şekilde stok çözeltisinden ekleme yapıldı

ve yeni bir denge durumuna ulaşıldığında iki denge durumu arasındaki fark μA olarak kaydedildi. Elde edilen veriler, potansiyel değerlerine karşı akım grafiğine geçirilerek, optimum çalışma potansiyeli belirlendi. (-)-Epikateşinin enzimatik oksidasyon reaksiyonundaki rolü nedeniyle lakkaz miktarının etkisi değerlendirildi. GO/TiS₂ nanokompozitlere lakkaz adsorpsiyonu, farklı miktarlarda lakkaz enzimi kullanılarak (0.78; 1.56; 2.34; 3.12 ve 3.9 U) gerçekleştirildi. Elde edilen veriler, enzim miktarı (U) değerlerine karşı μA olarak grafiğe geçirilerek, optimum lakkaz miktarı belirlendi. Son olarak, biyosensör cevabına ortam pH'nın etkisini incelemek için 50 mM ABS tamponu çözeltilerinde (pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5), 50 mM PBS tamponu çözeltilerinde (pH 6.0, 6.5, 7.0 ve 7.5) ve 50 mM karbonat tamponu çözeltilerinde (pH 8.0 ve 9.0) 100 μM (-)-epikateşin varlığında daha önce belirtilen sabit koşullar altında amperometrik ölçümler gerçekleştirildi ve optimum pH belirlendi.

3.2.3.4. Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE'lerin Kinetik ve Analitik Performansları

Şarap ve meyve suyu örneklerinde (-)-epikateşin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün analitik ve katalitik karakterizasyonu, (-)-epikateşin için bir kalibrasyon grafiğinin hazırlanması ile gerçekleştirildi. Bu kalibrasyon grafiği için daha önce belirlenen amperometrik koşullarda, 100 μL 50 mM pH 5.0 ABS tampon çözeltisine farklı derişimlerde (-)-epikateşin eklenerek ölçümler yapıldı. Farklı (-)-epikateşin derişimlerine ait kronoamperometrik akım-zaman (*i-t*) grafiklerinde, her bir ilaveden sonra elde edilen akımdan, son durumda ulaşılan denge akımının çıkarılması ile hesaplanan akım farkları (Δi , μA) (-)-epikateşin derişimine (μM) karşı grafiğe geçirildi. Ayrıca bu değerler kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizilerek, elektrot yüzeyindeki enzimin kinetik parametreleri, K_m^{app} ve I_{max} belirlendi. Tayin sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) elektrodun amperometrik cevapları ile elde edilen kalibrasyon grafiğinin eğimi (m , elektrot duyarlığı) ve standart sapma yardımıyla, $\text{LOD}=3 \times S.S/m$ ve $\text{LOQ}=10 \times S.S/m$ eşitlikleri kullanılarak hesaplandı. Hazırlanan modifiye elektrotların cevap süresi, kronoamperometrik yöntemle elde edilen zamana karşı akım grafikleri yardımıyla belirlendi. Bu amaçla elektrot için kararlı hal akımı elde edildikten sonra elektrot üzerine (-)-epikateşin ilave edildi ve akım

cevabının tekrar kararlı hale gelmesi için geçen süre kaydedildi. Bu sürenin %95'i hesaplandı ve cevap süresi olarak belirlendi.

Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE'lerin tekrar kullanılabilirliğini incelemek için, optimum koşullarda 100 µM (-)-epikateşin için aynı elektrotla ard arda 15 ölçüm alındı ve elde edilen sonuçlarla elektrodun tekrar kullanılabilirliğini gösteren grafik çizildi. Ayrıca biyosensör tasarımında önemli bir parametre olan tekrar üretilebilirlik çalışmaları yapıldı. Bu amaçla, optimum koşullarda 5 özdeş elektrot hazırlandı ve bu elektrotların 100 µM (-)-epikateşin için amperometrik yanıtları incelendi. Bazı polifenolik bileşiklerin girişim etkisini incelemek için bu bileşikler reaksiyon ortamına ilave edilerek, verdikleri yanıtlar amperometrik olarak ölçüldü. Bu amaçla, 300 µM gallik asit (GA), 300 µM kafeik asit (CA), 100 µM resveratrol (RES), 200 µM quercetin (QUER), 100 µM rutin (RUT), 100 µM siyanidin (CY) ve 100 µM klorojenik asit (KA) bileşiklerinin sırasıyla reaksiyon ortamına eklenmesiyle elde edilen amperometrik yanıtlar yüzde olarak hesaplandı. Ayrıca tasarlanan biyosensörün depo kararlılığının belirlenmesi için hazırlanan elektrotlar +4°C'de saklandı ve 100 µM (-)-epikateşin için amperometrik yanıt 1. gün, 15. gün, 30. gün, 45. gün, 60. gün, 75. gün ve 90. gün zaman aralıklarında kaydedildi.

3.2.3.5. Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE'lerin Şarapta ve Meyve Suyunda (-)-Epikateşin Tayini İçin Uygulanabilirliğinin Araştırılması

Önerilen biyosensörün (-)-epikateşin tayininde kullanılabilirliğini araştırmak için, şarap ve meyve suyu numuneleri kullanıldı. Ticari olarak temin edilen kırmızı şarap (shiraz) ve meyve suyu örneklerinde toplam polifenol derişimini değerlendirmek için hazırlanan Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE biyosensörü ve Folin-Ciatalou yöntemi karşılaştırıldı. Hazırlanan biyosensör ile numunelerdeki (-)-epitakeşin miktarı, optimum koşullar altında amperometrik yöntemle belirlendi. Numuneler, daha önce çeşitli yöntemlerle rapor edilen toplam polifenol içeriklerine göre seçildi (Gualandi vd., 2015; Di Fusco vd., 2010). İlk olarak, kırmızı şarap ve meyve suyu 50 mM ABS pH 5.0 tamponu ile 1:10 oranında seyreltildi. Gerçek numuneler için elde edilen toplam polifenol derişimleri, polifenol referans bileşiği olarak (-)-epikateşin seçildiğinden, epikateşin eşdeğerleri olarak ifade

edildi. Öncelikle, (-)-epikateşinin eklenmediği şarap ve meyve suyu örnekler ve ardından 10 μM derişiminde (-)-epikateşin eklenen örnekler için toplam polifenol derişimi belirlendi. Geri kazanımlar daha sonra bir çizelge hazırlanarak özetlendi. Ayrıca spektrofotometrik Folin-Ciocalteu yöntemi için kalibrasyon grafiği 0.1-250 μM aralığında hazırlandı ve bu grafikten yararlanılarak kırmızı şarap ve meyve suyu örneklerinde (-)-epitakeşin miktarı tayin edildi. Bu amaçla 0.25 mL şarap ve meyve suyu örneklerine, 11.25 mL saf su ve 0.25'şer mL ticari olarak temin edilen Folin-Ciocalteu reaktifi eklendi. Üç dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra üzerlerine 0.75'şer mL %2'lik Na_2CO_3 eklendi ve elde edilen karışım karanlıkta iki saat boyunca çalkalayıcıda çalkalandı. Bu sürenin sonunda oluşan çözeltideki rengin absorbansı 760 nm'de saf suya karşı okundu (Singleton vd., 1999). Deneyler 3 kez tekrarlandı ve her iki yöntemin sonuçları karşılaştırıldı.



4. BULGULAR

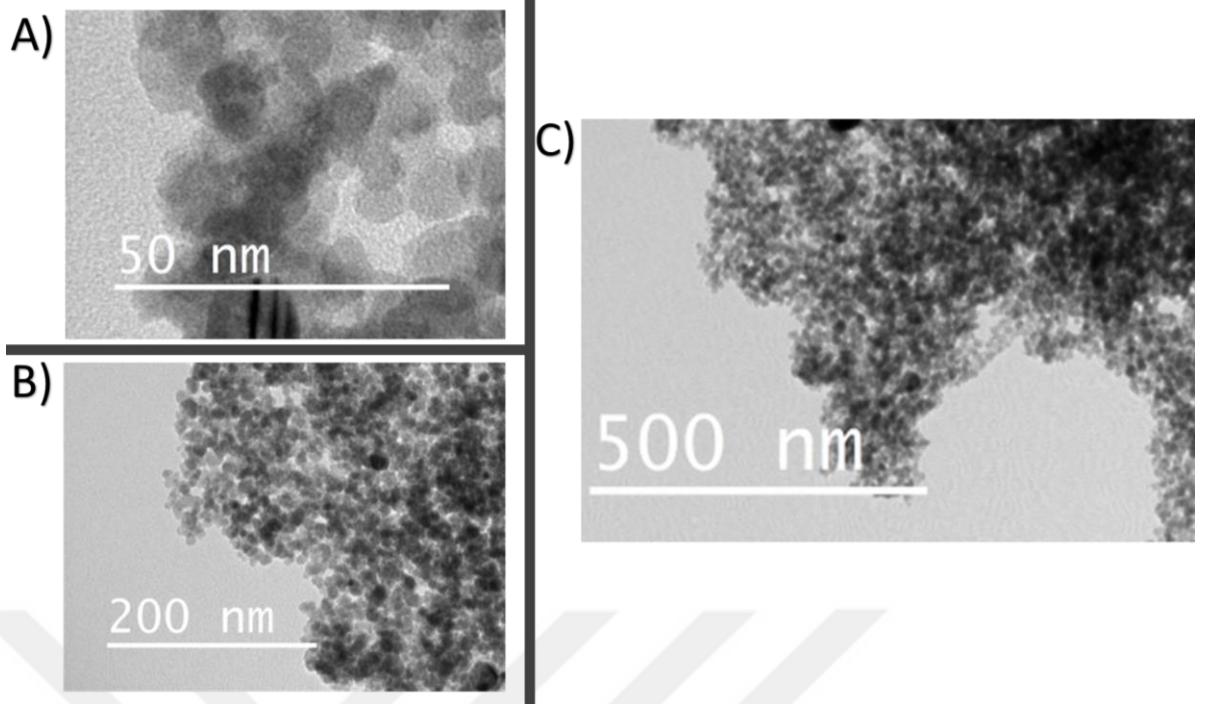
4.1. Göl Suyu ve Musluk Suyunda Katekol Tayini için Lakkaz Temelli Cys-Ag@Fe₃O₄ Manyetik Nanopartiküllerle Modifiye Perde Baskılı Elektrotların Hazırlanması

4.1.1. Cys-Ag@Fe₃O₄ Manyetik Nanopartiküllerin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Lakkazın Manyetik Nanopartiküllere İmmobilizasyonu

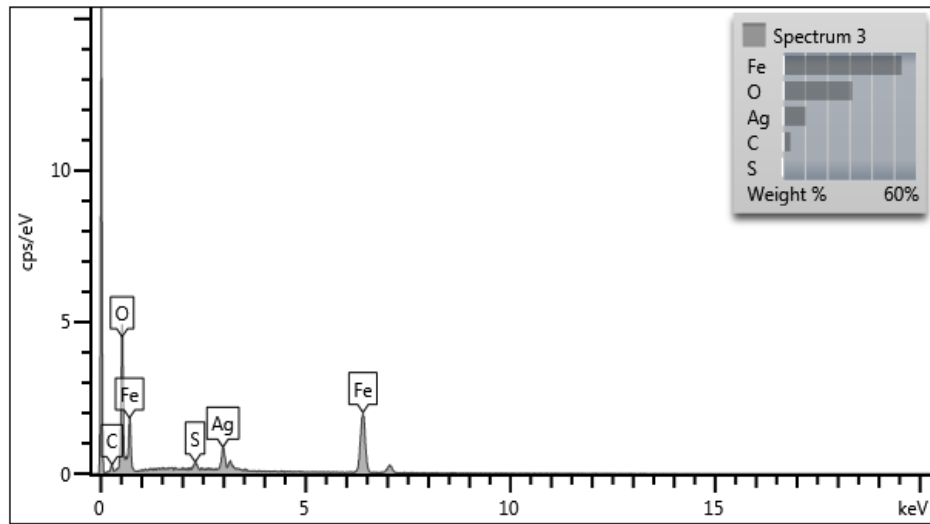
Sentezlenen L-Sistein ile fonksiyonelleştirilmiş ve Ag kaplı Fe₃O₄ manyetik nanopartiküllerinin TEM ve EDX analizleri Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde bulunan Geçirimli Elektron Mikroskobu ile gerçekleştirilmiştir (TEM, JEOL-JEL 2100, Tokyo, Japonya). Cys-Ag@Fe₃O₄ manyetik nanopartiküllerinin ortalama 10 nm civarında boyutlara sahip küresel yapısını gösteren TEM görüntüleri Resim 4.1'de ve EDX analiz sonuçları Resim 4.2'de verilmiştir.

Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin manyetik özelliklerini belirlemek için Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde bulunan Elektron Spin Rezonans cihazından (JEOL/JESFA-300) faydalanılmıştır. Cys ile fonksiyonelleştirilmiş ve Ag kaplı Fe₃O₄ nanopartiküllerin manyetik özelliği hakkında bilgi veren ESR spektrumu Resim 4.3'de gösterilmiştir ve bu spektrumdan elde edilen H_f değeri (manyetik alan rezonansı) kullanılarak g faktörü 1.95 olarak hesaplanmıştır.

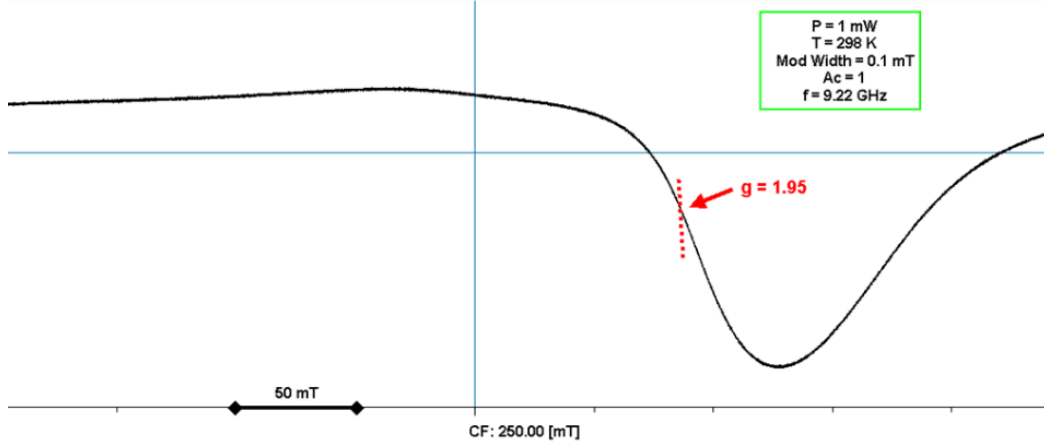
Çalışmanın bu kısmında sentezlenen Cys-Ag@Fe₃O₄ manyetik nanopartiküllere lakkaz immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve 280 nm'de absorbans okunması ile bağlanan enzim miktarı 571.8 mg/g nanopartikül olarak hesaplanmıştır.



Resim 4.1. Cys-Ag@Fe₃O₄ manyetik nanopartiküllerin TEM görüntüleri A) 50 nm, B) 200 nm, C) 500 nm ölçek.



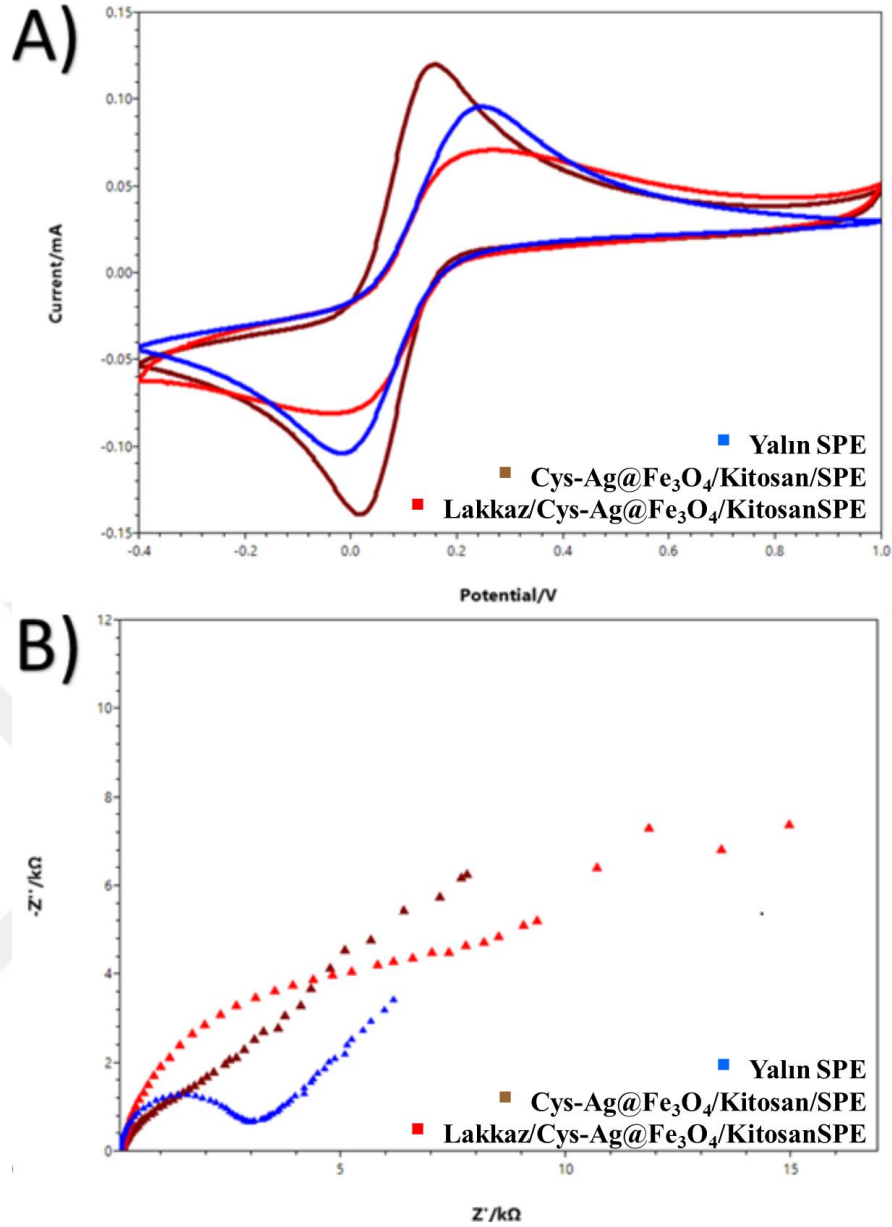
Resim 4.2. Cys-Ag@Fe₃O₄ manyetik nanopartiküllerin EDX spektrumu.



Resim 4.3. Cys-Ag@Fe₃O₄ manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumu.

4.1.2. Perde Baskılı Elektrotların Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄ ile Modifikasyonu ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu

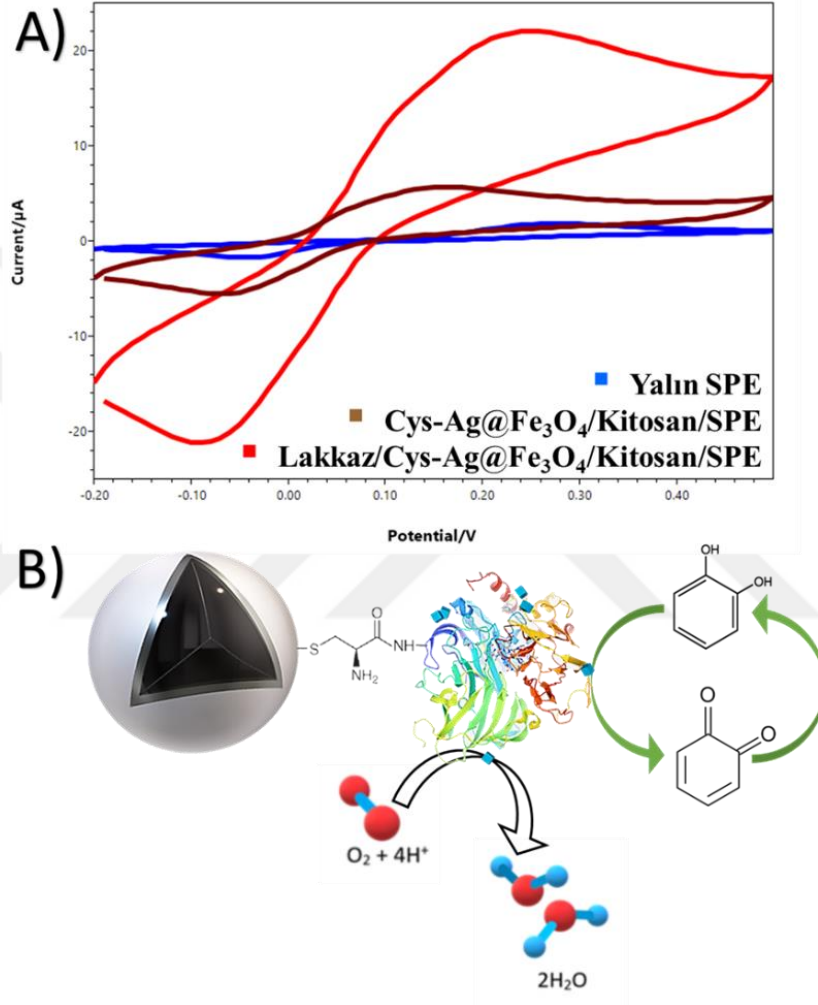
Yalın SPE'lerin, Cys-Ag@Fe₃O₄ manyetik nanopartiküller ile modifiye edilmiş SPE'lerin ve Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan ile modifiye edilmiş SPE'lerin yük transfer özelliklerini karakterize etmek için CV ve EIS ölçümleri, 5 mM [Fe(CN)₆]^{3/4-} ve 0.1 M KCl içeren 50 mM pH 7.4 PBS tampon çözeltileri ile yapılmıştır. Resim 4.4A'da yalın perde baskılı elektrotlar ve farklı bileşimlere sahip nanomalzemelerle modifiye edilmiş perde baskılı elektrotlara ait, [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ dönüşümü için iyi tanımlanmış pik zirveleri gözlenmiştir. Ancak yalın SPE'lere ait redoks akım pikleri sırasıyla 0.9 mA ve -0.9 mA iken, Cys-Ag@Fe₃O₄/SPE'lere ait redoks akım pikleri 0.13 mA ve -0.13 mA değerlerinde gözlenmiştir. Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan ile modifiye edilmiş SPE'lere ait redoks akım piklerinde ise düşüş gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar EIS deneyleri ile desteklenmiştir. Resim 4.4B'de verilen Nyquist grafiklerinde, tüm eğrilerin hem elektron transferi hem de difüzyon sürecinin aynı anda gerçekleştiğini gösteren yarım daire ve düz bir çizgiden oluştuğu görülmektedir. Fitlenmiş sonuçlara göre yalın SPE'lerin ve Cys-Ag@Fe₃O₄/SPE'lerin elektron transfer dirençleri (R_{ct}) sırasıyla 2869 Ω ve 1115 Ω olarak bulunmuştur. Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan ile modifiye edilmiş elektrotlarla karşılaştırıldığında, Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE'ler için yarım daire çapı artmış ve 9562 Ω R_{ct} değeri gözlenmiştir.



Resim 4.4. 5 mM [Fe(CN)₆]^{3/4-} ve 0.1 M KCl içeren 50 mM pH 7.4 PBS tampon çözeltileri için A) yalın SPE, Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE ve Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE için CV grafikleri ve B) EIS spektrumları.

Resim 4.5A, yalın SPE, Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE ve Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE'lere ait 50 µM katekol içeren 50 mM pH 5.5 ABS tamponu çözeltilisinde döngüsel voltametri sonuçlarını göstermektedir. Tüm SPE'ler için 50 µM katekol varlığında sırasıyla anodik ve bir katodik olmak üzere iki redoks tepe akımı gözlenmiştir; ancak Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄ ile modifiye elektrotların pik akım değerleri,

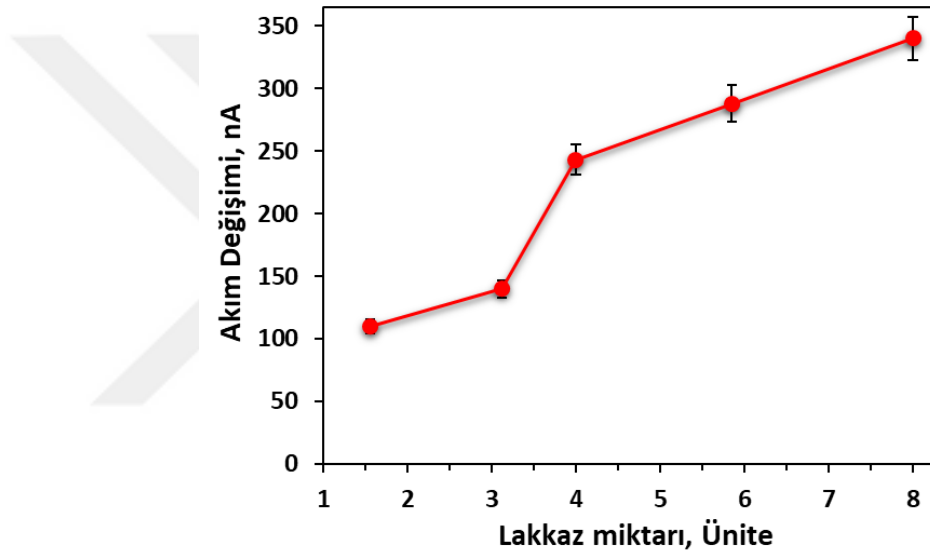
Cys-Ag@Fe₃O₄ ile modifiye elektrotlara kıyasla 6 kat daha yüksek bulunmuştur. Bu elektrokimyasal davranış, Resim 4.5B'de gösterildiği gibi lakkazın oksidasyon reaksiyonuna ve katekolün elektrot yüzeyinde geri dönüşümünün amplifikasyon döngüsüne dayanır.



Resim 4.5. A) 50 μM katekol içeren 50 mM pH 5.5 ABS tampon çözeltileri için yalın SPE, Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE ve Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE için CV grafikleri. B) Enzimatik oksidasyon reaksiyonu ve ardından substratın elektrot yüzeyinde geri dönüşümünün şematik gösterimi.

4.1.3. Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE'lerin Optimizasyonu

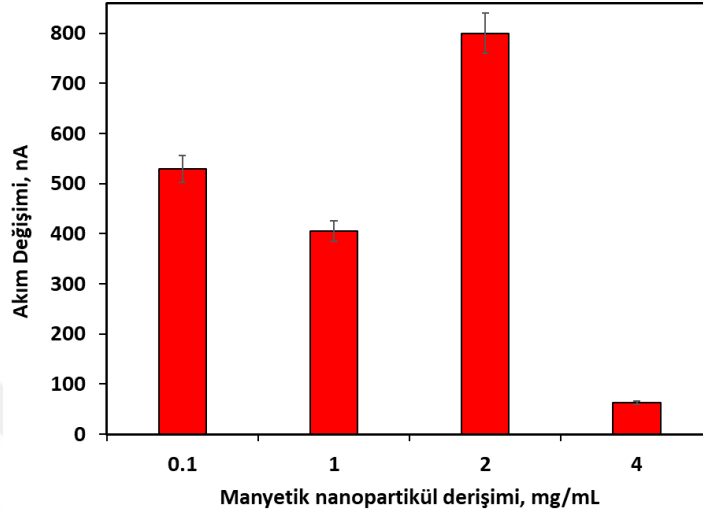
Lakkaz miktarının biyosensör yanıtına etkisini incelemek için 1.56, 3.12, 4.0, 5.85, 8.0 U miktarlarında farklı enzim elektrotları hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1'de gösterilmiştir. En yüksek amperometrik akım yanıtı 8 U enzim miktarı ile hazırlanan elektrotlar ile elde edilmiştir.



Şekil 4.1. Cys-Ag@Fe₃O₄ nanopartiküllere immobilize edilmiş lakkaz miktarının Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörünün amperometrik yanıtına etkisi (50 mM pH 5.5 ABS tampon çözeltisi içerisinde 50 µM katekol varlığında, uygulanan potansiyel -50 mV, sıcaklık 25°C).

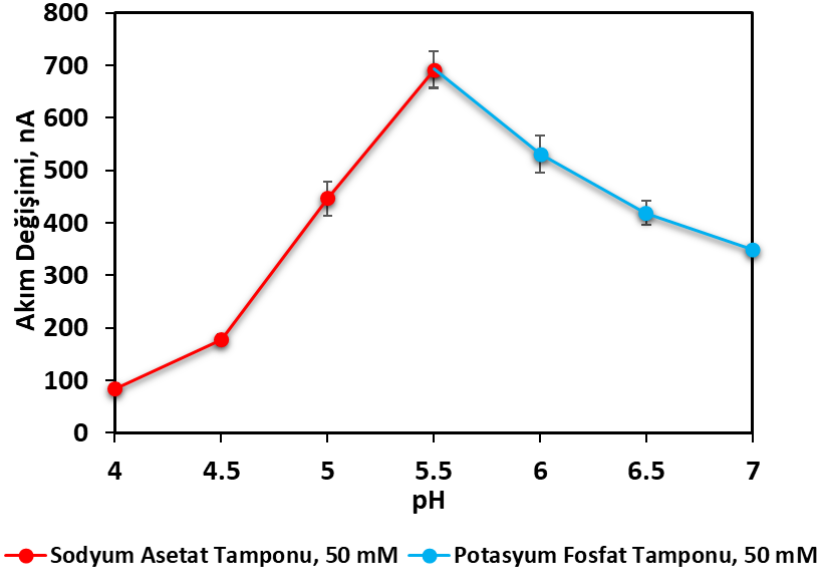
0.1, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/mL derişimlerinde hazırlanan manyetik nanopartiküller ile modifiye edilen elektrotlarla amperometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar Şekil 4.2'de verilmiştir. En kararlı ve en yüksek amperometrik yanıtı veren elektrot, 2.0 mg/mL manyetik nanopartikül derişimi ile hazırlanan SPE olarak belirlenmiştir. Belirlenen manyetik nanopartikül aralığından (0.1–0.4 mg/mL) daha düşük veya yüksek derişimlerle

hazırlanan elektrotlarla akım farklanmaları gözlenmemiştir ve bu miktarlarda çalışılmamıştır.



Şekil 4.2. Cys-Ag@Fe₃O₄ manyetik nanopartiküllerin derişiminin Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörünün amperometrik yanıtına etkisi (50 mM pH 5.5 ABS tampon çözeltisinde 50 µM katekol varlığında, uygulanan potansiyel -50 mV, sıcaklık 25°C).

Tampon çözelti pH'sının amperometrik yanıtına etkisini incelemek için 2 mg/mL manyetik nanopartikül, 8 U lakkaz ve %0.5'lik kitosan ile hazırlanan elektrotların, her bir tampon çözelti içerisinde (50 mM pH 4.0–5.5 ABS ve 50 mM 6.0–7.0 PBS) 50 µM katekol için akım değişimi değerleri kaydedilmiştir. Şekil 4.3'den de görüldüğü üzere, tasarlanan biyosensör için optimum pH değeri 5.5 olarak belirlenmiştir. pH'a göre akım değerlerinin değişimi incelendiğinde genel olarak, akım değişimi değeri yükselen pH değeri ile artmakta ve ardından tepe noktası olan 5.5'den sonra azalmaktadır.



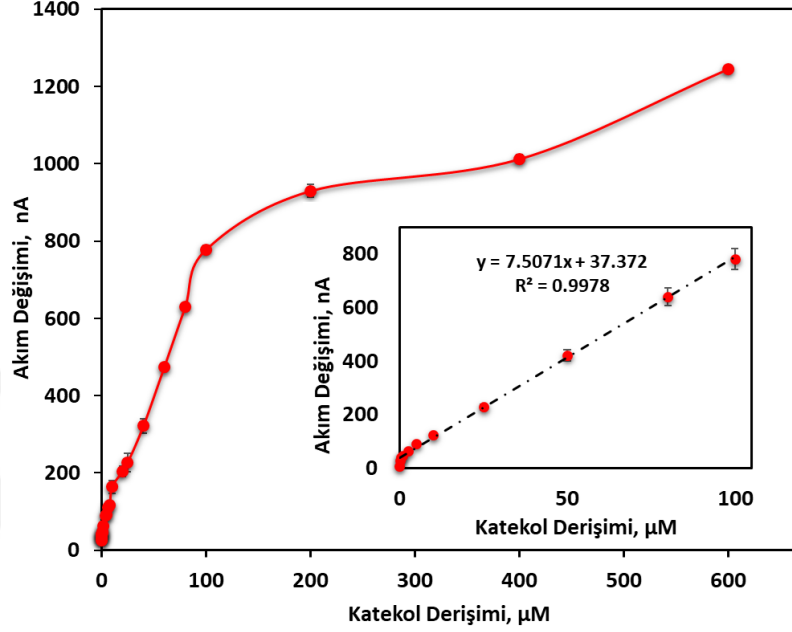
Şekil 4.3. Ortam pH'ının Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörünün amperometrik yanıtına etkisi (Tüm tampon çözeltiler için 50 µM katekol varlığında, uygulanan potansiyel -50 mV, sıcaklık 25°C).

4.1.4. Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE'lerin Kinetik ve Analitik Performansları

Göl suyu ve musluk suyunda katekol tayinine yönelik geliştirilen lakkaz immobilize Cys-Ag@Fe₃O₄ manyetik nanopartiküller temelli biyosensörün analitik ve katalitik karakterizasyonu, katekol için bir kalibrasyon grafiğinin hazırlanması ile yapılmıştır. Optimize koşullar altında, farklı substrat derişimlerinin verdiği amperometrik yanıtlar ölçülmüş ve sonuçlar grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.4'deki iç grafikte de verildiği gibi tasarlanan biyosensörün katekol için gösterdiği doğrusal aralık, 0.1–100 µM olarak belirlenmiştir ($y=7.5071x+37.372$ ve $R^2=0.9978$). Doğrusal aralık grafiği yardımıyla ölçülebilen en küçük derişim sınırı (LOD), sinyal gürültü oranı 3 olarak alınarak (S/N=3) 0.06 µM olarak belirlenmiştir. Ek olarak, biyosensör için ölçüm sınırı (LOQ) 0.203 µM olarak belirlenmiştir. Lakkaz bağlı Ag@Fe₃O₄ manyetik nanopartiküller ile modifiye edilen SPE'lerin katekol için duyarlılığı, Eşitlik 8'e göre hesaplanmış ve 60.056 µAmM⁻² olarak bulunmuştur.

$$\text{Duyarlık} = \frac{\text{Doğrusal grafiğin eğimi, } m (\mu\text{AmM}^{-1})}{\text{elektrodun yüzey alanı, } A (\text{cm}^2)}$$

Eşitlik 8

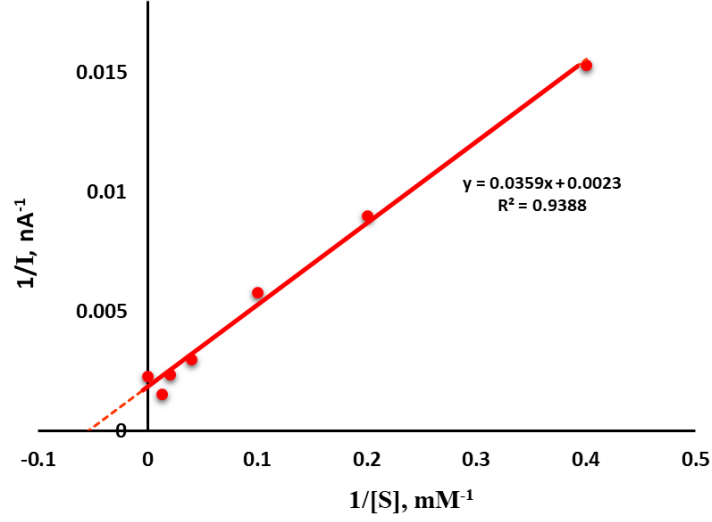


Şekil 4.4. Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE için 50 mM pH 5.5 ABS tamponuna farklı katekol derişimleri eklenmesiyle elde edilen kalibrasyon eğrisi ve iç grafik; doğrusal aralık grafiği (uygulanan potansiyel -50 mV, sıcaklık 25°C).

Enzimatik biyosensörün performansı hakkında bilgi veren kinetik parametreler, Şekil 4.5’de verilen Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak Eşitlik 9’a göre hesaplanmıştır. Bu eşitlik Michaelis-Menten eşitliğini doğrusal hale getirmek için kullanılan bir eşitliktir. Buna göre, I_{ss} substrat ilavesinden sonraki kararlı durum akımı; $[S]$, substrat derişimi ve I_{max} , doygun substrat durumunda ölçülen maksimum akımdır ve K_m^{app} ise görünür Michaelis-Menten sabitidir. Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörünün K_m^{app} ve I_{max} değerleri sırasıyla 0.021 mM ve 588.235 nA olarak bulunmuştur.

$$\frac{1}{I_{ss}} = \frac{K_m^{app}}{I_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{I_{max}}$$

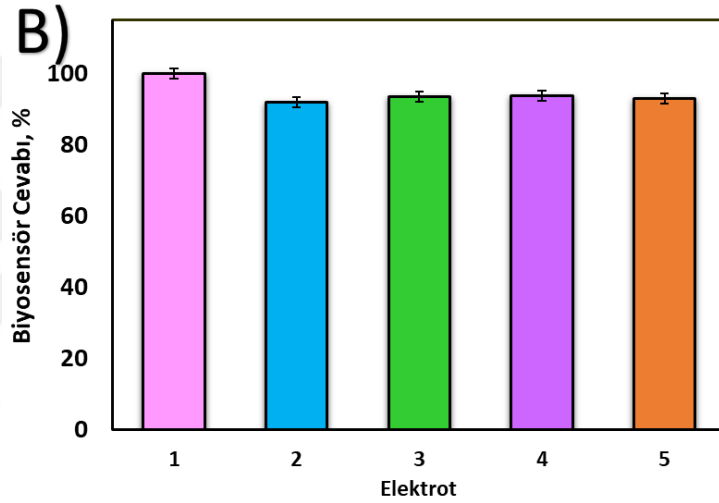
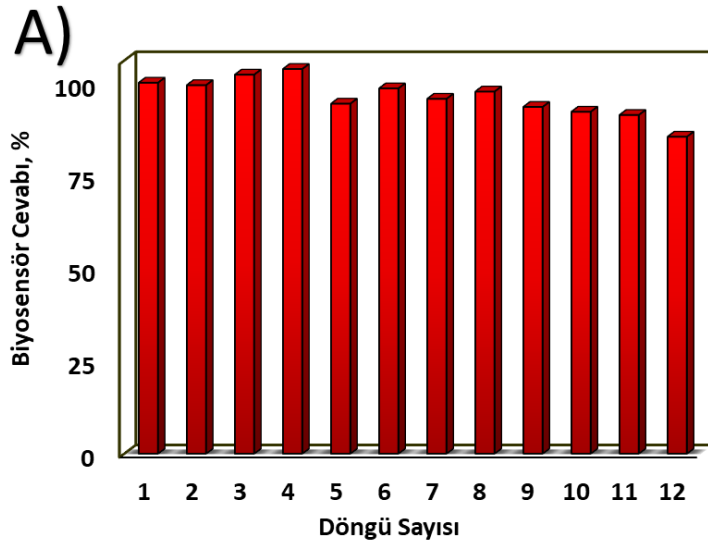
Eşitlik 9



Şekil 4.5. Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörünün katekol için Lineweaver–Burk grafiği (uygulanan potansiyel -50 mV, sıcaklık 25°C, 50 mM pH 5.5 ABS tamponu).

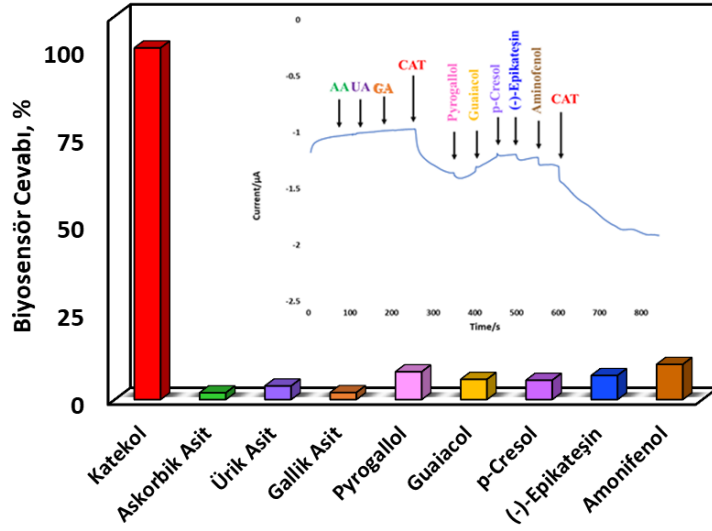
Çözeltiye yapılan her katekol ilavesinden sonra her bir elektrodun kararlı hal akımına ulaşılması için gerekli süre ölçülmüş ve cevap süresinin ortalama olarak 30 s’den küçük olduğu bulunmuştur.

Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörünün tekrar kullanılabilirliğini göstermek için aynı elektrot ile 50 µM katekol varlığında amperometrik ölçümler tekrarlanmış ve her bir ölçüm sonrası elektrot 50 mM pH 5.5 ABS tamponu ile yıkanmıştır. Şekil 4.6A’da gösterildiği gibi, akım sinyalinin kademeli olarak düşmesiyle, lakkaz aktivitesinin ardışık 10 ölçüme kadar yaklaşık %92’si, 12 ölçüme kadar yaklaşık %86’sı korunmuştur. Ardışık olarak alınan 12 ölçüm sonucu hesaplanan bağıl standart sapma değeri ise %3.8 (n=12) olarak bulunmuştur. Aynı koşullarda hazırlanan 5 özdeş elektrodun 50 µM katekol için verdiği amperometrik cevapların yüzde değerleri ise Şekil 4.6B’de gösterilmektedir ve bu sonuçlara göre bağıl standart sapma değeri %3.39 (n=5) olarak hesaplanmıştır.



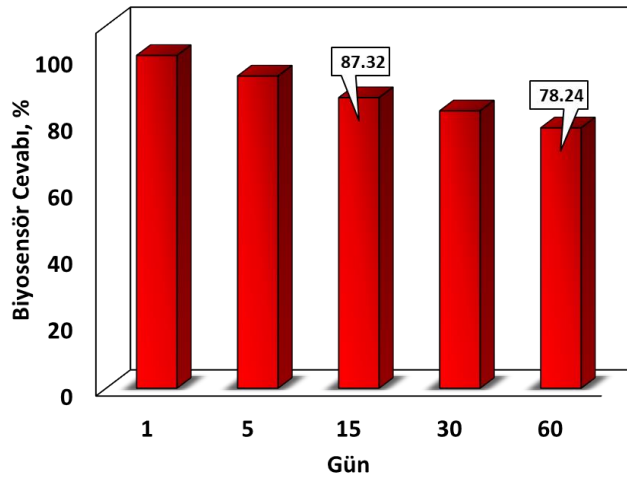
Şekil 4.6. Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörünün optimum koşullarda A) tekrar kullanılabilirliği ve B) tekrar üretilebilirliği.

Biyosensörün seçiciliği, çeşitli polifenolik substratların reaksiyon ortamına eklenmesiyle, amperometrik yöntem kullanılarak araştırılmıştır. Şekil 4.7’de gösterildiği gibi 50 μ M katekol ilavesinden sonra akımın belirgin şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. 100 μ M Askorbik asit (AA) %1.93; 100 μ M ürik asit (UA) %3.86; 100 μ M gallik asit (GA) %2.00; 100 μ M pyrogallol %7.90; 100 μ M guaiacol %5.75; 100 μ M p-Cresol %5.50; 100 μ M (-)-epikateşin %6.85 ve 100 μ M 2-Aminofenol %10.01 oranlarında girişim değerleri göstermiştir.



Şekil 4.7. Elektroaktif türlerin Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörü yüzeyine eklenmesiyle elde edilen girişim grafiği. İç grafik: Girişim yapan elektroaktif türlerin amperometrik cevabını gösteren akım-zaman grafiği (25°C, 50 mM pH 5.5 ABS çalışma tamponu ve uygulanan potansiyel -50 mV).

Elektrotlar, depo kararlılığı deneyleri sırasında, kullanılmadıkları zaman +4°C'de saklanmıştır. Şekil 4.8'de de verildiği gibi Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörünün 15. gün ve 60. gün sonundaki kullanımından sonra aktivitesinin sırasıyla %87.32'sini ve %78.24'ünü korunduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.8. Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörünün optimum koşullarda depo kararlılığı.

4.1.5. Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE'lerin Göl Suyu ve Musluk Suyunda Katekol Tayini İçin Uygulanabilirliğinin Araştırılması

Tasarlanan biyosensörün gerçek numunelerde katekol tayini için kullanılabilirliğini göstermek için musluk suyu ve göl suyu numune olarak değerlendirilmiştir. 50 mM pH 5.5 ABS tamponunda 1:1 seyreltilen musluk ve göl suyuna 1.0 µM, 10.0 µM ve 100.0 µM derişimlerinde katekol eklenmiş ve üç tekrar halinde, lakkaz immobilize Cys-Ag@Fe₃O₄ manyetik nanopartiküller ile modifiye edilmiş SPE'ler ile bir geri kazanım çalışması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 1'de verilmiş ve spektrofotometrik yöntem ile karşılaştırılmıştır. Bu sonuçlar, musluk ve göl suyunda özellikle düşük katekol derişimlerinin varlığında spektrofotometrik yöntemle göre, elektrokimyasal yöntemin kullanılmasının avantajlı olduğunu göstermiştir.

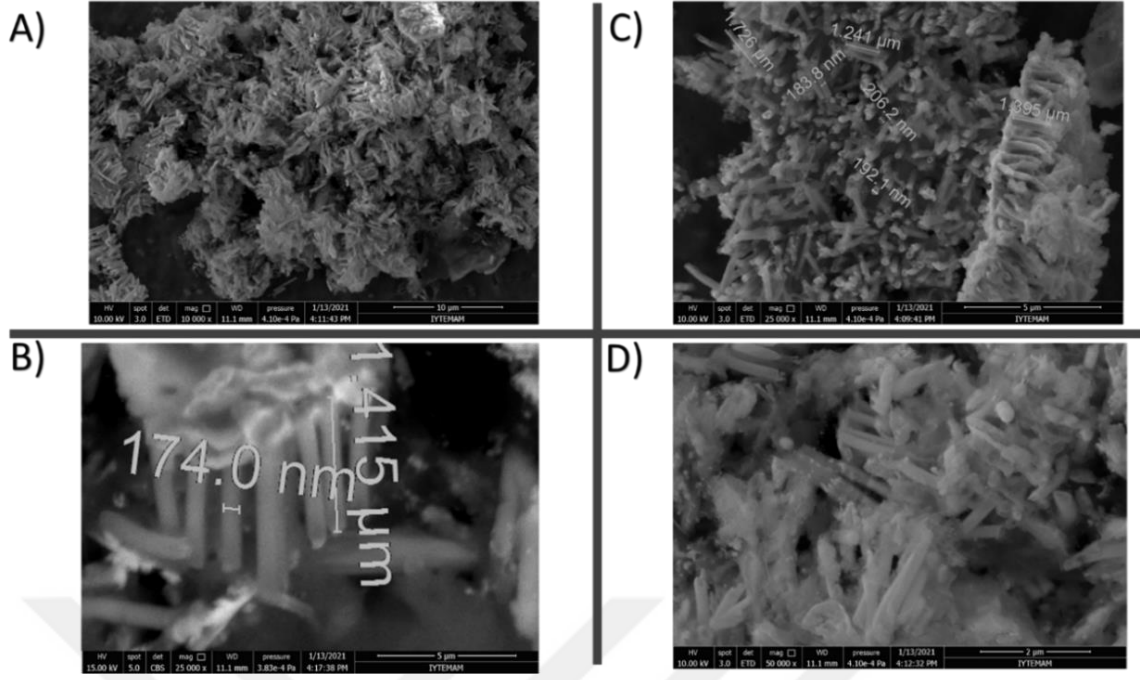
Çizelge 1. Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörünün ve Folin-Ciocalteu metodunun musluk suyu ve göl suyunda katekol tayini performansları.

Örnek	Elektrokimyasal Metot			Folin-Ciocalteu Metodu	
	Eklenen (µM)	Tayin Edilen (µM)	%Kazanım	Tayin Edilen (µM)	%Kazanım
Muskuk suyu	1	1.05±0.15	105.00	0.079±0.003	7.90
	10	10.14±0.08	101.40	8.66±0.025	86.60
	100	102.20±0.05	102.20	151.96±0.022	151.96
Göl suyu	1	1.033±0.09	103.30	Tayin edilemedi	Tayin edilemedi
	10	10.26±0.04	102.60	17.84±0.0001	178.40
	100	99.76±0.06	99.76	122.00±0.021	122.00

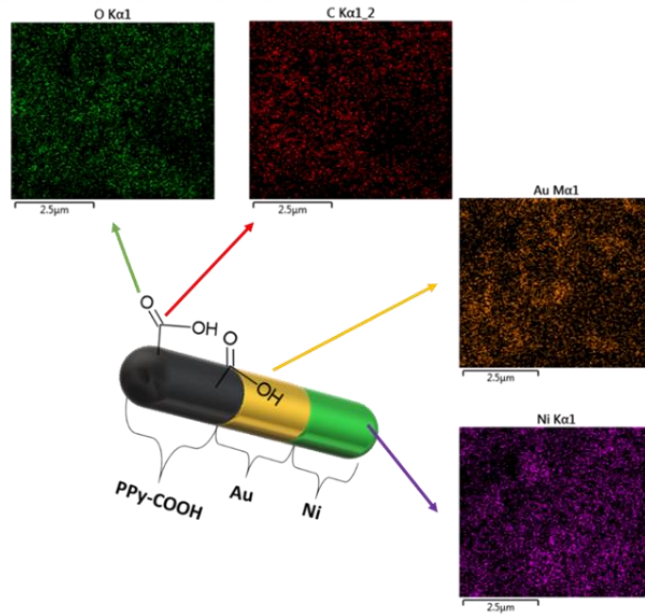
4.2. Ticari Serum ve Yapay İdrarda Dopamin Tayini için Lakkaz İmmobilize Ni/Au/PPy-COOH Nanoteller ile Modifiye Perde Baskılı Elektrotların Hazırlanması

4.2.1. Ni/Au/PPy-COOH Nanotellerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Aktivasyonu

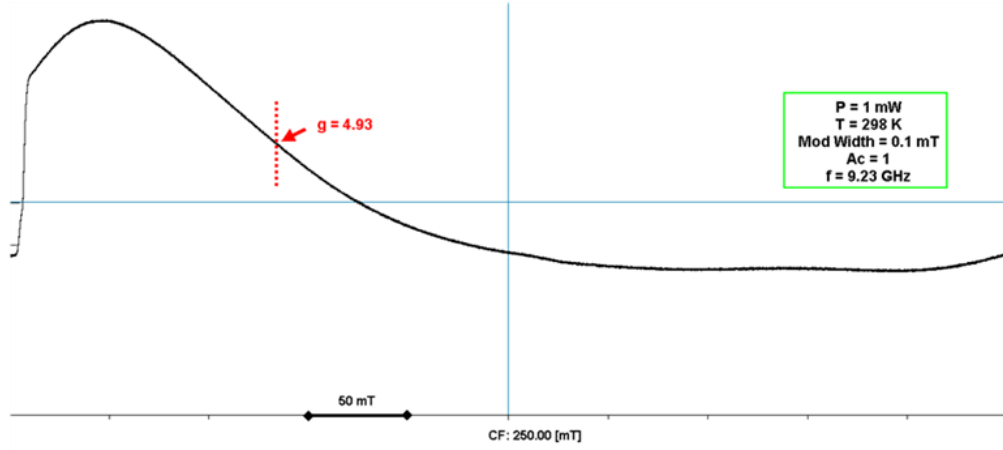
Çalışmanın bu kısmında sentezlenen ve birden fazla segmente sahip olan Ni/Au/PPy-COOH nanotellerin son segmentte bulunan PPy-COOH polimeri, -COOH grupları, standart bir EDC/NHS kimyası ile aktive edilmiş ve nanoteller ve enzim molekülleri arasında kovalent bağlar oluşturulmuştur. Bir polikarbonat membrandan sentezlenen nanotel miktarı yaklaşık 16 mg olarak ölçülmüştür ve Ni/Au/PPy-COOH nanotellerin morfolojik yapısı, şekli ve boyutu SEM tekniği ile incelenmiştir. Resim 4.6'da görüldüğü gibi nanoyapı tel şeklindedir, çapları yaklaşık 180 nm, uzunlukları 1400 µm ve yüzeyleri oldukça pürüzsüzdür. Nanotellere ait EDX analizinin sonuçları Resim 4.7'de verilmiştir. Sentezlenen nanotellerin manyetik özelliğini göstermek için yapılan ESR analizini sonuçları ise Resim 4.8'de gösterilmektedir. Bu spektrumdan elde edilen H_r değeri (manyetik alan rezonansı) kullanılarak g faktörü 4.93 olarak hesaplanmıştır.



Resim 4.6. Ni/Au/PPy-COOH nanotellerin SEM görüntüleri A) 10 μm, B) 5 μm, C) 5 μm ve D) 2 μm ölçek.



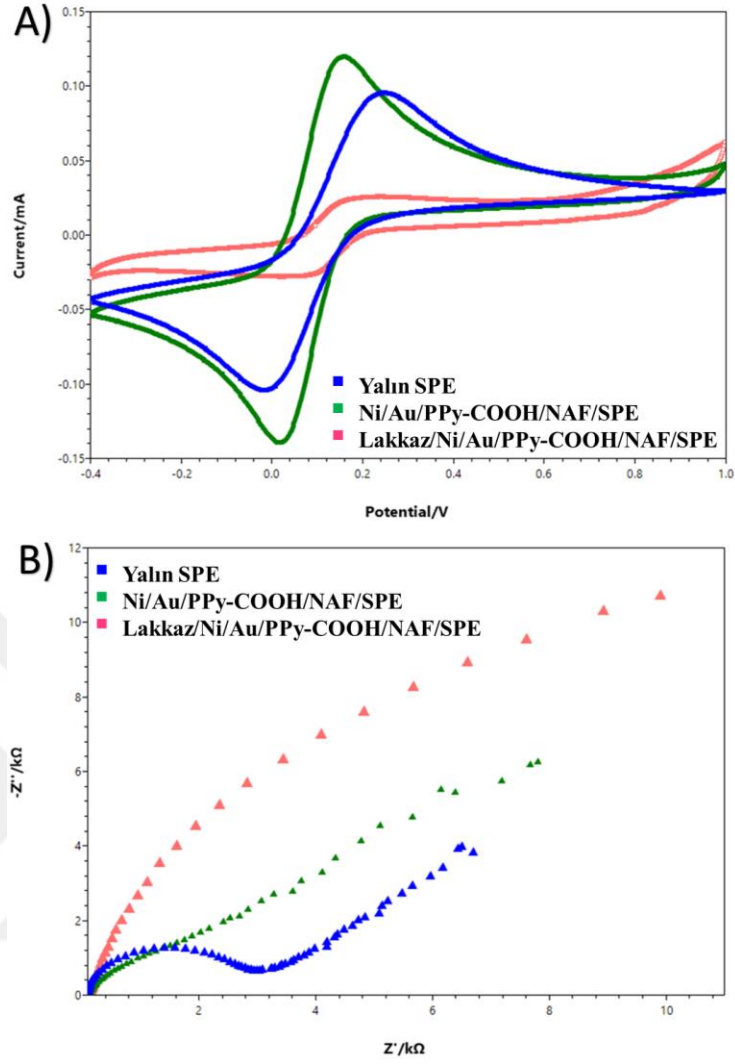
Resim 4.7. Ni/Au/PPy-COOH tellerin EDX sonuçları.



Resim 4.8. Manyetik nanotellerin ESR spektrumu.

4.2.2. Perde Baskılı Elektrotların Modifikasyonu ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu

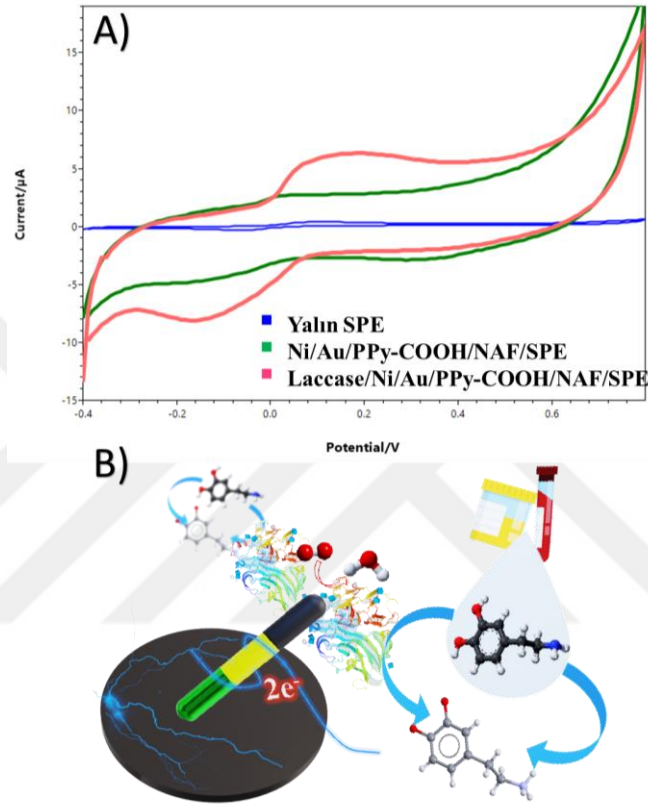
Yalın SPE'lerin, nanoteller ile modifiye edilmiş SPE'lerin ve lakkaz immobilize nanoteller ile modifiye edilmiş SPE'lerin yük transfer özelliklerini karakterize etmek için CV ve EIS ölçümleri, 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ ve 0.1 M KCl içeren 50 mM pH 7.4 PBS tampon çözeltilerinde yapılmıştır. Resim 4.9A'da yalın perde baskılı elektrotların, Ni/Au/PPy-COOH/NAF ile modifiye edilmiş ve Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF ile modifiye edilmiş perde baskılı elektrotların $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ dönüşümü için iyi tanımlanmış CV pik zirveleri görülmektedir. Yalın SPE ile karşılaştırıldığında, Ni/Au/PPy-COOH nanoteller ile modifiye elektrotların tüm redoks akım piklerinin arttığı görülmüştür. Ancak Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF biyosensörünün $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ dönüşümü için elektron transferini azalttığı gözlenmiştir. Resim 4.9B'de verilen Nyquist grafiklerinde, tüm eğrilerin hem sınırlı elektron transferi hem de difüzyon sürecinin aynı anda gerçekleştiğini gösteren yarım daire ve düz bir çizgiden oluştuğu görülmektedir. Fitlenmiş sonuçlara göre yalın SPE'lerin ve Ni/Au/PPy-COOH/NAF ile modifiye edilmiş SPE'lerin elektron transfer dirençleri (R_{ct}) sırasıyla 2543 Ω ve 750 Ω olarak bulunmuştur. Nanoteller ile modifiye edilmiş elektrotlarla karşılaştırıldığında, lakkazın mevcut olduğu SPE'lerde yarım daire çapı artmakta olup 10657 Ω R_{ct} değeri göstermiştir.



Resim 4.9. A) 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ ve 0.1 M KCl içeren PBS pH 7.4 tampon çözeltileri için yalnız SPE, Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE ve Lakkaz/Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lere ait CV grafikleri ve B) EIS spektrumları.

Resim 4.10A'da, 50 mM pH 6.5 fosfat tamponu çözeltisinde 10 μM dopamin varlığında, elektrokatalitik özellikleri karşılaştırılan yalnız SPE, Ni/Au/PPy-COOH/NAF nanotellerle modifiye SPE ve Lakkaz/Ni/Au/PPy-COOH/NAF ile modifiye SPE'lere ait döngüsel voltamogramlar gösterilmektedir. 10 μM dopamin için tüm elektrotlarla bir çift iyi tanımlanmış redoks tepe noktası gözlemlenmiştir ancak Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'nin akım pik değerlerinin önemli ölçüde farklı olduğu görülmüştür. Çünkü Ag/AgCl'ye karşı Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'nin -0.178 V civarında

gözlemlenen katodik tepe akımı diğer elektrotlara göre daha yüksektir ve daha iyi tanımlanmış bir piktir. Bunun sebebi, dopaminin yükseltgenmesi ve negatif potansiyelde elektrot yüzeyinde yeniden indirgenmesinde lakkazın elektroaktif katalitik etkinliğidir (Resim 4.10B).

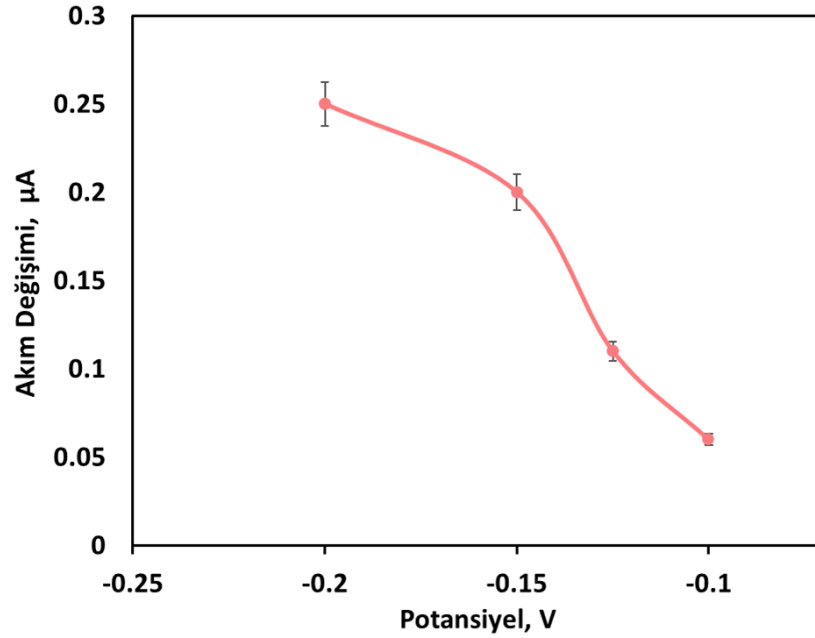


Resim 4.10. A) 10 μM dopamin içeren 50 mM pH 6.5 PBS tampon çözeltileri için yalın SPE, Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE ve Lakkaz/Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lere ait CV eğrileri. B) Enzimatik oksidasyon reaksiyonu ve ardından substratın elektrot yüzeyinde geri dönüşümünün şematik gösterimi.

4.2.3. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin Optimizasyonu

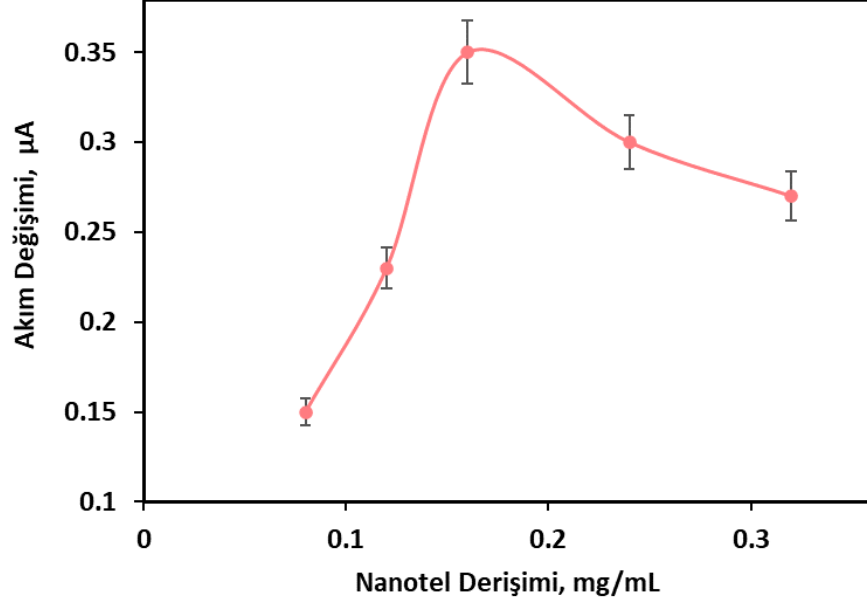
Dopaminin yüksek duyarlık ve düşük tayin sınırı (LOD) ile belirlenmesi için çalışma potansiyelinin seçiminin öneminden dolayı -0.2 ve -0.1 V potansiyel aralığında

amperometrik ölçümler alınmıştır ve Şekil 4.9’da görüldüğü gibi en yüksek amperometrik cevabın elde edildiği -0.2 V çalışma potansiyeli olarak belirlenmiştir.



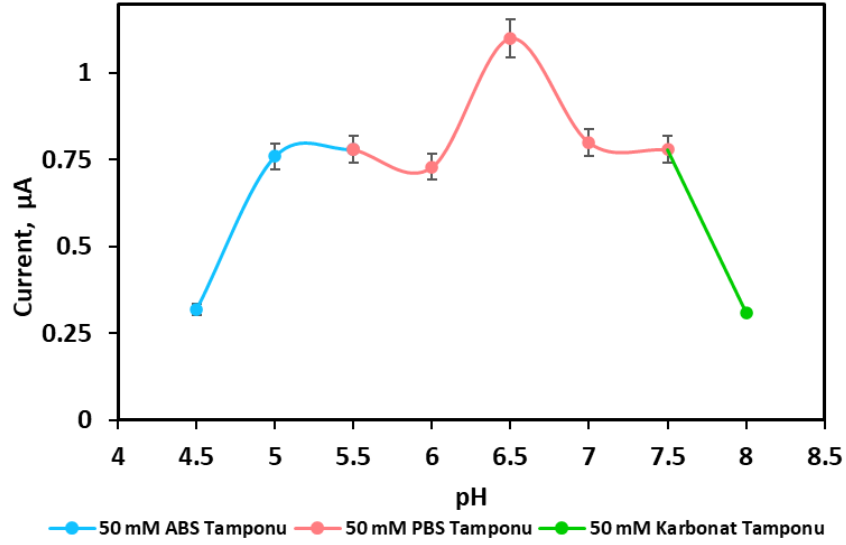
Şekil 4.9. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE biyosensörünün amperometrik yanıtına çalışma potansiyelinin etkisi (50 mM pH 6.5 PBS tamponu çözeltisinde 10 µM dopamin varlığında, sıcaklık 25°C).

Nanomalzemelerin biyoalgılamadaki öneminden dolayı, elektrot yüzeyindeki nanotel derişiminin amperometrik yanıtına etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, enzim miktarı 5 mg/mL derişiminde sabit tutularak, 0.08, 0.12, 0.16, 0.24 ve 0.32 mg/mL derişimlerindeki nanotellerle modifiye edilen elektrotlarla amperometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.10’da gösterildiği gibi artan nanotel derişimi ile akım yanıtlarında artış meydana gelmiş ve 0.16 mg/mL nanotel derişiminde maksimum pik görüldükten sonra akımlarda düşüş gözlemlenmiştir. Bu sebeple en kararlı ve en yüksek amperometrik yanıtı veren elektrot, 0.16 mg/mL nanotel derişimi ile hazırlanmış SPE olarak seçilmiştir. Belirlenen nanotel aralığından (0.08–0.32 mg/mL) daha düşük veya yüksek derişimlerle hazırlanan elektrotlarla kararlı sonuçlar gözlenmemiştir.



Şekil 4.10. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE biyosensörünün amperometrik yanıtına Ni/Au/PPy-COOH nanotel derişiminin etkisi (50 mM pH 6.5 PBS tamponunda 10 µM dopamin varlığında, uygulanan potansiyel -0.2 V, sıcaklık 25°C).

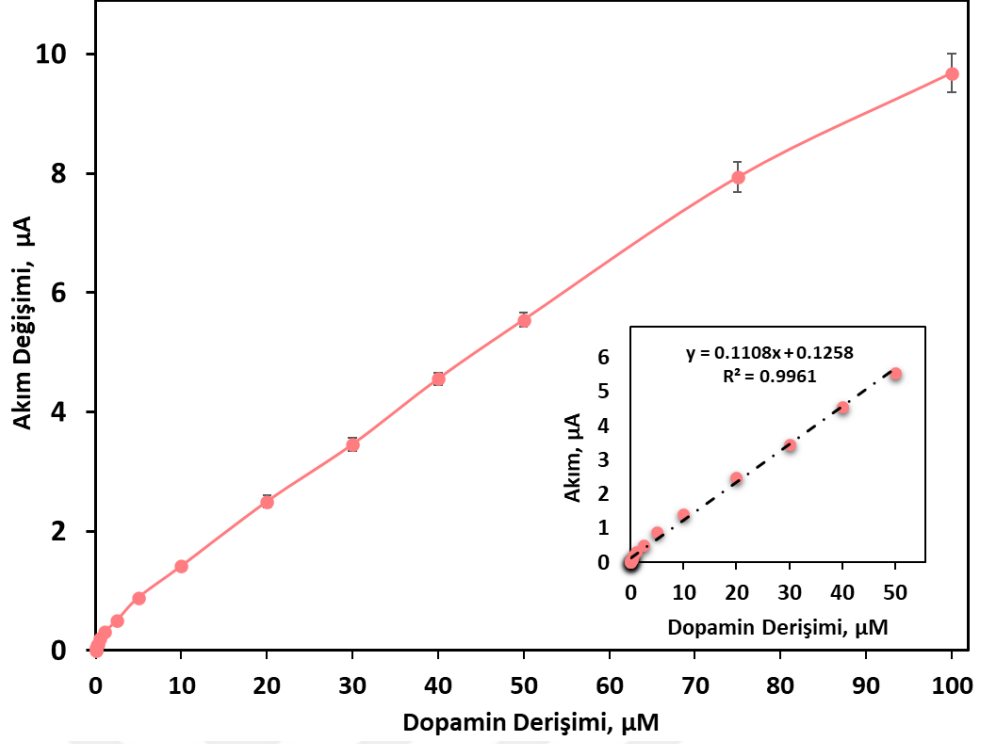
Tampon çözeltinin amperometrik yanıtına etkisini incelemek için her bir tampon çözelti içerisinde 10 µM dopamin varlığında akım değerleri kaydedilmiştir. 50 mM pH 4.5, 5.0, 5.5 ABS tamponu, 50 mM 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 fosfat PBS ve 50 mM pH 8.0 karbonat tamponu ile gerçekleştirilen deneylerde, pH'a göre amperometrik akım değerlerinin değişimi gözlenmiştir ve akım değerleri artan pH ile artmış ve ardından tepe noktası olan 6.5'dan sonra azalmıştır (Şekil 4.11). pH 6.5 fosfat tamponu Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE biyosensörünün dopamin için maksimum akımı gösterdiği pH'dır ve bundan sonraki deneylerde optimum çalışma pH değeri olarak 50 mM pH 6.5 PBS tamponu kullanılmıştır.



Şekil 4.11. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE biyosensörünün amperometrik yanıtına pH'ın etkisi (tüm tampon çözeltilerde 10 µM dopamin varlığında, uygulanan potansiyel -0.2 V, sıcaklık 25°C).

4.2.4. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin Kinetik ve Analitik Performansları

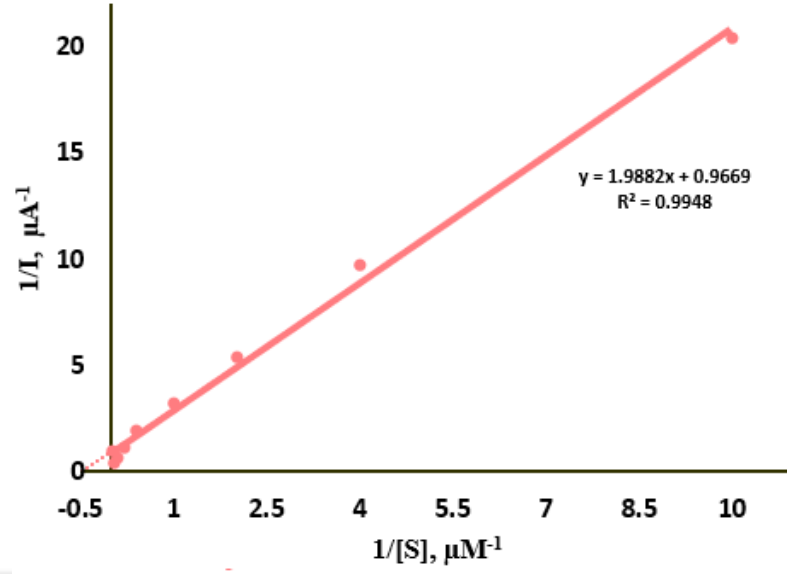
Yapay idrar ve ticari insan serumunda dopamin tayinine yönelik geliştirilen lakkaz temelli Ni/Au/PPy-COOH nanoteller ile modifiye biyoelektrotların analitik ve katalitik karakterizasyonu, dopamin için kalibrasyon grafiğinin hazırlanması ile yapılmıştır. Optimize koşullar altında, farklı substrat derişimlerinin verdiği amperometrik yanıtlar ölçülmüş ve sonuçlar grafiğe geçirilmiştir. Tasarlanan biyosensörün dopamin için gösterdiği doğrusal aralık Şekil 4.12'den görüldüğü üzere 0.01–50.0 µM olarak belirlenmiştir ($y=0.1108x+0.1258$ ve $R^2=0.9961$). Ölçülebilen en küçük derişim sınırı (LOD), sinyal gürültü oranı 3 olarak alınarak ($S/N=3$) 2.265 nM olarak belirlenmiştir. Ek olarak, biyosensör için ölçüm sınırı (LOQ) 7.551 nM olarak belirlenmiştir. Dopamin tayini için tasarlanan biyosensörün duyarlılığı, $0.902 \mu A \mu M^{-1} cm^{-2}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.12. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'ler için 50 mM pH 6.5 ABS tamponuna farklı dopamin derişimleri eklenmesiyle elde edilen kalibrasyon eğrisi ve doğrusal aralık grafiği (iç grafik) (uygulanan potansiyel -0.2 V, sıcaklık 25°C).

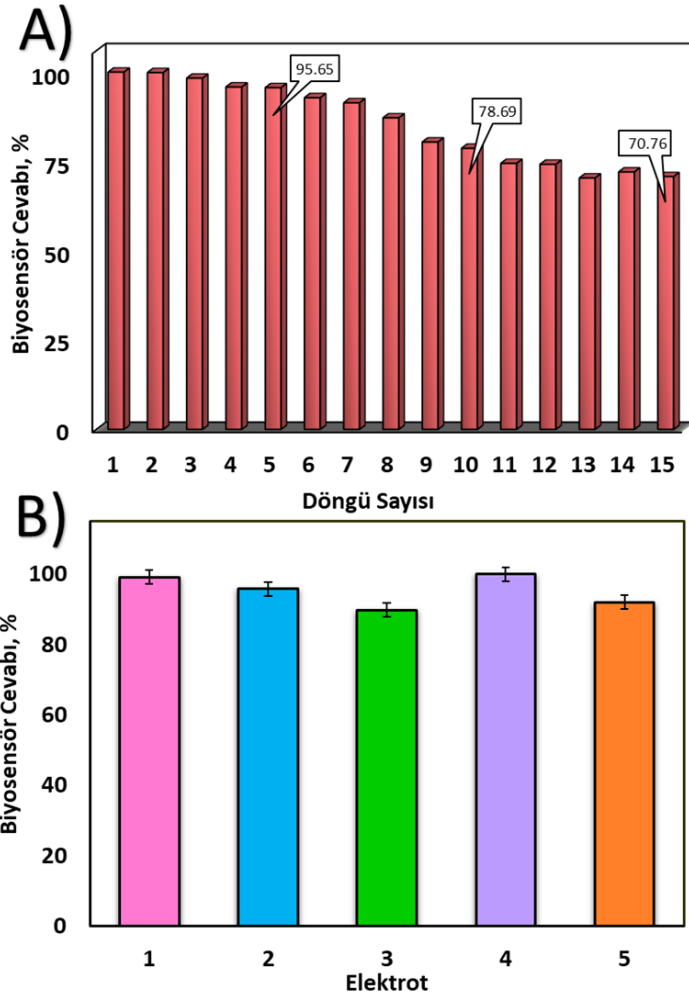
Enzimatik biyosensörün performansı hakkında bilgi veren kinetik parametreler, Şekil 4.13'de verilen Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak hesaplanmıştır ve Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE biyosensörünün K_m^{app} ve I_{max} değerleri sırasıyla 2.056 µM ve 1.03 µA olarak bulunmuştur.

Cevap süresini ölçmek için, $i-t$ grafiklerinden yararlanılmıştır. Çözeltiye yapılan her dopamin ilavesinden sonra her bir elektrodun kararlı hal akımına ulaşması için gerekli süre ölçülmüş ve cevap süresinin ortalama olarak 20 s'den küçük olduğu bulunmuştur.



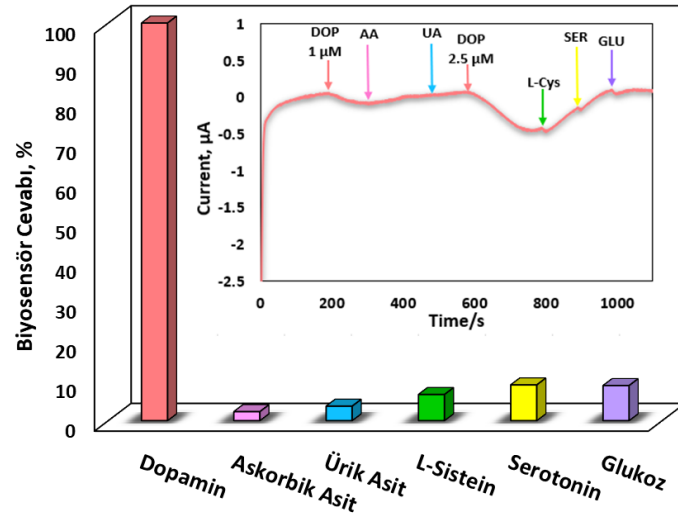
Şekil 4.13. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE biyosensörünün dopamin için Lineweaver–Burk grafiği (uygulanan potansiyel -0.2 V, sıcaklık 25°C, 50 mM pH 6.5 PBS tamponu).

Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE biyosensörünün tekrar kullanılabilirliğini göstermek için aynı elektrot ile 10 μM dopamin varlığında amperometrik ölçümler tekrarlanmış ve her bir ölçüm sonrası elektrot 50 mM pH 6.5 PBS tamponu ile yıkanmıştır. Şekil 4.14A’da gösterildiği gibi, akım sinyalinin kademeli olarak düşmesiyle, lakkaz aktivitesinin ardışık 10 ölçüme kadar yaklaşık %78.69’u, 15 ölçüme kadar yaklaşık %70.76’sı korunmuştur ve bu sonuçlara göre bağıl standart sapma değeri %8.32 (n=15) olarak hesaplanmıştır. Aynı şartlarda hazırlanan 5 özdeş elektrodun 10 μM dopamin için verdiği amperometrik cevapların yüzde değerleri ise Şekil 4.14B’de gösterilmektedir ve bu sonuçlara göre bağıl standart sapma değeri %4.5 (n=5) olarak hesaplanmıştır.



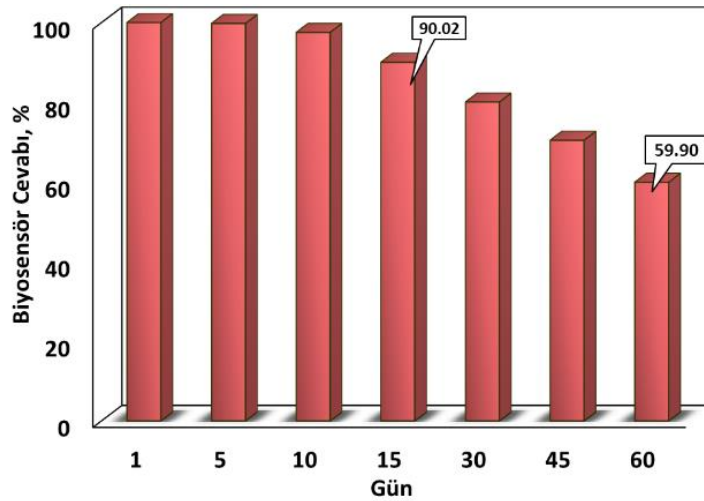
Şekil 4.14. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin 50 mM pH 6.5 PBS tampon çözeltisinde 10 μ M dopamin varlığında ve -0.2 V potansiyelde A) tekrar kullanılabilirliği B) tekrar üretilebilirliği.

Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE temelli biyosensörün seçiciliğini göstermek için, 1 μ M dopaminin amperometrik cevabı, diğer analitlerin varlığında incelenmiştir. Reaksiyon ortamına dopamin eklendiğinde önemli ölçüde akım azalması gözlenirken, Şekil 4.15'de de gösterildiği gibi 0.05 mM askorbik asit (AA) %2.25; 0.5 mM ürik asit (UA) %3.63; 0.25 mM L-sistein (Cys) %6.56; 1.5 μ M serotonin %8.98 ve 5.5 mM glukoz %8.81 girişim etkisi göstermiştir. Seçicilik çalışmaları, reaksiyon ortamına eklenen bu maddelerin biyosensörün performansına önemli ölçüde müdahale etmediğini göstermiştir (en yüksek derişimler için sinyal değişimi < %10). Bu nedenle, bu biyosensör, analitik yanıtta önemli bir müdahale olmaksızın, potansiyel olarak girişim oluşturan bu bileşiklerin varlığında dopaminin belirlenmesi için kullanılabilmiştir.



Şekil 4.15. Elektroaktif türlerin Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE biyosensörü yüzeyine eklenmesiyle elde edilen grafik. İç grafik: Girişim yapan elektroaktif türlerin amperometrik cevabını gösteren akım-zaman grafiği (25°C, 50 mM pH 6.5 PBS çalışma tamponu ve uygulanan potansiyel -0.2 V).

Elektrotlar, depo kararlılıklarını belirlemek için yapılan deneylerde kullanılmadıkları zaman +4°C'de saklanmıştır. On beşinci gün sonunda enzim elektrotları için yalnızca %9.98'lik bir aktivite düşüşü görülmüştür. 60. günün sonunda elektrotların biyokatalitik aktivitesinde %40.10 aktivite kaybı görülmüştür (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin optimum koşullarda depo kararlılığı.

4.2.5. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin Ticari Serum ve Yapay İdrarda Dopamin Tayini İçin Uygulanabilirliğinin Araştırılması

Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin numunelerde uygulanabilirliğini incelemek için, ticari serum ve yapay idrarda farklı dopamin derişimlerinin varlığında amperometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar Çizelge 2'de verilmiştir. Tüm durumlarda %100'e çok yakın geri kazanım değerleri elde edilmiş ve gerçek örneklerde dopaminin seçici ve duyarlı bir şekilde belirlenmesi için Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin uygulanabilme yeteneği gösterilmiştir.

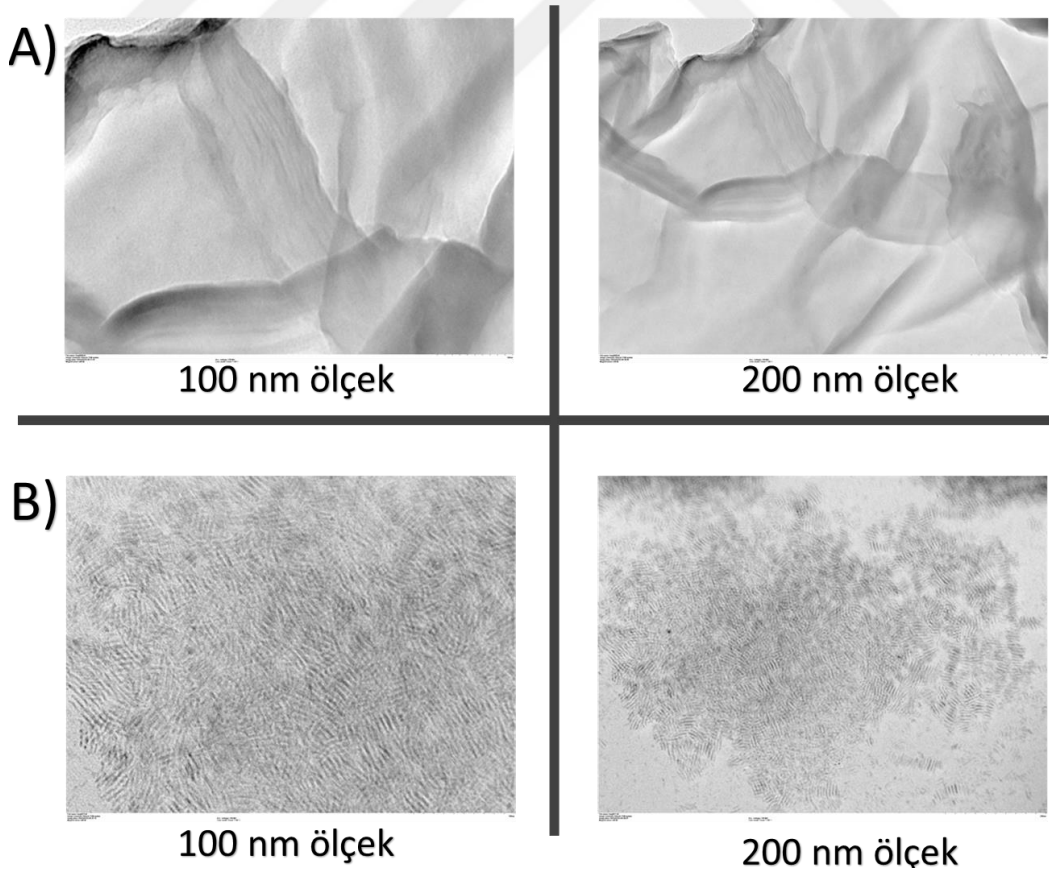
Çizelge 2. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE biyosensörü ile ticari serum ve yapay idrarda dopamin tayini.

Örnek	Eklenen (μM)	Tayin Edilen (μM)	%Kazanım
Ticari serum	0.01	0.01075 \pm 0.00058	107.50
	0.1	0.10303 \pm 0.0041	103.03
	1.0	1.00327 \pm 0.0040	100.33
Yapay idrar	0.01	0.01037 \pm 0.0021	103.70
	0.1	0.09848 \pm 0.0031	98.48
	1.0	0.99117 \pm 0.0067	99.12

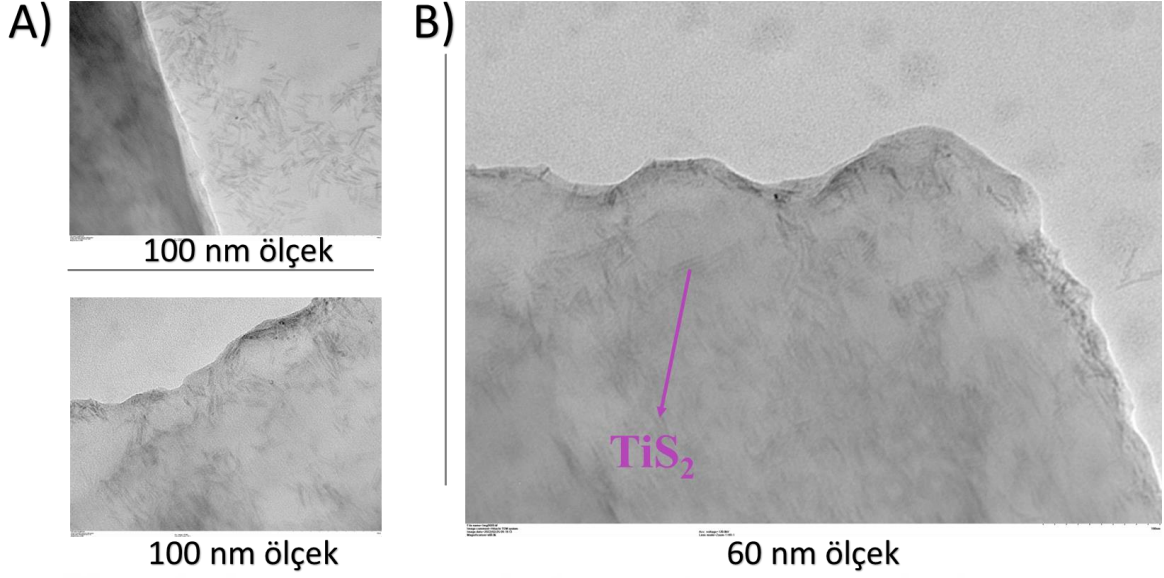
4.3. Şarapta ve Meyve Suyunda (-)-Epikateşin Tayini için Lakkaz Temelli GO/TiS₂ Nanokompozitlerle Modifiye Perde Baskılı Elektrotların Hazırlanması

4.3.1. GO/TiS₂ Nanokompozitlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

Resim 4.11A ve B’de yoğun bir şekilde toplanmış 2D çarşaf şeklindeki sırasıyla GO ve tabakalı yapıdaki TiS₂ nanotabakaların TEM görüntüleri verilmiştir. Ayrıca, nanomalzeme özellikleri dikkate alınarak hazırlanan GO/TiS₂ nanokompozitin yapısını gösteren TEM görüntüleri ise Resim 4.12’de gösterilmiştir. TiS₂ nanotabakaların, indirgenmiş grafen oksit nanotabakalarının içerisine yoğun bir şekilde geçtiğini ve heteroyapılı GO/TiS₂ nanokompozitinin oluşumunu göstermektedir.



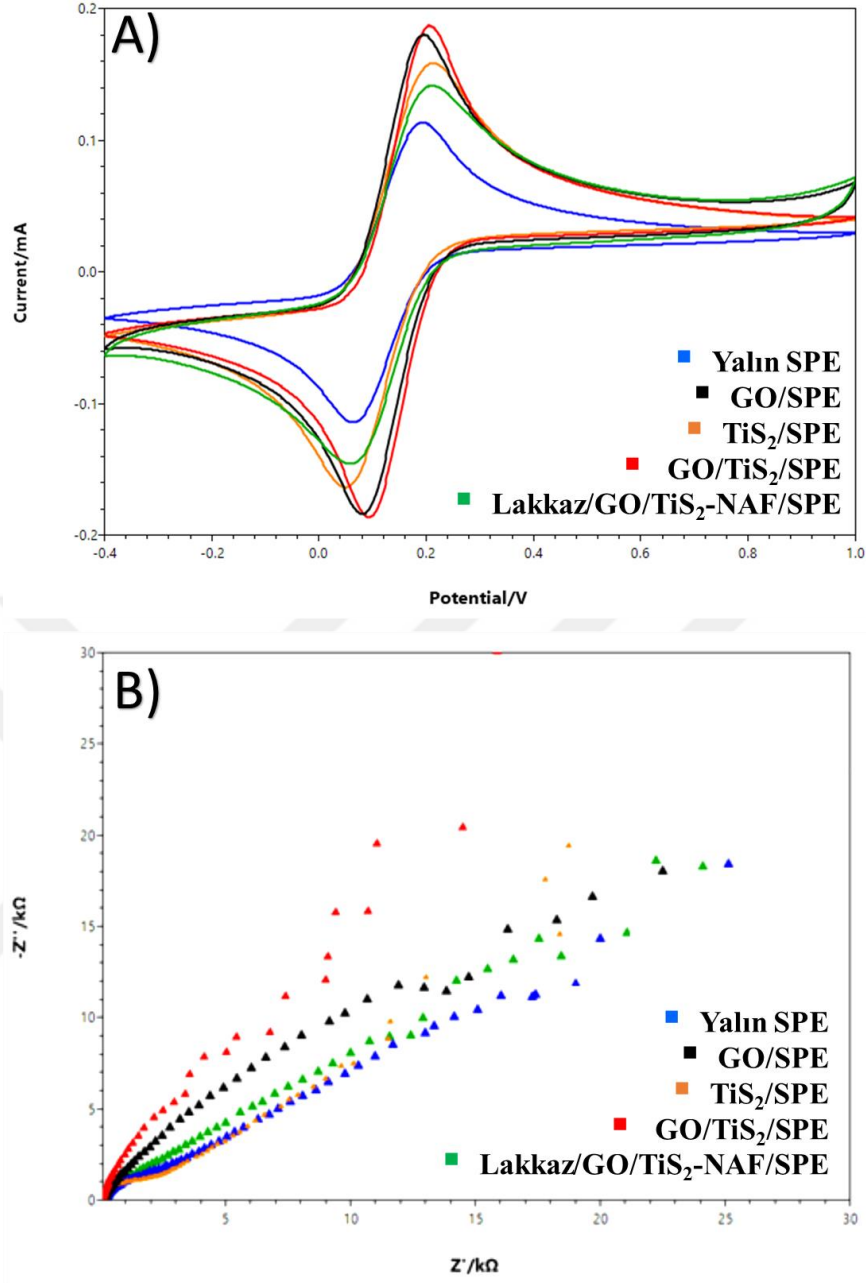
Resim 4.11. A) GO ve B) TiS₂ nanotabakaların TEM görüntüleri.



Resim 4.12. GO/TiS₂ nanokompozitinin TEM görüntüleri A) 100 nm ve B) 60 nm ölçek

4.3.2. Perde Baskılı Elektrotların Modifikasyonu ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu

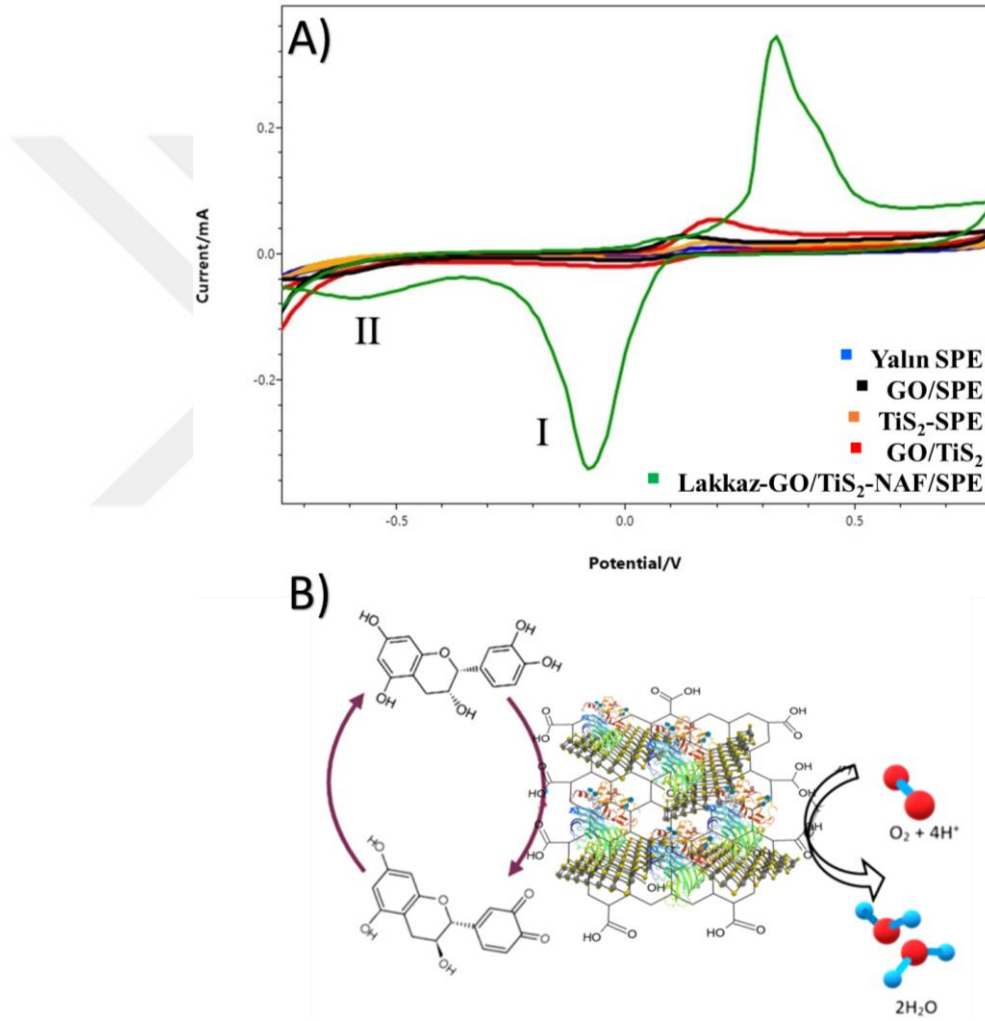
Resim 4.13A, yalın perde baskılı elektrotların, GO nanotabakalarla modifiye perde baskılı elektrotların, TiS₂ ile modifiye edilmiş perde baskılı elektrotların, GO/TiS₂ nanokompozitlerle modifiye edilmiş perde baskılı elektrotların ve Lakkaz-GO/TiS₂-NAF ile modifiye edilmiş perde baskılı elektrotların [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ dönüşümü için iyi tanımlanmış pik akım tepelerini göstermektedir. GO/SPE ve TiS₂/SPE'lerin her ikisinin de yalın SPE'lere göre daha iletken olduğu, GO/TiS₂/SPE'nin de akım tepe noktasının tüm elektrotlardan daha yüksek olması nedeniyle daha iletken olduğu gözlenmiştir. Yapıya lakkazın katılması ve dolayısıyla enzim molekülünün yalıtkan yapısı nedeniyle [Fe(CN)₆]^{3/4-} dönüşümü için elektron transferini engellediği gözlenmiştir. Yalın SPE'lerin, GO/SPE'lerin, TiS₂/SPE'lerin, GO/TiS₂-SPE'lerin ve Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE'lerin elektron transfer dirençleri (R_{ct}) sırasıyla 2594 Ω , 99.07 Ω , 1521 Ω , 90.54 Ω ve 118.5 Ω olarak bulunmuştur. Nanokompozitlerle modifiye edilmiş elektrotlarla karşılaştırıldığında, Lakkaz-GO/TiS₂-NAF-SPE'lere ait yarım daire çapı artmıştır (Resim 4.13B).



Resim 4.13. A) 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ ve 0.1 M KCl içeren 50 mM pH 7.4 PBS tampon çözeltileri için yalın SPE, GO/SPE, TiS₂/SPE, GO/TiS₂/SPE ve Lakkaz/GO/TiS₂-NAF/SPE'lere ait CV grafikleri ve B) EIS spektrumları.

Resim 4.14A'da, 50 mM pH 5.0 asetat tamponu çözeltilisinde 100 μM (-)-epikateşin varlığında, elektrokatalitik özellikleri karşılaştırılan yalın SPE, GO/SPE, TiS₂/SPE, GO/TiS₂/SPE ve Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE'lere ait döngüsel voltamogramlar gösterilmektedir. Yüz μM (-)-epikateşin için tüm elektrotlarla bir çift iyi tanımlanmış redoks

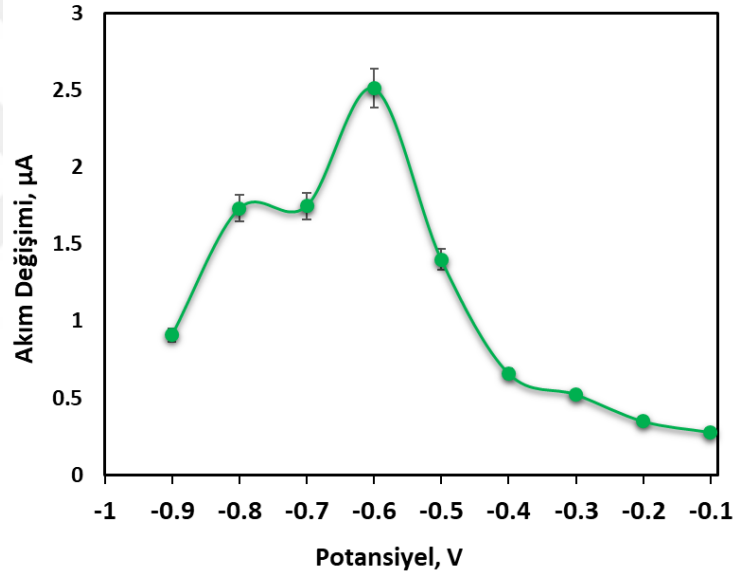
tepe noktası gözlenmiş ancak Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE'nin akım pikleri önemli ölçüde farklıdır. Burada Ag/AgCl'ye karşı -0.126 V civarında gözlemlenen katodik tepe akımının diğer elektrotlara göre oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu voltogramda II ile gösterilen ve daha negatif bir potansiyelde (-0.590 V) bulunan ikinci bir indirgenme pik akımını gözlenirken, yalnız SPE, GO/SPE, TiS₂/SPE, GO/TiS₂/SPE'ler için -0.590 V'da aynı indirgenme akım piki gözlenmemiştir (Resim 4.14B).



Resim 4.14. A) 100 μ M (-)-epikateşin içeren 50 mM pH 5.0 ABS tampon çözeltileri için yalnız SPE, GO/SPE, TiS₂/SPE, GO/TiS₂/SPE, Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE'lere ait CV eğrileri ve B) enzimatik oksidasyon reaksiyonu ve ardından substratın elektrot yüzeyinde geri dönüşümünün şematik gösterimi.

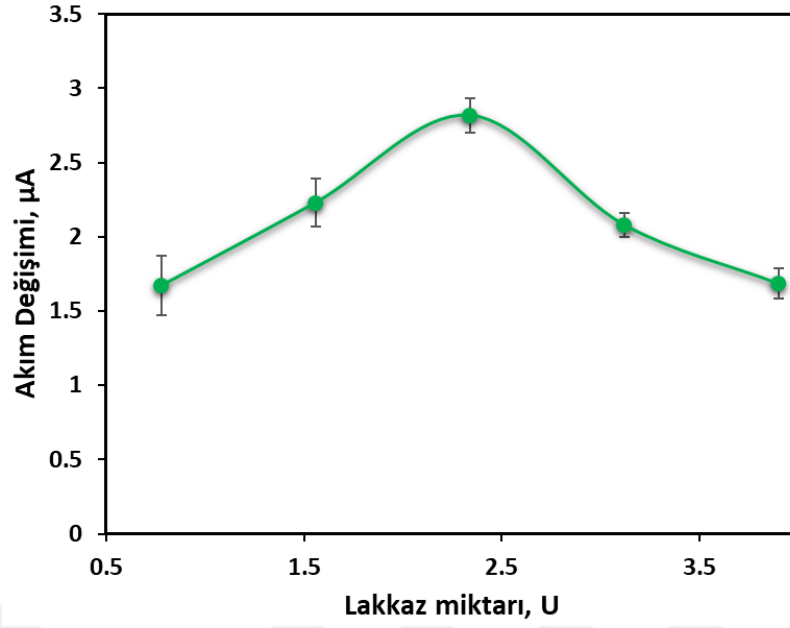
4.3.3. Lakkaz/GO/TiS₂/NAF/SPE'lerin Optimizasyonu

(-)-Epikateşinin tayininin yüksek duyarlık ve düşük tayin sınırı (LOD) ile belirlenmesi için çalışma potansiyelinin seçimi oldukça önemlidir. Bu amaçla, -0.9 ve -0.1 V aralığında amperometrik ölçümler alınmıştır ve Şekil 4.17'de görüldüğü gibi en yüksek amperometrik cevabın elde edildiği -0.6 V çalışma potansiyeli olarak belirlenmiştir. Bu değerin ayrıca Resim 4.14'de verilen CV sonuçlarındaki II ile gösterilen akım pikiyle de örtüştüğü görülmüştür.



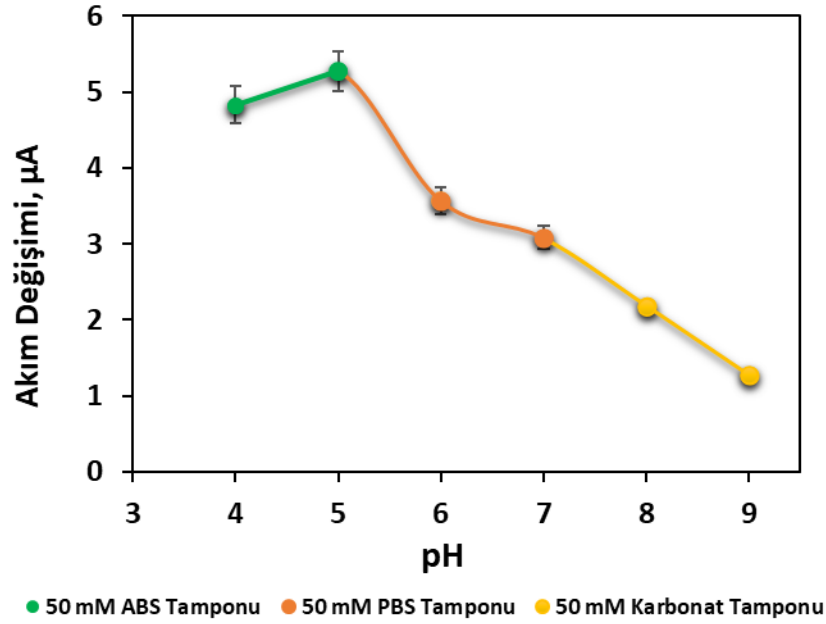
Şekil 4.17. Lakkaz/GO/TiS₂-NAF/SPE'lerin amperometrik yanıtına çalışma potansiyelinin etkisi (50 mM pH 5.0 ABS tampon çözeltisi içerisinde 100 µM (-)-epikateşin varlığında, sıcaklık 25°C).

Lakkaz miktarının biyosensör yanıtına etkisini incelemek için farklı miktarlarda enzim içeren elektrotlar hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.18'de gösterilmektedir ve buradan da görüldüğü gibi, en yüksek akım değeri 2.34 U enzim miktarı ile hazırlanan elektrotlar ile elde edilmiştir.



Şekil 4.18. Lakkaz/GO/TiS₂-NAF/SPE'lerin amperometrik yanıtına lakkaz miktarının etkisi (50 mM pH 5.0 ABS tamponunda 100 µM (-)-epikateşin varlığında, sıcaklık 25°C, uygulanan potansiyel -0.6V).

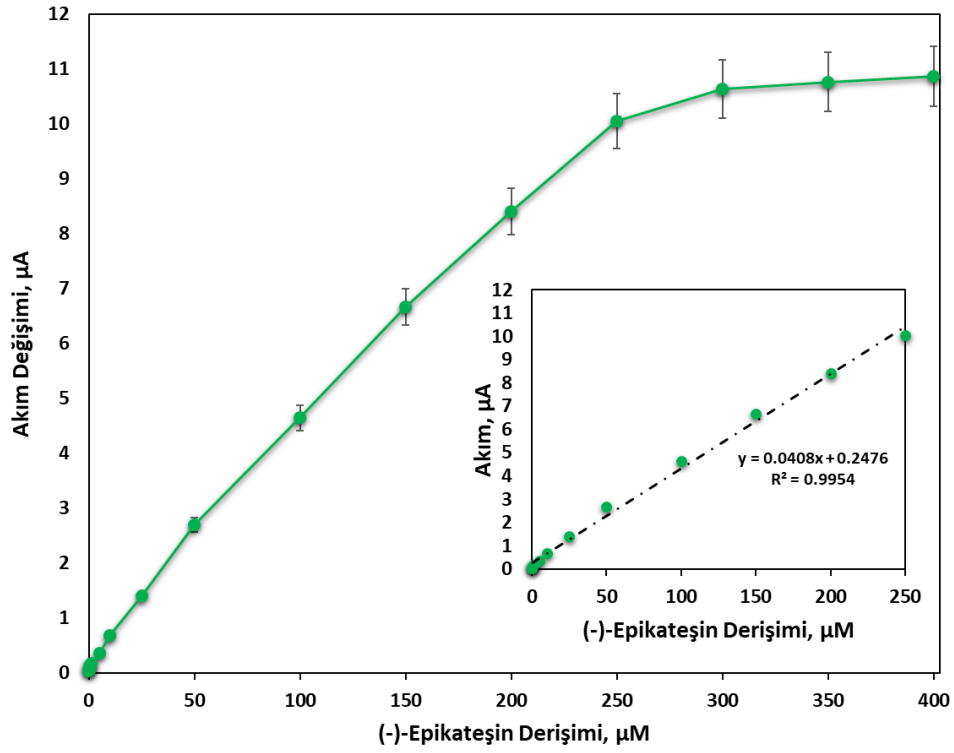
50 mM pH 4.0-5.0 ABS ve 50 mM 6.0-7.0 potasyum PBS ve 50 mM pH 8.0-9.0 karbonat tamponu çözeltileri hazırlanmıştır. Tampon çözeltinin amperometrik yanıtına etkisini incelemek için hazırlanan elektrotların, her bir tampon çözelti içerisinde 100 µM (-)-epikateşin için akım farklanma değerleri kaydedilmiştir. Şekil 4.19'dan da görüldüğü üzere, tasarlanan biyosensör için optimum pH değeri 5.0 olarak belirlenmiştir. pH'a göre akım değerlerinin değişimi gözlemlendiğinde tepe noktası olan 5.0'den sonra akımın azaldığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.19. Lakkaz/GO/TiS₂-NAF/SPE'lerin amperometrik yanıtına pH'nın etkisi (tüm tampon çözeltileri için 100 µM (-)-epikateşin varlığında, sıcaklık 25°C, uygulanan potansiyel -0.6 V).

4.3.4. Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE'lerin Kinetik ve Analitik Performansları

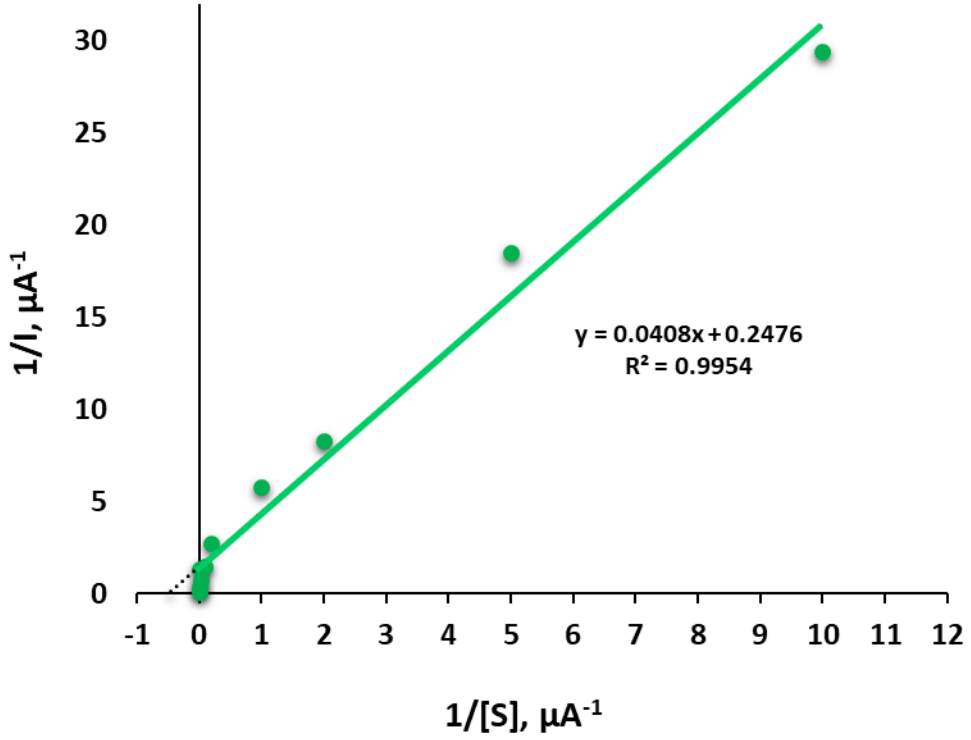
Sunulan bu çalışmada şarap ve meyve suyu numunelerinde (-)-epikateşin tayinine yönelik geliştirilen lakkaz içeren GO/TiS₂ nanokompozit temelli biyosensörün analitik ve katalitik karakterizasyonu, (-)-epikateşin için bir kalibrasyon grafiğinin hazırlanması ile gerçekleştirilmiştir. Optimize koşullar altında, farklı substrat derişimlerinin verdiği amperometrik yanıtlar ölçülmüş ve sonuçlar grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.20). Tasarlanan biyosensörün (-)-epikateşin için gösterdiği doğrusal aralık, 0.1–250 µM olarak belirlenmiştir ($y = 0.0408x + 0.2476$, $R^2 = 0.9954$) (Şekil 4.20, iç grafik). Ölçülebilen en küçük tayin sınırı (LOD), sinyal gürültü oranı 3 olarak alınarak ($S/N=3$) 0.073 µM olarak belirlenmiştir. Ek olarak, biyosensör için ölçüm sınırı (LOQ), 0.223 µM olarak belirlenmiştir. Lakkaz adsorbe GO/TiS₂ nanokompozit ile modifiye edilen SPE'lerin (-)-epikateşin için duyarlılığı, 0.3264 µAµM⁻¹cm⁻² olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.20. Lakkaz/GO/TiS₂-NAF/SPE'ler için 50 mM pH 5.0 ABS tamponuna farklı (-)-epikateşin derişimlerinin eklenmesiyle çizilen kalibrasyon grafiğı (iç grafik: kalibrasyon grafiğinin doğrusal olduğı bölge) (uygulanan potansiyel -0.6 V, sıcaklık 25°C).

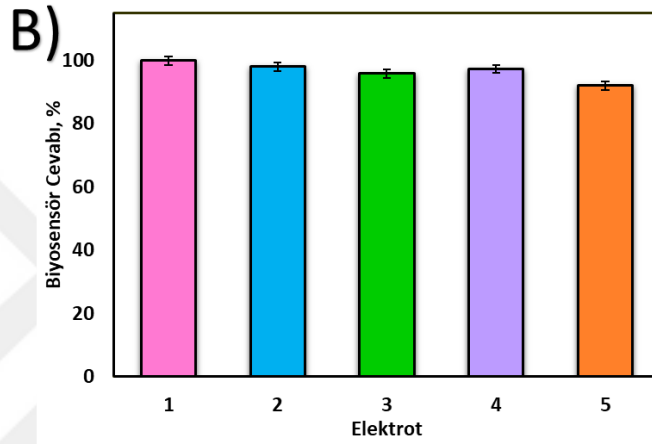
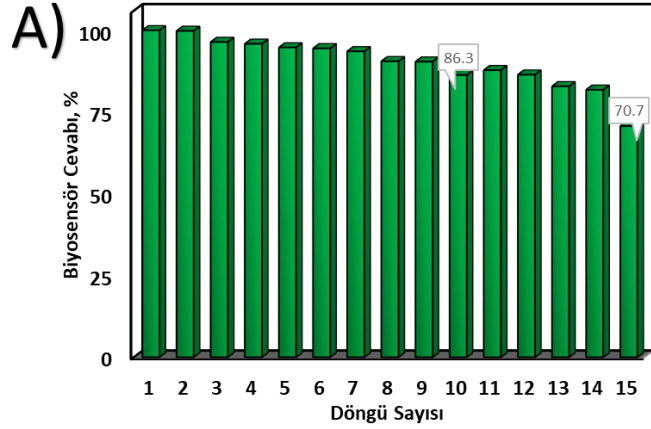
Enzimatik biyosensörün performansı hakkında bilgi veren kinetik parametreler, Şekil 4.21'de verilen Lineweaver-Burk grafiğı kullanılarak hesaplanmıştır. Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE biyosensörünün K_m^{app} ve I_{max} değerleri sırasıyla 2.245 µM ve 0.757 µA olarak bulunmuştur.

Çözeltiye yapılan her (-)-epikateşin ilavesinden sonra her bir elektrodun kararlı hal akımına ulaşması için gerekli süre ölçülmüş ve cevap süresinin ortalama olarak 8 saniyeden küçük olduğı bulunmuştur.



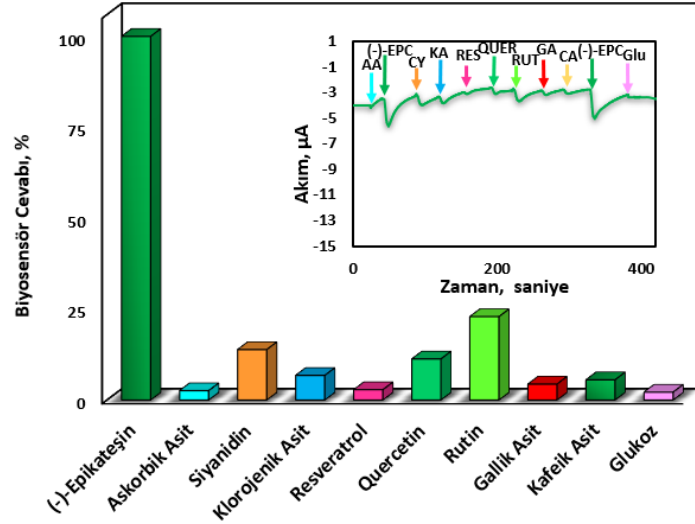
Şekil 4.21. Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE biyosensörünün (-)-epikateşin için Lineweaver–Burk grafiği (uygulanan potansiyel -0.6 V, sıcaklık 25°C, 50 mM pH 5.0 ABS tamponu).

Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE biyosensörünün tekrar kullanılabilirliğini göstermek için aynı elektrot ile 100 μM (-)-epikateşin varlığında amperometrik ölçümler tekrarlanmış ve her bir ölçüm sonrası elektrot ABS pH 5.0 tamponu ile yıkanmıştır. Şekil 4.22A’da gösterildiği gibi, akım sinyalinin kademeli olarak düşmesiyle, lakkaz aktivitesinin ardışık 10 ölçüm sonunda %86.3’ü, 15 ölçüm sonunda yaklaşık %70.7’si korunmuştur. Ardışık olarak alınan 15 ölçüm sonucu hesaplanan bağıl standart sapma değeri ise %4.5 (n=15) olarak bulunmuştur. Aynı şartlarda hazırlanan 5 özdeş elektrodun 100 μM (-)-epikateşin için verdiği % amperometrik cevapları ise Şekil 4.22B’de gösterilmektedir ve bu sonuçlara göre bağıl standart sapma değeri %3.07 (n=5) olarak bulunmuştur.



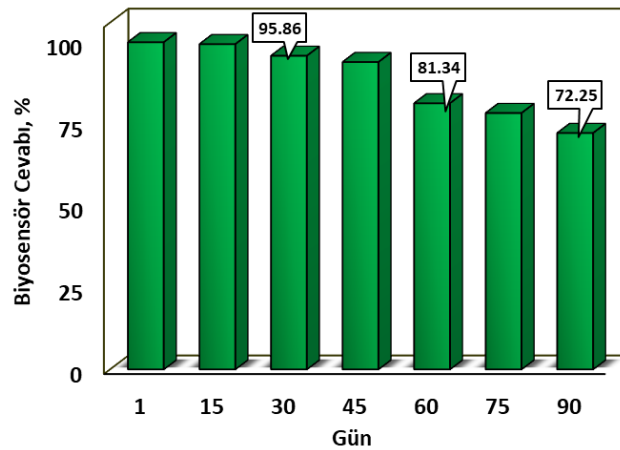
Şekil 4.22. Lakkaz/GO/TiS₂-NAF/SPE'lerin 50 mM pH 5.0 ABS tamponunda ve -0.6 V potansiyelde (-)-epikateşin için A) tekrar kullanılabilirliği ve B) tekrar üretilebilirliği

Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE biyosensörünün şarapta (-)-epikateşin tayininde seçiciliğini göstermek için, 100 µM (-)-epikateşinin amperometrik cevabı, diğer analitlerin varlığında incelenmiştir. Reaksiyon ortamına 100 µM (-)-epikateşin eklendiğinde önemli ölçüde akım azalması gözlenirken, Şekil 4.23'de de gösterildiği gibi 100 µM askorbik asit %2.56; 100 µM siyanidin %13.86; 100 µM klorojenik asit %6.76; 100 µM resveratrol %2.83; 200 µM quercetin %11.28; 100 µM rutin %22.92; 300 µM gallik asit %4.37; 300 µM kafeik asit %5.54 ve 100 µM glukoz %2.14 girişim etkisi göstermiştir.



Şekil 4.23. Elektroaktif türlerin Lakkaz/GO/TiS₂-NAF/SPE biyosensörü yüzeyine eklenmesiyle elde edilen grafik. İç grafik: Girişim yapan elektroaktif türlerin amperometrik cevabını gösteren akım-zaman grafiği (25°C, 50 mM pH 5.0 ABS tampon çözeltisi ve uygulanan potansiyel -0.6 V).

Elektrotlar, depo kararlılıklarını belirlemek için yapılan deneylerde kullanılmadıkları zaman +4°C'de saklanmıştır. Otuzuncu gün sonunda biyosensör yanıtında yalnızca %4.14'lük bir azalma görülmüştür. Altmışıncı günün ve 90. günün sonunda elektrotların biyokatalitik aktivitesinde sırasıyla %18.64 ve %27.75 oranlarında aktivite kaybı görülmüştür (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE biyosensörünün optimum koşullarda depo kararlılığı.

4.3.5. Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE'lerin Şarapta ve Meyve Suyunda (-)Epikateşin Tayini İçin Uygulanabilirliğinin Araştırılması

Tasarlanan biyosensörün gerçek numunelerde (-)epikateşin tayini için kullanılabilirliğini göstermek için şarap ve meyve suyu numune olarak değerlendirilmiştir. (-)Epikateşin eşdeğer referans madde olarak belirlenmiş ve pH 5.0 ABS tamponu ile 1:10 oranında seyreltilen şarap ve meyve suyunda polifenol miktarları belirlenmiştir. On μM derişiminde (-)epikateşin eklenen numuneler için üç tekrar halinde Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE biyosensörü için geri kazanım çalışması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 3'de verilmiş ve spektrofotometrik yöntem ile karşılaştırılmıştır.

Çizelge 3. Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE biyosensörü ile şarapta ve meyve suyunda (-)epikateşin tayini.

Örnek	Eklenen Miktar (μM)	Elektrokimyasal Metot			Folin-Ciocalteu Metodu		
		İçerik (μM)	Tayin Edilen (μM)	%Kazanım	İçerik (μM)	Tayin Edilen (μM)	%Kazanım
Kırmızı şarap	10	445.00	486.00	108.96	399.67	450.66	112.59
Meyve suyu	10	19.90	21.73	109.19	22.66	24.00	105.91

5. TARTIŞMA

Bu tezde bitkiler, hayvanlar ve insan sağlığı üzerinde büyük zararlı etkileri olan katekolün bazı evre numunelerinde tayini, miktarlarındaki değişiminden dolayı bir hastalık belirteci olan dopaminin biyolojik numunelerde tayini ve gıda kalitesini artırmak için önemli olan ve antioksidan özellikleriyle bilinen (-)-epikateşinin gıda numunelerinde tayini için hızlı, ucuz, tekrarlanabilir ve duyarlı biyosensörlerin tasarımı gerçekleştirilmiştir.

Literatürde, polifenolik bileşiklerin ve dopaminin tayini için tasarlanmış biyosensörler bulunmaktadır ancak evre, biyolojik sıvı ve gıda numunelerinde sürekli uygulamalar için daha düşük tayin sınırlarına inebilecek, daha geniş çalışma aralığına sahip, yüksek seçicilikte ve daha uzun süreli kullanılabilir biyosensör sistemlerine ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Amperometrik cihazlarda, enzimin kararlılığının bozulması ve dolayısıyla yetersiz performans en çok karşılaşılan problemlerin başında gelmektedir. Hazırlanma maliyeti düşük ve yeniden kullanılabilirliği mümkün nanomalzemeler ve enzimin aktivitesini düşürmeyen immobilizasyon yöntemlerinin uygun bir kompozisyonunun mümkün olabileceğini gösteren bu tez çalışmasının, biyosensör üretimi fizibilitesinin artırılması için literatüre önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu amaçla farklı boyutlara sahip 0D, 1D ve 2D nanomalzemeler sentezlenmiş ve sentezlenen nanomalzemelerin karakterizasyonu için SEM, TEM, EDX ve ESR tekniklerinden faydalanılmıştır. Katekolün, dopaminin ve (-)-epikateşinin tayini için lakkaz enziminin, kullanılan malzeme özellikleri dikkate alınarak uygun stratejiler ile nanomalzemelere immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Biyosensör tasarımında, perde baskılı elektrotlar (SPE) kullanılmış ve yalın elektrotlar ve modifiye elektrotlar için elektrokimyasal karakterizasyon CV ve EIS ölçümleriyle gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyonu yapılan yalın elektrotlar ve modifiye edilmiş elektrotların elektrokatalitik performansları katekolün, dopaminin ve (-)-epikateşinin varlığında elde edilen yanıtla göre değerlendirilmiştir. Elektrokimyasal lmler sonucu hazırlanan biyosensörlerin optimum koşulları belirlenmiş ve bu biyosensörlerin tayin sınırı, doğrusal çalışma aralığı, duyarlılığı, tekrar retilirliği, tekrar kullanılabilirliği, depo kararlılığı ve seçiciliği

araştırılmıştır. Ayrıca musluk suyu ve göl suyunda katekol; ticari insan serumunda ve yapay idrarda dopamin; şarap ve meyve suyunda (-)-epikateşin tayinine yönelik uygulamalar yapılmıştır.

5.1. Göl Suyu ve Musluk Suyunda Katekol Tayini için Lakkaz İmmobilize Cys-Ag@Fe₃O₄ Manyetik Nanopartiküllerle Modifiye Perde Baskılı Elektrotların Hazırlanması

Katekol, resorsinol, bisfenol-A, nonilfenol, triklosan ve genistein gibi çok sayıda fenolik bileşik, farklı endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır ve çevremizde organik kirleticiler olarak varlığını sürdürmektedir (Rodríguez-Delgado, 2015). Bunların arasında katekol, ekolojik sistemdeki düşük çözünürlüğü ve yüksek toksisitesi nedeniyle Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından potansiyel kanserojen olarak sınıflandırılan fenolik bir bileşiktir. Ayrıca, çok düşük derişimlerde bile insanlar ve hayvanlar için toksiktir ve ateroskleroz, kardiyovasküler, Parkinson, Alzheimer gibi hastalıklara da sebep olmaktadır. Bu yüzden çevre sularında katekolün tayini için hızlı ve etkili bir yöntem oluşturmak çok önemlidir (Leboukh vd., 2018). Katekolün mükemmel elektrokimyasal aktivitesi sebebiyle gıda ve çevre örneklerinde tayini için amperometrik biyosensörler yaygın bir şekilde çalışılan bir araştırma alanıdır. Amperometrik yöntemle katekol tayininde, sabit bir potansiyel uygulandığında elektrot yüzeyinde katekolün indirgenmesi veya yükseltgenmesiyle oluşan akım farklanmaları ölçülmektedir. Ölçülen akım sinyalinin katekol derişimi ile doğrusal bir ilişkisi vardır (Sadeghi vd., 2015).

5.1.1. Cys-Ag@Fe₃O₄ Manyetik Nanopartiküllerin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Lakkazın Manyetik Nanopartiküllere İmmobilizasyonu

Nano boyutlu malzeme tabanlı elektrokimyasal sinyal amplifikasyonları, elektrokimyasal biyosensörlerin hem duyarlılığını hem de seçiciliğini geliştirmek için

mükemmel bir potansiyele sahiptir. Nanomalzemelerin, hedef molekülleri tayin etmek için yüksek performanslı elektrokimyasal algılama platformlarının hazırlanmasında ciddi bir rol oynadığı kabul edilmektedir. Ayrıca nanomalzemeler, sinyal iletimini hızlandıran iletkenlik ve biyouyumluluk gibi avantajlar sağlamaktadır. Elektrot yapımı için fonksiyonel materyallerin hazırlanmasına ilişkin çok sayıda araştırma, elektrokimyasal biyosensörlerin uygulamalarını genişletmektedir. Nanomalzemelerin çekiciliği, bir immobilizasyon matriksi olabilmelerinde ve ayrıcalıklı özelliklerinde yatmaktadır. Biyomoleküllerin işlevi ile birleştirilen bu özellikler, duyarlık ve özgüllük açısından biyoelektrot performansının artırılmasına katkıda bulunur (Malik vd., 2021).

Sentezlenen Cys-Ag@Fe₃O₄ manyetik nanopartiküllerin L-sistein ile fonksiyonelleştirilmesi için tiyollerin Ag'e olan kuvvetli afinitelerinden faydalanılmıştır. Böylece L-sisteine ait -COOH gruplarının, lakkaz enziminin manyetik nanopartiküller yüzeyine kovalent immobilizasyonunu mümkün kıldığı düşünülmektedir (Chen vd., 2018). Bu karboksilik gruplar, standart bir EDC/NHS kimyası kullanılarak aktive edilmiştir. Böylece Şekil 3.1'de gösterildiği gibi manyetik nanopartiküller ve enzim molekülleri arasında kovalent bağlar oluşturulmuştur. EDC, Ag@Fe₃O₄ üzerindeki -COOH grupları ve lakkaza ait amino grupları arasında kovalent bağ oluşumu için kullanılan etkili bir birleştirme ajanıdır. Bu kimyasal bağ, tipik olarak destekten enzim sızıntısı riskini azaltır ayrıca enzimin kararlılığını da artırır. NHS veya suda çözünür analogu olan sulfo-NHS, genellikle verimliliği artırmak için reaksiyonlara dahil edilir. EDC/NHS çapraz bağlama reaksiyonu, 4.5 ila 7.2 aralığındaki pH koşulları altında verimlidir (González-Domínguez vd., 2016; Gomes vd., 2020).

Cys-Ag@Fe₃O₄ manyetik nanopartiküllerin ortalama 10 nm civarında boyutlara sahip küresel yapısını ve pürüzsüz yüzeyini gösteren TEM görüntüleri Resim 4.1'de verilmiştir. Resim 4.2'deki EDX spekturumu, Fe ve Ag metallerinin yanı sıra manyetik nanopartikülleri fonksiyonelleştirmek için yapıya bağlanan L-sistein yapısındaki C, O ve S atomlarını da göstermektedir. Benvidi ve Jahanbani (2016) aynı yöntemle sentezlenen polietilenimin (PEI) ile fonksiyonelleştirdikleri Ag kaplı Fe₃O₄ nanopartiküllerin TEM sonuçlarına göre partikül boyutunun ortalama 51.2 nm olduğunu bildirmişlerdir.

Sentezlenen nanopartiküllerin manyetik özelliklerini gösteren ESR analizi sonucu Resim 4.3'de gösterilmektedir. Sentezlenen manyetik nanopartiküllere artan dış bir manyetik alan uygulandığında, yerel manyetik alan şiddeti artarak sinüs eğrilerine benzer

bir grafik göstermektedir. Bu spektrumda elde edilen Hr değeri (manyetik alan rezonansı) kullanılarak g faktörü 1.95 olarak hesaplanmıştır. Literatürde Fe³⁺ için g faktörü değerleri 1.4-3.1 (düşük spin kompleksleri) ve 2.0-9.7 (yüksek spin kompleksleri) olarak bildirilmiştir (Evli ve Uygun, 2019). Bu değerlerle karşılaştırıldığında sentezlenen nanopartiküllerin manyetik özellik kazandığı görülmektedir.

5.1.2. Perde Baskılı Elektrotların Lakkaz İmmobilize Ag@Fe₃O₄ Manyetik Nanopartiküller ile Modifikasyonu ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Yalın SPE'lerin, Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE'lerin ve Lakkaz-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE'lerin yük transfer özelliklerini karakterize etmek için CV ve EIS ölçümleri, 5 mM [Fe(CN)₆]^{3/4-} ve 0.1 M KCl içeren 50 mM pH 7.4 PBS tampon çözeltilerinde yapılmıştır. Resim 4.4A'da verildiği gibi, yalın SPE'lere kıyasla, sentezlenen Cys-Ag@Fe₃O₄ manyetik nanopartiküllerle modifiye edilmiş SPE'lerin CV spektrumlarında, Cys-Ag@Fe₃O₄ nanopartiküllerin iletken yapısı nedeniyle pik akımlarının daha yüksek olduğu görülmektedir. Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE elektroduna ait akım değerlerindeki düşüş ise Cys-Ag@Fe₃O₄ manyetik nanopartiküller yapısına enzimin bağlanmış olduğunu kanıtlar çünkü lakkazın [Fe(CN)₆]^{3/4-} redoks probu için herhangi bir katalitik etkinliği yoktur; yani diğer bir deyişle, Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE nanobiyokompozitinin [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ dönüşümünde elektron transferini engellediği gözlenmektedir. Ayrıca bu sonuçlar empedans deneyleri ile elde edilen sonuçlarla da uyumludur. Resim 4.4.B'de verilen Nyquist grafiklerinde gösterildiği gibi tüm eğrilerin hem elektron transferi hem de difüzyon sürecinin aynı anda gerçekleştiğini gösteren yarım daire ve düz bir çizgiden oluştuğu görülmektedir. Empedans ölçümlerinde empedansın yarım daire çapı, elektrot ara yüzündeki redoks probunun elektron transfer kinetiğini kontrol eden ve önemli bir parametre olan elektron transfer direncine (R_{ct}) eşittir. Fitlenmiş sonuçlara göre yalın SPE'lerin ve Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE'lerin elektron transfer dirençleri (R_{ct}) sırasıyla 2869 Ω ve 1115 Ω olarak bulunmuştur. Modifikasyondan sonra R_{ct} değerindeki bu önemli azalmanın, redoks türleri arasındaki elektron transfer verimliliğinin artmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nanopartikül ile modifiye edilmiş elektrotlarla karşılaştırıldığında, lakkazın nanopartiküllere immobilizasyonu ile

SPE'lerde yarım daire çapı artmakta olup, 9562 Ω R_{ct} değeri göstermektedir. R_{ct} değerindeki bu artış, düşük frekanslarda zayıf iletkenleri olan ve elektron transferini engelleyen enzimler dahil çoğu biyolojik moleküle atfedilmektedir (Chawla vd., 2012a). Sadeghi vd. (2015) katekol tayini için tasarladıkları çalışmada karbon pasta elektrot yüzeyini Fe_3O_4 /polianilin/kitosan biyokompozit ile modifiye etmişlerdir. Elde ettikleri CV sonuçlarında nanokompozit filmin elektriksel iletkenliğinin ve elektrokatalitik özelliklerinin, yalın karbon pasta elektroda göre yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca lakkaz tutuklanmış Fe_3O_4 /polianilin/kitosan biyokompozit film için yapılan CV ölçümlerinde akımda düşüş gözlemlenmiş ve böylece enzimin nanokompozit matrisinde tutuklandığını bildirmişlerdir. Bu sonuçları empedans deneyleri ile elde edilen sonuçlarla desteklemişlerdir. Wang vd. (2008) katekol tayini için hazırlanan biyosensörlerde, tirozinazın immobilizasyonu için Fe_3O_4 -kitosan kompozit hazırlamışlardır. Bildirdikleri EIS sonuçlarına göre, camсы karbon elektrot (GCE) için yüksek frekanslarda neredeyse düz bir çizgi gözlemleyip, nanokompozit ile modifiye elektrotlar için ise yarım daire çapının önemli derecede arttığını gözlemişlerdir. Kitosan- Fe_3O_4 nanokompozitinin $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ dönüşümünde elektron transferini engellediğini tayin etmişler ve yine de kitosan- Fe_3O_4 nanokompozit filmin empedansının kitosan ile hazırlanmış camсы karbon elektrodun empedansından daha küçük olduğunu bulmuşlardır. Bu şekilde azalmış empedans değerinin Fe_3O_4 nanopartiküllerinin iletkenlik özelliklerinden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Fe_3O_4 nanopartiküllerin biyosensördeki rolünü doğrulamak için, Kitosan/GCE ve Fe_3O_4 /Kitosan/GCE ile 0.5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ içeren 0.5 M KNO_3 çözeltisinde döngüsel voltametri deneyleri gerçekleştirmişlerdir ve bu sonuçlar Fe_3O_4 /Kitosan/GCE redoks tepe akımlarının, Kitosan/GCE'den daha büyük olduğunu göstermiştir.

Katekolün redoks özelliklerinden dolayı, tasarlanan biyosensörünün elektroaktivitesini ve ayrıca iletkenliğini değerlendirmek için katekol varlığında CV ölçümleri ile ek karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Yalın SPE, Cys-Ag@ Fe_3O_4 /Kitosan/SPE ve Lakkaz/Cys-Ag@ Fe_3O_4 /Kitosan/SPE'lerin 50 mM pH 5.5 ABS tampon çözeltisi içerisinde 50 μ M katekol varlığında CV yanıtları incelenmiştir. Resim 4.5A'da gösterildiği gibi tüm elektrotlar için, katekolün 1,2-benzokinona yükseltgenmesi ve elektrot yüzeyinde 1,2-benzokinonun katekole indirgenmesine bağlı sırasıyla bir anodik ve bir katodik olmak üzere iki farklı potansiyelde akım pikleri gözlenmiştir. Ancak 50 μ M katekol varlığına rağmen yüzeyinde lakkazın bulunmadığı elektrotlar için önemli bir redoks zirvesi gözlenmemiştir. Bununla birlikte, yalın elektrotlar lakkaz immobilize nanomalzemeler ile modifiye

edildiğinde redoks akımları için önemli bir artış görülmüştür. Ayrıca yalnızca Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan ile modifiye edilmiş SPE'lere kıyasla lakkazın immobilize edildiği durumlarda o-kinonun doğrudan indirgenmesini gösteren tepe akımları daha yüksektir. En yüksek pik akımlarına sahip olduğu için, Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE'lerin katekolün yükseltgenmesinde en yüksek elektrokatalitik aktiviteye sahip olduğunu kanıtlar. Diğer bir deyişle, katekolün lakkaz ile 1,2-benzokinona oksidasyonundan ve 1,2-benzokinonun indirgenmesinden kaynaklanan bu pik akımları manyetik nanopartiküller modifikasyonu ile artırılmıştır (Resim 4.5B). Bu biyoelektrokimyasal davranış, lakkazın içerdiği redoks aktif Cu^I/Cu^{II} merkezi sayesinde Fe₃O₄ manyetik nanopartiküllerinin yüksek yüzey alanı ve iletkenliğinin yanı sıra yapıya Ag metalinin entegrasyonu ile elektrot yüzeyinin kütle transfer özellikleri gelişmiştir. Böylece enzimin redoks aktif merkezinden elektrot yüzeyine elektronların transferinin kolaylaşması sağlanmıştır (Yu vd., 2013). Zhang vd. (2020a) katekol tayini için hazırladıkları biyosensör çalışmasında, lakkazın immobilizasyonu için 2D MoS₂ ve altın nanopartiküller (AuNPs) ile nanokompozit hazırlamışlardır. Lakkaz ile, MoS₂/Lakkaz ile ve AuNPs-MoS₂/Lakkaz ile modifiye ettikleri camı karbon elektrotlar (GCE) ile 350 µM katekol varlığında asetat tamponu çözeltisinde (0.2 M, pH 5.0) CV ölçümleri gerçekleştirmişlerdir. Yalnızca lakkaz ile modifiye edilen GCE'ler ile karşılaştırıldığında, MoS₂/Lakkaz ile modifiye GCE'lerin pik akımlarında düşüş gözlemlenmiş ve bunu MoS₂ nanotabakaların yalıtkanlıkları nedeniyle, elektrot yüzeyinde elektron transfer hızını düşürdükleri şeklinde yorumlamışlardır. AuNPs-MoS₂-Lac/GCE'ye dayalı biyosensörün, Lac/GCE ve MoS₂-Lac/GCE'den daha yüksek oksidasyon akımı piki gösterdiğine dikkat çeken araştırmacılar, geniş yüzey alanı, mükemmel elektrokataliz, yüksek iletkenlik ve güçlü adsorpsiyon yeteneği nedeniyle AuNP'lerin, redoks türleri ve MoS₂ arasındaki elektron transferini teşvik ettiğini ve modifiye elektrodun yanıt sinyallerini geliştirdiğini bildirmişlerdir.

5.1.3. Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE'lerin Optimizasyonu

Göl suyu ve denizlerde katekol, düşük yükseltgenme potansiyellerine sahip diğer polifenolik bileşiklerle bir arada bulunur. Bu sebeple, diğer bileşiklerin elektro-oksidasyonu yoluyla girişim etkileri olmaksızın katekolün doğru bir şekilde tayini oldukça önemlidir.

Daha yüksek potansiyeller genellikle daha yüksek tayin sinyalleri sağlamasına rağmen daha az seçicilik gibi dezavantajlar sunar. Bu nedenle de elektrodun düşük potansiyeller altında elektrokataliz yeteneğinin artırılması arzu edilen bir tercihtir. Elektrot yüzeyindeki lakkaz molekülleri, oksijen ile yükseltgenir ve daha sonra enzimin yükseltgenmiş formu için elektron donörü olarak işlev gören fenolik bileşikler tarafından yeniden indirgenir. Bu reaksiyonda, fenolik bileşikler kinonlara dönüştürülür. Bu ürünler (kinonlar), elektrot yüzeyinde 0 V'nin altındaki potansiyellerde indirgenebilir ve fenol derişimi ile orantılı bir indirgenme akımı sağlar. Bu yüzden tüm amperometrik deneyler için çalışma potansiyeli -50 mV olarak seçilmiştir (Jarosz-Wilkołazka vd., 2004).

Enzimle modifiye edilmiş karbon elektrotlar, immobilize edilen enzime ve enzimin gerçekleştirdiği biyokimyasal ve elektrokimyasal reaksiyonlara bağlı olarak analitin tayini için bir duyarlık gösterir. Bu sebeple Cys-Ag@Fe₃O₄ manyetik nanopartiküllere bağlı lakkaz miktarı ve dolayısıyla aktivitesi, biyosensörün amperometrik yanıtını etkilemektedir. Lakkaz miktarının biyosensör yanıtına etkisini incelemek için farklı miktarlarda lakkaz enzimi ile elektrotlar hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1'de gösterilmektedir. Burada da görüldüğü gibi, en yüksek akım değeri 8 U enzim miktarı ile hazırlanan elektrot ile elde edilmiştir. Daha yüksek aktiviteye sahip enzim ile gerçekleştirilen denemeler sonucu, hem grafikte doygunluk gözlemlendiği, hem de daha az enzim kullanmak için 8 U üst limit olarak seçilmiştir. Düşük miktarlarda lakkaz ile hazırlanan elektrotların amperometrik yanıtlarının düşük olması, elektrotların yüzeyinde katekolün yükseltgenmesi ve indirgenmesi tepkimesine bağlı olarak elektron transferinin nispeten daha düşük olduğu şeklinde açıklanabilir. Söylemez vd. (2019) katekolün tayini için konjuge bir polimer olan tiyenotiyofen-benzoksadiazol-alt-benzoditiyofeni (BOTT), bir grafit elektrot yüzeyine damlatarak modifiye etmişler ve ardından lakkazın immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Biyosensör performansı üzerindeki etkisini araştırmak için enzim miktarını tampon çözelti içerisinde 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 ve 0.8 mg/mL aralığında değiştirmişlerdir. En iyi amperometrik yanıtın alındığı biyosensörün 10.9 U (0.5 mg/ml) ile elde edildiğini bildiren araştırmacılar bu aktiviteye sahip lakkaz ile katekolün tayini için LOD, doğrusal aralık ve duyarlık değerlerini sırasıyla 0.38 µM, 0.5–25.0 µM ve 110.81 µA/mM olarak bildirmişlerdir.

Manyetik nanopartiküller, enzimatik biyosensörlerin aktivite kararlılığı için büyük önem taşır ve enzimlerin immobilizasyonu için iyi bir ortam sağlamaktadır. Ayrıca

elektrokimyasal enzim biyosensörlerinin duyarlılığını artırmak için de kullanılan manyetik nanopartiküller, redoks aktif bir türün elektrot yüzeyine ulaşmasını sağlar ve bu nedenle miktarlarının optimizasyonu önemlidir. Bu amaçla, enzim miktarı 8 U değerinde sabit tutularak, 0.1, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/mL derişimlerinde hazırlanan manyetik nanopartiküller ile modifiye edilen elektrotlarla amperometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.2'deki verilere göre, en kararlı ve en yüksek amperometrik yanıt veren elektrot, 2.0 mg/mL manyetik nanopartikül derişimi ile hazırlanmış SPE olarak seçilmiştir. Belirlenen manyetik nanopartikül aralığından (0.1–4 mg/mL) daha düşük veya yüksek derişimlerle hazırlanan elektrotlarla kararlı sonuçlar gözlenmemiştir. Qu vd. (2014) SiO₂ ile modifiye edilmiş zirkonya nanopartikülleri, katekol için oldukça duyarlı amperometrik yanıt sergileyen yeni bir biyosensör oluşturmak üzere lakkazın immobilizasyonu için kullanmışlardır. Elektrot yüzeyindeki farklı miktarlarda Si-ZrO₂/lakkaz ile tepe akımı arasındaki ilişkiyi şöyle tanımlamışlardır: Si-ZrO₂/lakkaz miktarı arttığında, katodik tepe akımı artmış ve maksimuma ulaştıktan sonra azalmaya başlamıştır. Bu durumu, elektrot yüzeyinde Si-ZrO₂/lakkaz kalınlığının artması sonucu elektrodun elektron transfer hızının azalmaya başlaması ile açıklamışlardır.

Enzimler, katalitik aktivite performanslarını en iyi şekilde optimum pH'da gösterirler. Amino asitlerin yan zincirleri arasındaki etkileşimler enzimin yapısını belirler ve pH değişiklikleri elektrostatik etkileşimleri ve hidrojen bağlarını etkiler. Elektrostatik etkileşimler, amino asitlerin pozitif ve negatif yüklü yan zincirleri arasındaki iyonik bağlardır. Artan pH, yan gruplardaki -NH₃⁺'yi nötr -NH₂ grubuna ve azalan pH ise -COO⁻'yu nötr bir -COOH grubuna dönüştürür. Her iki durumda da, amino asit birimleri arasındaki elektrostatik etkileşimler bozulur ve bu da enzimin üç boyutlu yapısında bozulmalara neden olur. Ayrıca değişen pH, hidrojen bağlarını da bozarak enzimde konformasyonel değişikliklere yol açar. Bir enzim biyosensörünün optimum pH değerini belirlemek bu nedenle oldukça önemlidir (Wu vd., 2020). Bu amaçla, 50 mM pH 4.0–5.5 ABS ve 50 mM 6.0–7.0 PBS tamponu çözeltileri hazırlanmıştır. Tampon çözeltinin amperometrik yanıt etkisini incelemek için 2 mg/mL manyetik nanopartikül, 8 U ve %0.5'lik kitosan ile hazırlanan elektrotların, her bir tampon çözelti içerisinde 100 µM katekol için akım değerleri kaydedilmiştir. Şekil 4.3'den de görüldüğü üzere, tasarlanan biyosensör için optimum pH değeri 5.5 olarak belirlenmiştir. pH'a göre akım değerlerinin değişimi gözlemlendiğinde genel olarak, akım değeri yükselen pH değeri ile artmış ve ardından tepe noktası olan 5.5'den sonra azalmıştır. pH arttıkça akımın azalması, katekolün üst pH

değerlerinde anyonik forma dönüşmesi ve bu anyonik formu ile elektrotların yüzeyi arasında elektrostatik itmeye neden olması ile açıklanabilir. Ayrıca, yüksek pH değerlerinde çözeltide proton eksikliği olduğundan, elektrokimyasal algılamalarda soruna ve mevcut sinyalde bir düşüşe neden olabilmektedir (Freire vd., 2002; Quan ve Shin, 2004; Qi ve Zhang, 2005; Nazari vd., 2015; Song vd., 2015). Literatür taraması sonucu, lakkaz enziminin optimum pH çalışma aralığının 4.0–7.5 olduğu, lakkaz biyosensörleri için optimum pH çalışma aralığının ise pH 4.5–5.5 arasında olduğu bildirilmiştir (Quan ve Shin, 2004; Wang vd., 2014). Guo vd. (2014) fonksiyonelleştirilmiş azot içeren düzenli bir mezogözenekli karbon (N-OMC) malzemesini, polianilin bir SBA-15 mezogözenekli silika şablonu içerisinde sentezlemişler ve lakkaz enzimini N-OMC/polivinil alkol (PVA) film içerisinde hapsederek bir amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Araştırmacılar, çözelti pH'nın amperometrik yanıt akımı üzerindeki etkisini pH 4.0 ile 8.0 arasında incelemişler ve maksimum yanıt akımını pH 5.0'de gözlemişlerdir.

5.1.4. Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan SPE'lerin Kinetik ve Analitik Performansları

Substrat derişimi enzim aktivitesini etkileyen sınırlayıcı bir faktördür. Sabit enzim derişiminde substrat derişimi arttıkça reaksiyon hızı önce artar, daha sonra doğrusal olmayan bir şekilde artarak bir plato değerine ulaşır. Substrat derişimi ile enzim elektrodu arasındaki ilişkiyi veren kalibrasyon grafiğinde bu ilişkinin doğrusal olduğu bölgeye “doğrusal aralık” denir. Göl suyu ve musluk suyunda katekol tayinine yönelik geliştirilen Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörünün doğrusal çalışma aralığı farklı katekol derişimlerine karşı amperometrik yanıtların ölçülmesiyle ve bir kalibrasyon grafiğinin (Şekil 4.4) hazırlanması ile belirlenmiştir. Tasarlanan biyosensörün katekol için gösterdiği doğrusal aralık 0.1–100 µM olarak belirlenmiştir ($y=7.5071x+37.372$ ve $R^2=0.9978$). Literatür ile karşılaştırıldığında bu doğrusal aralık, oldukça geniştir. Ölçülebilen en küçük derişim sınırı (LOD), sinyal gürültü oranı 3 olarak alınarak ($S/N=3$) 0.06 µM olarak belirlenmiştir. Ek olarak, biyosensör için ölçüm sınırı (LOQ) 0.203 µM olarak belirlenmiştir. Verrastro vd. (2016) çalışmalarında 13.6 U/mg aktiviteye sahip lakkaz enzimi ile tasarladıkları biyosensör için LOD değerini 1 µM, LOQ değerini ise 5 µM olarak hesaplamışlardır.

Michaelis-Menten sabiti K_m , hem enzimatik afinitenin hem de enzim-substrat kinetik sabitlerinin bir göstergesidir (Kamin ve Wilson, 1980). Enzimatik biyosensörün performansı hakkında bilgi veren kinetik parametreler Lineweaver-Burk eşitliğinden hesaplanabilir. Bu eşitlik Michaelis-Menten eşitliğini doğrusal hale getirmek için kullanılan bir eşitliktir. K_m^{app} , bir enzimin substratı için görünür afinitesini belirtir ve daha küçük bir K_m^{app} değeri, daha etkili substrat bağlanmasını ve daha yüksek katalitik aktiviteyi gösterir. Tasarlanan Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörünün katekol için K_m^{app} ve I_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiği (Şekil 4.5) ve Lineweaver-Burk Eşitliği ile (Eşitlik 9) sırasıyla 0.021 mM ve 588.235 nA olarak bulunmuştur.

Ayrıca, Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörünün analitik özellikleri, Çizelge 4'de gösterildiği gibi diğer lakkaz temelli biyosensörlerle karşılaştırılmıştır. Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörü katekol tayininde katalitik aktivite, tayin sınırı, duyarlık ve doğrusal aralık açısından iyi bir performans göstermiştir ve oda sıcaklığında yeniden kullanılabilme ve yeniden üretilebilme performansı sergilemiştir. Genel olarak bu tez çalışmasının bu kısmından elde edilen sonuçlar, manyetik nanopartiküllerin, enzimler için iyi korunmuş aktivite ve işlevsellik ile birlikte etkili bir immobilizasyon desteği olarak kabul edilebileceğini göstermektedir. Manyetik nanopartiküller ile modifiye edilen SPE, kararlı, maliyeti ucuz ve kolay hazırlanabilen biyosensörlerin üretimi için yeni ve etkili bir yaklaşım olma potansiyelini göstermektedir.

Çizelge 4. Katekol tayini için tasarlanan çeşitli lakkaz temelli biyosensörlerin karşılaştırılması.

Elektrot	K_m (mM)	LOD (μ M)	Duyarlık (μ AmM \cdot cm $^{-2}$)	Doğrusal Aralık (μ M)	Kaynak
Lac- α -Fe $_2$ O $_3$ NC-CPE	-	4.28	-	8.0–800.0	Sarika vd., 2017
Fe $_3$ O $_4$ -PANI/Lac/CHIT/CPE	1.092	0.4	126.0	0.5–80.0	Sadeghi vd., 2015
CHIT/Si-ZrO $_2$ /Lac	-	0.35	-	1.0–100.0	Qu vd., 2014
Lac/CNTs/CHIT	0.009	0.66	-	1.2–30.0	Liu vd., 2006
Lac/N-OMC/PVA/AuE	0.006	0.31	290.0	0.39–8.98	Guo vd., 2014
AuNP-MoS $_2$ -Lac/GCE	-	2.0	16.3	2.0–2000.0	Zhang vd., 2020a
SiO $_2$ nanoküreler	-	1.6	-	12.5–450.0	Zheng vd., 2018
PDA-Lac-/MGCE	-	0.69	25.0	1.0–9100.0	Li vd., 2014
Cu-OMC/CS	0.04	0.67	-	0.67–15.75	Xu vd., 2010
Lac/Au/MXene/GCE	-	0.05	50.0	0.05–0.15	Chandran vd., 2021
AuNPs/EGP	-	0.02 7	5.364	0.5–100.0	Fan vd., 2016
e-Lac/CB-SPE	-	2	-	2.5–50.0	Castrovilli vd., 2020
Lakkaz-Ag@Fe $_3$ O $_4$ /SPE	0.021	0.06	60.056	0.1–100.0	Bu çalışma

Amperometrik sinyalin cevap verme süresi, analizi yapılacak maddenin elektrot yüzeyine temas ettiği an ile cevabın dengeye geldiği an arasındaki süre olarak tanımlanır. Çok sayıda tekrarlanabilir deneyin yapılabilmesi için biyosensörün cevap süresinin oldukça kısa bir süre olması beklenir. Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörünün katekol tayini için amperometrik cevap süresinin ortalama olarak 30 s'den küçük olduğu bulunmuştur. Bulunan değerin, literatür araştırması sonucu yaygın bir değer olduğu gözlenmiştir (Wardak vd., 2020).

Tekrar kullanılabilirlik, biyosensörün birden fazla ölçümü gerektiren deneysel kurulum için aynı yanıtları üretme yeteneği olarak tanımlanır. İdeal bir biyosensör için elektrodun aynı koşullar altında arka arkaya yapılan ölçümlerde hemen hemen aynı sonuçları vermesi beklenmektedir. Yeniden üretilebilir sinyallerin, bir biyosensörün cevabı için yüksek güvenilirlik ve kararlılık sağlaması esastır (Bhalla vd., 2016). Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörünün tekrar kullanılabilirliğini göstermek için aynı elektrot ile 50 mM pH 5.5 ABS tamponu içerisinde 50 µM katekol ile tekrarlanan amperometrik sonuçlar Şekil 4.6A'da verilmiştir. Akım sinyalinin kademeli olarak düşmesiyle, lakkaz aktivitesinin ardışık 10 ölçüme kadar yaklaşık %92'si, 12 ölçüme kadar yaklaşık %86'sı korunmuştur. Akım sinyalindeki bu kademeli azalma, muhtemelen immobilize lakkaz ve elektrot yüzeyi arasındaki etkileşimin zayıflaması nedeniyle elektrottan sızan immobilize enzime ve kullanıma bağlı olarak yüzey deformasyonuna bağlanabilir. Ardışık olarak alınan 12 ölçüm sonucu hesaplanan bağıl standart sapma değeri ise %3.8 (n=12) olarak bulunmuştur.

Aynı şartlarda hazırlanan 5 özdeş elektrodun 50 µM katekol için verdiği amperometrik cevapların yüzde değerleri ise Şekil 4.6B'de gösterilmektedir ve bu sonuçlara göre standart sapma değeri %3.39 (n=5) olarak bulunmuştur. Zhang vd. (2020a) katekol tayini için hazırladıkları biyosensör çalışmasında, lakkazın immobilizasyonu için 2D MoS₂ ve altın nanopartiküller (AuNPs) ile nanokompozit hazırlamışlardır. Biyosensörlerin tekrarlanabilirliğini ve tekrar üretilebilirliğini araştırmak için tekrarlanan deneyler gerçekleştirmişler ve aynı AuNPs-MoS₂-Lac/GCE biyosensörünü, 1 mM katekol içeren tampon çözeltide arka arkaya 10 kez test etmişlerdir. Onuncu testin DPV tepe noktasının, başlangıç değerinden sadece %3 daha düşük olduğunu ve DPV'lerin tepe değerlerinin bağıl standart sapmasının %1.2 olduğunu bildirmişlerdir. Beş özdeş biyosensör hazırlayarak aynı

koşullar altında tekrar üretilebilirlik deneyleri gerçekleştirerek, DPV akımının tepe değerlerinin bağıl standart sapma değerini %0.7 olarak belirlemişlerdir.

Biyosensörün seçiciliği, çeşitli polifenolik bileşiklerin reaksiyon ortamına eklenmesiyle, amperometrik yöntem kullanılarak araştırılmıştır ve Şekil 4.7’de gösterildiği gibi 50 µM katekol ilavesinden sonra akımın belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir. Yüz µM askorbik asit (AA) %1.93; 100 µM ürik asit (UA) %3.86; 100 µM gallik asit (GA) %2.00; 100 µM pyrogallol %7.90; 100 µM guaiacol %5.75; 100 µM p-Cresol %5.50; 100 µM (-)-epikateşin %6.85 ve 100 µM 2-aminofenol %10.01 oranlarında girişim değerleri göstermiştir. Lakkazın geniş substrat yelpazesi düşünüldüğünde elde edilen sonuçlar, girişim yapan maddeler için ihmal edilebilir sinyaller elde edildiğini ve katekol için kararlı ve belirgin bir sinyalin oluştuğunu göstermiştir. En yüksek girişim etkisi olan 2-aminofenol için, gözlenen zayıf amperometrik yanıt, katekol için gözlenen akımdan daha düşüktür. Lakkazın mono-, di-, polifenoller ve aminofenollere karşı mükemmel elektrokatalitik aktivite gösterdiği iyi bilinmektedir (Rivera-Hoyos vd., 2013). Bununla birlikte, hazırlanan biyosensör aktivitesi katekol için, diğer polifenolik ve aminofenol bileşiklerinden daha elverişlidir. Katekole karşı bu yüksek duyarlılık ve daha az girişim etkisi, önerilen biyosensörün, gerçek su örnekleri gibi karmaşık matrislerde yüksek girişim etkisi olmaksızın, katekol tayini için iyi bir alternatif olabildiğini ortaya koymaktadır. Maleki vd. (2019) katekol tayini için tasarladıkları Lac/poli-Arg/AuNPs/GCE biyosensörünün seçiciliğini değerlendirmek üzere kateşin, fenol ve aminofenol gibi bazı fenol türevleri için (tüm fenoller için 0.10 M pH 6.00 PBS içinde 25.00 nM derişiminde) denemeler gerçekleştirmişler ve en yüksek girişimin aminofenol ile meydana geldiğini belirtmişlerdir (yaklaşık olarak %10).

Biyolojik dönüştürücünün aktivitesindeki azalma biyosensörün kullanım ömrünü belirleyen en önemli faktörlerdendir ve biyolojik dönüştürücü enzim olduğu olduğu için kullanım ömrünü belirleyen en önemli faktör dolayısıyla enzim aktivitesindeki azalmadır. Elektrotlar depo kararlılığı deneyleri süresinde kullanılmadıkları zaman +4°C’de saklanmıştır ve elektrotların 15. gün sonundaki kullanımının ardından, aktivitesinde %12.68’lik bir düşüş gözlemlenmiştir. Otuzuncu gün ve 60. gün sonunda ise aktivitede sırasıyla %16.64’lük ve %21.76’lık bir düşüş gözlenmiştir. Nispeten düşük olan bu aktivite kaybı, uygulanan immobilizasyon prosedürlerine bağlanabilir. Liu vd., (2020) ITO elektrot üzerinde 3D aloevera benzeri Au-ZnO nanokompozitleri *in situ* olarak sentezledikleri

çalışmada, lakkazı nanokompozite immobilize etmişlerdir ve elektrotların depo kararlılıklarını göstermek için 1 ay boyunca +4°C'de saklamışlardır. Elektrodun her 5 günde bir katekol tayini için kullanılabilirliğini test etmişler ve 30 günün sonunda biyosensörün başlangıç aktivitesinin yaklaşık %85'ini koruduğunu bildirmişlerdir.

5.1.5. Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE'lerin Göl Suyu ve Musluk Suyunda Katekol Tayini İçin Uygulanabilirliğinin Araştırılması

Tasarlanan biyosensörün seçici ve tekrarlanabilir analiz yeteneği, çevre örnekleri olarak değerlendirilen göl suyu ve musluk suyuna katekolün standart eklenmesi yöntemi ile değerlendirilmiştir. Çizelge 1'de verilen sonuçlarda da görüleceği üzere göl suyuna eklenen 1 µM katekol, spektrofotometrik yöntemle tayin edilemezken, Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörü ile %103.3 geri kazanım elde edilmiştir. Musluk suyunda ise ilave edilen 1 µM için anlamlı geri kazanım gözlenmemiş ancak hazırlanan biyosensör için geri kazanım oranı %105.0 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, Lakkaz-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörünün gerçek numunelerde düşük miktarlarda olsa dahi katekolün tayini için güvenilir olduğunu göstermiştir. Musluk suyuna ve göl suyuna eklenen 10 µM katekol için spektrofotometrik yöntem ile geri kazanım değerleri sırasıyla %86.0 ve %178.4 olarak hesaplanmıştır. Hazırlanan biyosensör ile musluk suyu ve göl suyuna eklenen 10 µM katekol için geri kazanım değerleri ise sırasıyla %101.40 ve %102.60 olarak hesaplanmıştır. Musluk suyu ve göl suyuna 100 µM katekol eklemesi ile elde edilen geri kazanım değerleri spektrofotometrik yöntem ile sırasıyla %151.96 ve %122.0 olarak hesaplanırken, hazırlanan biyosensör için bu değerler %102.20 ve %99.76 olarak bulunmuştur. Palanisamy vd. (2017) tasarladıkları lakkaz içeren grafen-selüloz mikrofiber modifiye perde baskılı elektrotlar ile tasarladıkları biyosensör için katekolün geri kazanımı çalışmalarını standart ekleme yöntemi ile gerçekleştirmişler ve geri kazanımların musluk suyunda %98.8 ve nehir suyunda %96.4 olduğunu belirtmişlerdir. Liu vd. (2019) sundukları çalışmada flor ve azot katkılı karbon dotlar (F,N-CD'ler) sentezlemişler ve katekol tayini için lakkaz temelli bir elektrokimyasal biyosensör tasarlamışlardır. Musluk suyuna 15 µM ve 45 µM eklediklerinde, tasarlanan Lac-F,N-CDs/GCE biyosensörü ile geri kazanım değerlerinin sırasıyla %108 ve %119 olduğunu belirtmişlerdir. Göl suyuna eklenen 15 µM

ve 30 μ M katekol derişimleri için geri kazanım değerlerinin sırasıyla %137 ve %125 olduğunu rapor etmişlerdir.

5.2. Ticari Serum ve Yapay İdrarda Dopamin Tayini için Lakkaz İmmobilize Ni/Au/PPy-COOH Nanoteller ile Modifiye Perde Baskılı Elektrotların Hazırlanması

Dopamin; davranış, hafıza ve hareket gibi çeşitli fizyolojik aktivitelerden sorumlu, merkezi ve periferel sinir sistemlerinde oldukça önemli bir nörotransmitterdir. Dopaminin insan vücudundaki normal derişimlerinden (idrarda ve beyin omurilik sıvısında 5 nM ve kanda 0.13 nM) büyük bir sapma huzursuz bacak sendromu, epilepsi, HIV enfeksiyonu, şizofreni, Parkinson, Huntington, Alzheimer, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (ADHD) gibi hastalıklara sebep olmaktadır (Li vd., 2016b). Bahsedilen hastalıkların tanısı ve tedavisi için basit, düşük maliyetli ve duyarlı yöntemlerin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Geleneksel analitik yöntemlerin yanı sıra, dopaminin biyolojik örneklerde tayini için elektrokimyasal biyosensörler, birçok avantaj sunmasından dolayı en doğru yaklaşımdır. Askorbik asit ve ürik asit gibi küçük moleküllerin kan, idrar ve ekstrasellüler sıvılarda beraber bulunması, dopaminin tayini sırasında yalnız elektrotlar üzerinde benzer potansiyellerde yüksek girişimlere sebep olmaktadır. Elektrotların modifikasyonu, elektrot yüzeyini dopamin biyomolekülünün elektroaktif katalizi için seçici hale getirmektedir (Siddeeg, 2020). Enzim elektrotları kullanılarak, substratın geri dönüşüm ilkesine dayanan farklı algılama teknikleri fizyolojik olarak önemli bileşiklerin saptanmasındaki uygulamalar için oldukça önemlidir. Lakkaz, orto- ve para-substitüe mono ve difenolik bileşiklerin ve aromatik aminlerin oksidasyonunu katalize eder. Bu nedenle de bir enzim elektrotu olarak çevre izlemede biyoteknolojik katalizör olarak (Krishnamoorthi vd., 2022) biyoyakıt hücrelerinde biyokatalizör olarak (Barrière vd., 2006) ve biyosensörlerde biyoreseptör olarak (Rubio-Govea vd., 2020) kullanılmaktadır. Literatür taraması dopamin tayini için biyosensörlerin tasarımının şüphesiz ne kadar önemli olduğunu kanıtlamaktadır.

5.2.1. Ni/Au/PPy-COOH Nanotellerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Aktivasyonu

Metalik nanoteller nanoteknolojide önemli yapı taşlarıdır. Silindirik şekle ve tek boyutlu anizotropik yapıya sahip, çapları küçük ve yüzey/hacim oranı büyük olan metalik veya yarı iletken 1 boyutlu nanoyapılardır. Nanotellerin büyük yüzey alanları biyosensör uygulamaları için hedef moleküllere yönelik elektrokataliz, büyük ölçekli elektron transferi, yüksek kararlılık ve pasivasyona karşı direnç gibi mükemmel avantajlar sağlamaktadır (Chan vd., 2015; García vd., 2014).

Kalıp yönelmeli elektrokimyasal biriktirme yöntemi ile polikarbonat membran içerisinde nikel ve altın metalleri ile polipirolü içeren nanoteller sentezlenmiştir ve birden fazla segmente sahip olan Ni/Au/PPy-COOH nanotellerin yapısındaki Ni ve Au, aktif algılama yüzey alanının geliştirmesi ve dolayısıyla biyosensörün algılama duyarlılığının artırılması amacıyla kullanılmıştır. Son segmentte kullanılan malzeme, -COOH gruplarına sahip olduğu için lakkazın nanotellere immobilizasyonunu mümkün kılmıştır. Bu karboksilik gruplar, standart bir EDC/NHS kimyası ile aktive edilmiş ve nanoteller ve enzim molekülleri arasında kovalent bağlar oluşturulmuştur.

Ni/Au/PPy-COOH nanotellerin morfolojik yapısı, şekli ve boyutu SEM tekniği ile incelenmiştir. Resim 4.6'dan da görüldüğü gibi nanoyapı tel şeklindedir, çapları yaklaşık 180 nm, uzunlukları 1400 μm ve yüzeyleri oldukça pürüzsüzdür. Resim 4.7'de verilen EDX görüntüsünde Ni ve Au metal segmentlerinin yanı sıra nanotellerin son segmentte yer alan PPy-COOH yapısındaki C ve O atomları da görülmektedir. Uygun vd. (2017) anodik alumina membran kullanarak kalıp yönelmeli elektrodepozisyon yoluyla sentezledikleri Au/Ni/Au/PPy nanotellerin SEM analizini gerçekleştirmişler ve nanotellerin toplam uzunluğunun yaklaşık 3 μm olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca Au ve Ni segmentlerinin oldukça pürüzsüz, polimerik segmentin oldukça gözenekli olduğunu bildirmişlerdir.

Nanotellere artan dış bir manyetik alan uygulandığında başlangıçta yerel manyetik alan şiddeti artmakta ancak artışın devamında vektörel olarak ters yönde manyetik alan şiddeti azalmaktadır (Resim 4.8). Dış manyetik alan artışı ile yerel manyetik alan şiddeti artarak sinüs eğrilerine benzer bir grafik göstermektedir. Bu spektrumda elde edilen H_r

değeri (manyetik alan rezonansı) kullanılarak g faktörü 4.93 olarak hesaplanmıştır. Hashem vd. (2016) termal arıtma yöntemi ile farklı sıcaklıklarda sentezledikleri NiO nanopartiküller için artan g değerini, artan manyetizasyona atfetmişlerdir.

5.2.2. Perde Baskılı Elektrotların Modifikasyonu ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Resim 4.9A'da yalın SPE'lere, Ni/Au/PPy-COOH/NAF ile modifiye edilmiş SPE'lere ve Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF ile modifiye edilmiş SPE'lere ait $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ dönüşümü için iyi tanımlanmış CV pik zirveleri görülmektedir. Yalın SPE ile karşılaştırıldığında, Ni/Au/PPy-COOH nanoteller ile modifiye elektrotların tüm redoks piklerinin artması, nanotel yapısındaki metallerin elektrot yüzey alanını önemli ölçüde geliştirdiği şeklinde yorumlanabilir. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'ye ait akım piklerindeki düşüş, yapıda lakkazın varlığı ve dolayısıyla enzim molekülünün yalıtkan yapısı nedeniyle $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ dönüşümü için elektron transferini engellediği şeklinde yorumlanır. Yalın SPE'lerin ve Ni/Au/PPy-COOH/NAF ile modifiye edilmiş SPE'lerin elektron transfer dirençleri (R_{ct}) sırasıyla 2543 Ω ve 750 Ω olarak bulunmuştur. Modifikasyon sonrası R_{ct} değerindeki bu önemli azalma, redoks türleri arasındaki elektron transfer verimliliğinin artmasının bir sonucunun olduğu düşünülmektedir. Nanoteller ile modifiye edilmiş elektrotlarla karşılaştırıldığında, lakkazın mevcut olduğu SPE'lerde yarım daire çapı artmakta olup, 10657 Ω R_{ct} değeri göstermektedir. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'nin R_{ct} değerindeki bu artış, düşük frekanslarda zayıf iletkenliği olan ve elektron transferini engelleyen enzimler dahil çoğu biyolojik moleküle atfedilmektedir (Chawla vd., 2012b). Wang vd. (2014) dopaminin tayini için fitik asit (PA) ile fonksiyonelleştirilmiş silika nanopartiküllere (SiO_2 NP) dayalı lakkaz biyosensörü geliştirmişler ve modifikasyon işlemi sırasında elektrot yüzeyinin yük transfer özelliklerini karakterize etmek için EIS tekniğini kullanmışlardır. SiO_2 -PA NP'ler ile modifiye edilmiş GCE'nin empedans spektrumlarını, 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ve 0.1 M KCl içeren 50 mM pH 7.4 tampon çözeltisinde incelemişlerdir. Yalın GCE'nin yarım daire alanının oldukça küçük olduğunu ve GCE'nin R_{ct} değerinin 104 Ω olduğunu bildirmişlerdir. SiO_2 -PA/GCE ve SiO_2 /GCE için yük transfer direnci değerlerini sırasıyla 126 ve 2591 Ω olarak bildirilmiştir.

Lakkaz/SiO₂-PA/GCE ve Lakkaz/SiO₂/GCE'nin elektron transfer direnci değerlerinin sırasıyla SiO₂-PA/GCE ve SiO₂/GCE'den çok daha büyük olduğunu bildiren araştırmacılar, bu sonuçlara göre elektrotların lakkaz ile başarıyla modifiye edildiğini göstermişlerdir.

Elektrokatalitik özellikleri karşılaştırılan yalın SPE, Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE ve Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lere ait CV ölçümlerinde, 10 µM dopamin için tüm elektrotlarla bir çift iyi tanımlanmış redoks tepe noktası gözlenmiştir. Ancak Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'nin voltametrik özelliği önemli ölçüde farklıdır (Resim 4.10A). Çünkü Ag/AgCl'ye karşı -0.178 V civarında gözlenen katodik tepe akımı diğer elektrotlara göre oldukça yüksektir ve daha iyi tanımlanmıştır. Bunun sebebi, Resim 4.11B'de görüldüğü gibi dopaminin yükseltgenmesi ve negatif potansiyelde elektrot yüzeyinde yeniden indirgenmesinde lakkazın elektroaktif katalitik etkinliğidir. Thamilselvan vd. (2019) soy metallerin, düşük maliyetle hazırlanabilen, duyarlı, seçici, üstün performanslı ve taşınabilir elektrokimyasal sensörlerin geliştirilmesi için önemini vurguladıkları çalışmalarında, manyetik Fe₃O₄ nanopartikülleri ile dekore edilmiş altın (Au) nanopartikülleri (NP'ler) duyarlı dopamin sensörünün tasarımı için kullanmışlardır. Yalın GCE ve Au@Fe₃O₄/GC elektrotlarının elektrokatalitik performansını araştırmak için CV tekniğini kullanmışlardır. 100 µM dopamin içeren 0.1 M pH 7.9 PBS tamponu çözeltisinde GCE ve Au@Fe₃O₄/GCE'nun CV akım yanıtlarını karşılaştırdıklarında Au@Fe₃O₄/GC elektrodunda, dopaminin yükseltgenme ve indirgenme tepe akımlarının güçlü bir şekilde arttığını gözlemlemişlerdir. Ancak araştırmacılar, yalnızca nanomalzeme temelli sensörler için, insan kan serumunda 0.001–1.0 µM dopamin seviyelerini tayin etme ve seçicilik zorluğundan bahsetmişlerdir. Özellikle diğer katekolaminlerin girişiminden kaçınmak için biyolojik reaksiyonların seçiciliğinden faydalanmak bu hususta zorunludur (Ferapontova, 2017).

5.2.3. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin Optimizasyonu

Elektrot üzerindeki doğrudan oksidatif tayin nispeten yüksek oksidasyon potansiyeline ihtiyaç duymaktadır (0.5–0.7 V). Yüksek potansiyeller, biyolojik sistemlerde birçok girişim yapan bileşiğin benzer potansiyellerde oksitlenebilmesine ve böylece voltametrik sinyallerin

örtüşmesine neden olabilir. Bu nedenle, dopaminin seçici tayininin yüksek duyarlık ve düşük tayin sınırı ile belirlenmesi için çalışma potansiyelinin seçimi oldukça önemlidir. Bu amaçla, -0.2 ve -0.1 V aralığında amperometrik ölçümler alınmıştır. Şekil 4.9'da görüldüğü gibi en yüksek amperometrik cevabın elde edildiği -0.2 V çalışma potansiyeli olarak belirlenmiştir. Enzimatik ürünlerin katalitik indirgenmesine dayanan lakkaz temelli amperometrik biyosensörlerin performansı, elektrokimyasal ölçümler için -0.2 V ile 0 V (Ag/AgCl'ye karşı) potansiyel aralığında optimumdur. Bu potansiyel aralığında düşük gürültü ve arka plan akımı vardır ve bu da düşük analit derişimlerinin saptanmasını sağlar. Girişim yapan elektroaktif türlerin yükseltgenme riski, bu potansiyel aralık içinde büyük ölçüde azalır (Ferry ve Leech, 2005). Dopamin, okside lakkaz tarafından dopamin-o-kinona yükseltgenir ve düşük potansiyelerde, dopamin-o-kinonun elektrokimyasal indirgenmesi ile gerçekleşen biyoelektrokatalitik reaksiyon ayrıca, yüksek duyarlık ve elektrodun daha fazla kullanılabilirliği gibi avantajlar sunmaktadır (Njagi vd., 2008). Ferry ve Leech (2005) dopamin, epinefrin ve nöroepinefrinin amperometrik tayini için camsı karbon elektrot üzerine lakkaz ve bir osmiyum redoks polimerinin ko-immobilizasyonuna dayanan biyosensör geliştirmişlerdir. İmmobilize lakkaz tarafından dopaminin yükseltgenmesi ve elektrokatalitik substrat rejenerasyonu çalışmalarını -0.2 V'da gerçekleştiren araştırmacılar bu potansiyelde askorbik asit varlığında biyosensörün dopamin için seçiciliğinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Çok duyarlı elektrotların üretimi, genel olarak mikro ölçekteki elektrot ara yüzey davranışının tam olarak anlaşılmasını gerektirir. Elektrot bileşenleri, biyosensörün duyarlılığını, seçiciliğini, tekrarlanabilirliğini, uzun vadeli kararlılığını ve biyolojik ortamlarda kirlenmeye karşı direncini geliştirmek için dikkatle seçilmelidir. Nispeten kolay hazırlama ve modifikasyonlar nedeniyle mikroelektrot üretimi için çeşitli materyaller kullanılmaktadır. Ancak *in vitro* veya *in vivo* dopamin tayini için biyomalzemelerin biyoyumluluğu da oldukça önemlidir. Nanotellerin elektron transfer özellikleri ve benzersiz tek boyutlu destek materyali özellikleri elektrokimya uygulamaları için oldukça önemlidir. Tel çapı, telin yüzeyi, kalitesi ve kimyasal bileşimi nanotellerin elektron taşıma mekanizmasını etkileyen önemli parametrelerdir (Yogeswaran ve Chen, 2008). Sentezlenen Ni/Au/PPy-COOH nanoteller, lakkaz için destek materyali olarak avantaj sunmasının yanısıra, düşük maliyet ile tek bir nanotel yapısında birden fazla materyalin segment olarak kullanılmasını mümkün kılmıştır. Nanomalzemelerin biyolojideki öneminden dolayı, nanotel miktarının amperometrik yanıtı etkisi incelenmiş ve bu amaçla, enzim miktarı sabit

tutularak, farklı tel derişimleri ile modifiye edilen elektrotlarla amperometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.10'da gösterildiği gibi artan nanotel derişimi ile akım yanıtlarında artış meydana gelmiş ancak, 0.16 mg/mL nanotel derişiminde maksimum pik noktasına ulaştıktan sonra akımlarda düşüş gözlemlenmiştir. Bu düşüşün, yoğun nanotel miktarının enzim ile substrat arasında bir difüzyon bariyeri oluşturmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Rubio-Govea vd. (2020) optimum MoS₂-R ve MoS₂-F derişimlerini belirlemek için kağıt karbon elektrodunun modifikasyonunu 6 farklı nanomalzeme derişimi (0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/mL) ile sağlamışlardır. 0.1, 0.25 ve 0.5 mg/mL derişimlerindeki nanomalzemelerle modifiye elektrotların, artan dopamin derişimlerine rağmen sinyallerde bir artışa sebep olmadığını bildirmişlerdir. Diğer derişimler için *Trametes versicolor* lakkazının artan dopamin derişimlerine karşı Michael-Menten davranışı gösterdiğini rapor etmişler ve artan sinyaller ile K_m değerindeki azalmanın nanomalzemelerin kullanımıyla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. MoS₂'ün farklı morfolojileri için test edilen optimum derişimlerini analiz ederken, bu morfolojilerin elektrotların performansı üzerinde de büyük bir etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Elektrotlar 2 mg/mL MoS₂-R ile modifiye edildiğinde nanomalzemenin elektrot yüzeyi boyunca iyi bir şekilde dağıldığını ve SEM analizlerinin MoS₂ şeritleri arasında görünür boşluklar olmadığını belirtmişlerdir. Nanoşeritlerin morfolojisi nedeniyle, nanoşerit derişimi arttıkça elektrot yüzeyinde düzenli bir şekilde yığılma eğilimi gösterdiklerini rapor etmişlerdir.

Biyoreseptör olarak enzimleri içeren biyosensör uygulamalarında pH, biyosensörün optimum çalışma koşullarını belirlemek için önemlidir. Tampon çözeltinin amperometrik yanıt etkisini incelemek için elektrotların, her bir tampon çözelti içerisinde 10 µM dopamin için akım değerleri kaydedilmiştir. 50 mM pH 4.5, 5.0, 5.5 ABS tamponu, 50 mM 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 PBS ve 8.0 karbonat tamponu ile gerçekleştirilen deneylerde genel olarak, akım değerinin artan pH değeri ile arttığı ve ardından tepe noktası olan 6.5'dan sonra azaldığı gözlemlenmiştir. Şekil 4.11'de de gösterildiği gibi, pH 6.5 fosfat tamponu lakkaz temelli elektrotların dopamin için maksimum akımın ölçüldüğü pH'dır. Bu pH değerinde, dopamin pozitif yüklüken (pKa 8.87), askorbik asit (pKa 4.10) ve ürik asit (pKa 5.75) negatif yüklüdür. Dolayısıyla anyonik bir membran olan Nafion™, eksi yüklü girişim yapan bu türleri iterek elektrot yüzeyine ulaşmalarını engeller. Ayrıca elektrot yüzeyine kaplanan Nafion™ polimerik membranın elektrokimyasal cihazlarda kullanılmasının birçok avantajı vardır. Fizyolojik pH'da girişim yapan maddelerin etkisini en aza indirmede çok etkili

olduğu ve böylece katekolaminlerin (pKa: 8.4–8.9) tayininde seçiciliği arttırdığı kanıtlanmıştır. Ayrıca elektrot pasivasyonunu önlemek ve *in vivo* veya *in vitro* deneyler sırasında yüzey biyouyumluluğunu arttırmak için kullanılmaktadır (Nagy vd., 1985; Xiang vd., 2007; Njagi vd., 2010). Literatür taraması sonucu, dopamin için lakkaz biyosensörlerinin optimum pH çalışma aralığının ise pH 4.5–7.5 arasında olduğu bildirilmiştir (Ferry ve Leech, 2005; Li vd., 2012; Cesarino vd., 2013; Wang vd., 2014; Hua vd., 2015). Silva ve Vieira (2016) poli(allilamin hidroklorür) içinde stabilize edilmiş altın nanopartikülleri (AuNP-PAH), *Aspergillus oryzae* kaynaklı lakkazın immobilizasyonu için bir destek olarak kullanmışlar ve kare dalga voltametri tepe potansiyellerinin pH'a bağımlı olduğunu göstermişlerdir. Sonuçlara göre, dopamin için en yüksek tepe akımı pH 6.0 PBS tamponu ile elde edilmiş ve ek olarak dopaminin indirgeme tepe potansiyelinin (E_{pc}), artan pH ile negatif yöne kaydığını göstererek, protonların dopamin indirgeme sürecine doğrudan dahil olduğunu rapor etmişlerdir.

5.2.4. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin Kinetik ve Analitik Performansları

Enzim elektrotları, substratlarının biyolojik olarak tanınmasındaki özgülükleri sayesinde biyoelektrokatalitik sinyal amplifikasyonu sağlarlar. Tipik olarak, dopaminin immobilize biyoreseptörün aktif bölgelerine bağlanma kinetiği ve çalışma elektrodunun yüzeyine kütle aktarım hızı, biyosensörün akım-potansiyel davranışını önemli ölçüde etkiler. Çeşitli elektrokimyasal tekniklerin arasında, DPV veya amperometri yüksek duyarlıkları nedeniyle insan serumu veya idrar örneklerinde dopamin seviyelerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Zhao vd., 2019; Shen vd., 2020; Fu vd., 2021). Enzim modifiye çalışma elektrodu ile referans elektrot arasına bir indirgenme potansiyelinin uygulandığı amperometri temelli dopamin tayini oldukça spesifik bir yöntemdir. Diğer yandan, amperometri temelli enzimsiz platformlarda uygulanan potansiyel, girişim yapan elektroaktif biyomoleküller için bir faradaik akım yanıtı yarattığından dopamin için seçici sayılmazlar. Oksidoredüktaz enzimi ve amperometrik elektrotların kombinasyonu oldukça sık çalışılan enzimatik elektrot kavramıdır ve bu sayede enzimatik reaksiyonların çeşitli stratejileri kolaylıkla izlenebilirken, elektrokimyasal yollarla da duyarlı bir şekilde ölçüm mümkündür. Bu bağlamda lakkazın diğer enzimlere göre ek

kofaktörler olmadan elektron transfer reaksiyonlarını katalizleme yeteneği, moleküler oksijen varlığında fenoller ve o-, m-, p-benzendioller oksitleme yeteneği ve yüksek stabilitesi lakkaz biyoalgılama uygulamaları için güçlü ve popüler bir aday yapmaktadır (Yashas vd., 2018). Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF perde baskılı elektrotlar, dopaminin dopamin-o-kinona yükseltgenmesi ve oluşan ürünün elektrot yüzeyinde -0.2 V'da yeniden indirgenmesi ile tayinini mümkün kılmaktadır. Elde edilen akım cevabı, analit derişimi ile doğru orantılıdır. Ayrıca, hedef molekülün elektrot yüzeyinde indirgenme yoluyla yeniden üretilmesi, elektrokimyasal amplifikasyonun artmasıyla beraber duyarlılığı da artırmaktadır (Cosnier ve Popescu, 1996; Cosnier vd., 1999).

Biyosensörler geniş bir çalışma aralığında analit derişimlerinin ölçülmesini sağlamalıdır. Yapay idrar ve ticari insan serumunda dopamin tayinine yönelik geliştirilen lakkaz temelli Ni/Au/PPy-COOH nanoteller ile modifiye biyoelektrotların analitik ve katalitik karakterizasyonu, dopamin için bir kalibrasyon grafiğinin hazırlanması ile yapılmıştır. Şekil 4.12'de verilen grafik, doğrusal bir aralık olarak 0.01–50 µM dopamin derişimi aralığına ait amperometrik yanıtları göstermektedir ($y=0.1108x+0.1258$ ve $R^2=0.9961$). İnsan serumu ve idrarındaki normal dopamin derişim değerleri düşünüldüğünde ve literatür ile karşılaştırıldığında bu doğrusal aralık, oldukça geniş bir aralığı ifade eder. Ölçülebilen en küçük derişim sınırı (LOD), sinyal gürültü oranı 3 olarak alınarak ($S/N=3$) 2.265 nM olarak belirlenmiştir. Ek olarak, biyosensör için ölçüm sınırı (LOQ) 7.551 nM olarak belirlenmiştir. Li vd., (2016b) çalışmalarında 21.8 U/mg aktiviteye sahip lakkaz enzimi ile tasarladıkları biyosensör için LOD değerini 0.42 µM olarak hesaplamışlardır. Bu çalışmada dopamin tayini için tasarlanan biyosensörün duyarlılığı, $0.902 \mu A \mu M^{-1} cm^{-2}$ olarak hesaplanmıştır.

Biyosensör cevabının fonksiyonu, tayin sınırı ve duyarlılığı gibi analitik performansını ve girişim yapan maddelerin etkisini anlamak için enzimin kinetik parametrelerini (K_m ve V_{max}) belirlemek oldukça önemlidir. Michaelis-Menten sabiti K_m , hem enzimatif afinitenin hem de enzim-substrat kinetik sabitlerinin bir göstergesidir (Kamin ve Wilson, 1980) ve maksimum hızın yarısına ulaşıldığındaki substrat derişimi olarak tanımlanırken, V_{max} enzimatif biyosensörün maksimum hızını ifade eder. Enzimatif biyosensörün performansı hakkında bilgi veren kinetik parametreler, Lineweaver-Burk grafiğinden ve eşitliğinden (Şekil 4.13 ve Eşitlik 9) hesaplanmıştır. K_m , bir enzimin substratına karşı afinitesini belirttiği için daha küçük bir K_m değeri, daha etkili substrat bağlanmasını ve daha yüksek

katalitik aktiviteyi gösterir. Bu çalışmada K_m^{app} ve I_{max} değerleri sırasıyla 2.056 μM ve 1.03 μA olarak bulunmuştur.

Ayrıca, bu tezde hazırlanan Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE biyosensörünün analitik özellikleri, Çizelge 5'de ve Çizelge 6'da gösterildiği gibi sırasıyla 1D nanomalzeme temelli sensörlerle ve diğer lakkaz temelli biyosensörlerle karşılaştırılmıştır. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE biyosensörü, katalitik aktivite, tayin sınırı, duyarlık ve doğrusal aralık açısından iyi bir performans göstermiştir. Genel olarak bu çalışmanın sonuçları birden fazla segmente ve manyetik özelliğe sahip nanotellerin, enzimler için iyi korunmuş aktivite ve işlevsellik ile birlikte etkili bir immobilizasyon desteği olarak davrandığını göstermektedir.

Çizelge 5. Dopamin tayini için tasarlanan çeşitli 1D nanomalzeme temelli biyosensörlerin karşılaştırılması.

Elektrot	Yöntem	LOD (μM)	Duyarlık	Doğrusal Aralık (μM)	Kaynak
CuO nanotel/GCE	DPV	0.1	2.787×10^3 $\mu A \mu M^{-1} cm^{-2}$	0.1–105.0	Sundar vd., 2018
AgNW-rGO/SPCE	CV ve LSV	0.26	1487.1 $\mu A \mu M^{-1} cm^{-2}$	40.0–450.0	Li vd., 2015
MWCNT/CeO ₂ -PEDOT	DPV	0.03	3.669 ve 0.208 $\mu A \mu M^{-1}$	0.1–10.0 40.0–400.0	Üge vd., 2018
MWCNT/ITO	DPV	0.005	-	0.025–10.0	Zhang vd., 2020b
Ag/CuO Nanobelts/ITO	CV	0.007	14.0 $\mu A \mu M^{-1} cm^{-2}$	0.04–10.0	Li vd., 2021
CoP-NWAs/TM	DPV ve AMP.	0.356	3366.0 $\mu A \mu M^{-1} cm^{-2}$	1.0–3000.0	Wei vd., 2021
SnS ₂ /GR- β -CD/GCE	DPV	0.004	2.49.0 $\mu A \mu M^{-1} cm^{-2}$	0.01–150.76	Balu vd., 2020
Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH-NAF-SPE (<i>Trametes versicolor</i>)	AMP.	0.002	0.902 $\mu A \mu M^{-1} cm^{-2}$	0.01–50	Bu çalışma

Çizelge 6. Dopamin tayini için tasarlanan çeşitli lakkaz temelli biyosensörlerin karşılaştırılması.

Elektrot	K_m (μM)	LOD (μM)	Duyarlık	Doğrusal Aralık (μM)	Kaynak
Lac/Si/MWCNTs/SPE (<i>Trametes versicolor</i>)	3.78	0.42	2.787×10^3 $\mu A m M^{-1} cm^{-2}$	1.3–85.5	Li vd., 2012
SPE/rGO-CDBA-LAC (<i>Agaricus bisporus</i>)	-	0.03	1487.1 $\mu A m M^{-1} cm^{-1}$	0.1–70.0	Hua vd., 2015
Au-MPA-LAC (<i>Agaricus bisporus</i>)	-	0.029	-	0.5–13.0 47.0–430.0	Shervedani ve Amini, 2012
Au-PAH-LAC/CPE (<i>A.r. oryzae</i>)	-	0.26	-	0.49–23.0	Silva ve Viera, 2016
GCE-Os(PVI) ₁₀ -LAC (<i>Trametes versicolor</i>)	-	0.004	0.026 A/M	10.0–98.0	Ferry ve Leech, 2005
LAC/(h-SiO ₂ -PA)/GCE (Kaynak belirtilmemiş)	-	0.17	-	0.99–138.40	Zhao vd., 2014
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @vmSiO ₂ - LAC/GCE (Kaynak belirtilmemiş)	-	0.177	-	1.5–75	Li vd., 2018
CP/MoS ₂ -R/Naf:TBAB- Lac (<i>P. sanguineus</i>)	130	0.01	340.3 nA μM^{-1}	0.1–0.5 1.0–5.0	Rubio- Govea vd., 2020
LAC-SiO ₂ -PA/GCE (<i>Trametes versicolor</i>)	-	0.26	0.00157 $\mu A \mu M^{-1}$	0.99–103.10	Wang vd., 2014
GCE/rGO/LAC (<i>Trametes versicolor</i>)	-	0.091	-	0.1–3.0	Kohori vd., 2018
Lac/MWNT-GC (<i>Trametes versicolor</i>)	-	0.4	-	0.1–30.0	Xiang vd., 2007
Lac-EPS-MWCNT/GC (<i>B. rhodina</i>)	-	0.127	-	2.99–38.5	Coelho vd., 2019
Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH- NAF-SPE (<i>Trametes versicolor</i>)	2.056	0.002	0.902 $\mu A \mu M^{-1} cm^{-2}$	0.01–50	Bu çalışma

Biyosensörün yeniden kullanılabilirliğini de etkileyen cevap süresini ölçmek için, $i-t$ grafiklerinden yararlanılmıştır. Çözeltiye yapılan her dopamin ilavesinden sonra her bir elektrodun kararlı hal akımına ulaşılması için gerekli süre ölçülmüş ve cevap süresinin ortalama olarak 20 saniyeden küçük olduğu bulunmuştur. Bulunan değer, literatür araştırması sonucu yaygın bir değer olduğu görülmüştür (Wardak vd., 2020).

Enzimlerin elektrotlar üzerindeki immobilizasyonu, katalitik etkinliği artırmakla beraber depolama ve çalışma stabilitesini de artırmaktadır. İmmobilizasyon ayrıca enzimin geri kazanımına ve immobilize edildiği sistemin yeniden kullanılabilirliğine de izin verir (Rodriguez-Delgado vd., 2015). Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF biyosensörünün tekrar kullanılabilirliğini göstermek için aynı elektrot ile 10 μ M dopamin varlığında amperometrik ölçümler tekrarlanmıştır. Şekil 4.14A'da gösterildiği gibi, akım sinyalinin kademeli olarak düşmesiyle, lakkaz aktivitesinin ardışık 5 ölçüm sonunda %95.65'i, 10 ölçüm sonunda yaklaşık %78.69'u, 15 ölçüm sonunda yaklaşık %70.76'sı korunmuştur. Bu sonuçlara göre bağıl standart sapma değeri %8.32 (n=15) olarak bulunmuştur. Akım sinyalindeki bu kademeli azalma, muhtemelen lakkaz ve elektrot yüzeyi arasındaki etkileşimin zayıflaması nedeniyle elektrottan sızan enzime ve kullanıma bağlı olarak yüzey deformasyonuna bağlanabilir. Silva ve Vieira (2016) Au-NP-PAH-Lakkaz biyosensörünün dopamin için yeniden kullanılabilirliğini gün içi ve günler arası olarak araştırmışlar ve optimize koşullar altında bağıl standart sapma değerlerini sırasıyla %4.95 (n=10) ve %4.82 (n=10) olarak belirlemişlerdir. Aynı şartlarda hazırlanan 5 özdeş elektrodun 10 μ M dopamin için verdiği amperometrik cevapların yüzde değerleri ise Şekil 4.14B'de gösterilmektedir ve bu sonuçlara göre bağıl standart sapma değeri %4.5 (n=5) olarak bulunmuştur. Wang vd. (2014) SiO₂-fitik asit-Lakkaz temelli biyosensörün dopamin için yeniden üretilebilirliğini göstermek için 5 özdeş elektrot hazırlamışlar ve bağıl standart sapma değerini %3.5 (n=5) olarak belirlemişlerdir.

Biyolojik sistemlerde birçok girişim yapan bileşiğin bir arada bulunması, dopaminin doğrudan elektrokimyasal tayinini sınırlayan önemli bir problemidir. Bu bileşikler arasında askorbik asit (AA) ve ürik asit (UA) özellikle önemlidir çünkü bu moleküller benzer potansiyelerde yükseltgenebilir ve amperometik yanıtın çakışmasına neden olabilir (Huffman ve Venton, 2008). Dopaminin seçici tayini için yüksek duyarlık ve düşük tayin sınırı önemli olduğu kadar seçiciliğin de güçlü bir elektrokimyasal parametre olduğu unutulmamalıdır. Bu nedenle, Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE temelli biyosensörün

dopamin tayini için seçiciliğini göstermek üzere 50 mM pH 6.5 ABS tampon çözeltisi içerisinde 1.0 μ M dopaminin amperometrik cevabı, diğer analitlerin varlığında incelenmiştir (Şekil 4.15). Reaksiyon ortamına dopamin eklendiğinde önemli ölçüde akım azalması gözlenirken, 0.05 mM askorbik asit için %2.25, 0.5 mM ürik asit için %3.63, 0.25 mM L-Sistein için %6.56, 1.5 μ M serotonin için %8.98 ve 5.5 mM glukoz eklendiğinde %8.81 girişim etkisi gözlenmiştir. Tüm bileşikler için miktarlar sağlıklı bir insanın kanındaki normal değerler referans alınarak hazırlanmıştır. Seçicilik çalışmaları, reaksiyon ortamına eklenen bu maddelerin biyosensörün performansına önemli ölçüde müdahale etmediğini göstermiştir (en yüksek sinyal değişimi <%10). Literatürde benzer sonuçlar bildirilmiş ve bu sonuçlar lakkaz modifiye elektrotlar için uygulanan potansiyelin ürik asit ve askorbik asit için redoks potansiyelinin altında olması ve glukozun ve L-sisteinin lakkazın substratı olmaması ile açıklanmıştır (Rubio-Govea vd., 2020). Bu nedenle, lakkaz temelli bu biyosensör, analitik yanıtta önemli bir müdahale olmaksızın, potansiyel olarak girişim oluşturan bu bileşiklerin varlığında dopaminin belirlenmesi için kullanılabilmiştir. Soldatkin vd. (2021) dopamin tayini için lakkaz temelli kondüktometrik biyosensörün seçicilik çalışmalarını 5 mM derişiminde glutamat, sistein, tirozin, glukoz, ürik ve askorbik asit gibi girişim etkisi olabilecek bileşiklerin varlığında gerçekleştirmişlerdir. Ancak yapılan denemeler sonucu askorbik asidin %80.23 girişim etkisi gösterdiğini bildirmişler ve askorbik asidin yanıtının bu kadar yüksek olmasını, lakkazın dopamine duyarlı olduğu kadar askorbik aside de duyarlı olduğu şeklinde yorumlamışlardır. Buna göre araştırmacılar tarafından önerilen biyosensör, askorbik asit içermeyen farmasötik numuneleri analiz etmek için kullanılabilir. Biyolojik sıvıların analizi için bu biyosensörün kullanımına ek olarak, yalnızca askorbik aside duyarlı olan askorbat oksidaz temelli ek bir biyosensör kullanılarak bu sorunun çözülebileceğini ifade etmişlerdir.

Depo kararlılığı, bir biyosensörün kullanım süresi hakkında bilgi verir ve bir biyosensörün tekrar kullanılabilirlikle beraber kullanım süresinin uzun olması maliyet açısından önemli avantajlar sağlar. Elektrotlar, depo kararlılıklarını belirlemek için kullanılmadıkları zaman +4°C'de saklanmıştır. On beşinci gün sonunda enzim elektrotları için yalnızca %9.98'lik bir aktivite düşüşü görülmüştür. 60. günün sonunda elektrotların biyokatalitik aktivitesinde %40.10 aktivite kaybı görülmüştür (Şekil 4.16). Aktivitedeki zamana bağlı bu kademeli azalma enzimin saflık düzeyi, kaynağı ve immobilizasyon yönteminden dahi etkilenebilmektedir. Li vd., (2016b) palladyum nanopartiküller ve bakteriyel selüloz ile hibrid nanofiberler hazırlamışlar ve hazırlanan nanofiberleri, lakkaz ve

Nafion™ ile karıştırarak camı karbon elektrotları modifiye etmişlerdir. Depo kararlılığını göstermek için GCE/Lac-PdBC-NAF Nafion™ biyosensörü +4°C'de 30 gün saklanmıştır. Otuzuncu gün sonunda akım cevabının, başlangıç değerinin %93.2'sini koruyabildiğini belirtmişlerdir.

5.2.5. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin Ticari Serum ve Yapay İdrarda Dopamin Tayini İçin Uygulanabilirliğinin Araştırılması

Çizelge 2, Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF ile modifiye elektrotların ticari insan serumu ve yapay idrarda uygulanabilirliğini özetlemektedir. Önerilen biyosensörün numunelerde uygulanabilirliğini incelemek için, ticari serum ve yapay idrar numunelerinde farklı dopamin derişimlerinin varlığında amperometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir. Tüm durumlarda %100'e yakın geri kazanım değerleri elde edilmiş ve gerçek örneklerde dopaminin seçici ve duyarlı bir şekilde belirlenmesi için Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE'lerin uygulanabilme yeteneği gösterilmiştir. Ticari insan serumunda 0.01 µM, 0.1 µM ve 1.0 µM dopamin derişimleri için Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE biyosensörünün yüzde kazanım değerleri sırasıyla %107.50; %103.03 ve %100.33 olarak hesaplanmıştır. Yapay idrar örneklerine 0.01 µM, 0.1 µM ve 1.0 µM dopamin derişimleri için Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE biyosensörünün yüzde kazanım değerleri sırasıyla %103.70; %98.48; %99.12 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre, önerilen bu yeni lakkaz temelli elektrokimyasal biyosensörün kullanımı, insan serumu ve idrar örneklerinde normal dopamin derişimindeki değişimlerin belirlenmesi için iyi performansa ve hızlı bir yöntem olma avantajına sahip güçlü bir araç olabilir.

Kromatografik teknikler, idrarda dopamin tayini için iyi geliştirilmiş ve doğru teknikler olmasına rağmen devamlı *in situ* analize uygun değillerdir ve genellikle çeşitli ek örnek hazırlama prosedürlerini gerektirmektedirler. Ayrıca her analizden sonra atık olacak organik çözenlerin de kullanılması, kromatografik teknikleri daha az sürdürülebilir, pahalı ve karmaşık hale getirir (Cesarino vd., 2013). Bu çalışmada tasarlanan biyosensör, uygun maliyet, yüksek duyarlık, kolay hazırlanabilme, minyatürleşme potansiyeli, hasta başı tanı ve hastalık takibi açısından avantajlar sunmaktadır. Cesarino vd (2013) platin (Pt) elektrot

yüzeyinde çok duvarlı karbon nanotüplerin (MWCNT), polipirolün (PPy) ve lakkazın (Lac) basit elektrokodpozisyonu ile yeni bir biyosensör geliştirmişlerdir ve hazırlanan idrar örneklerinde dopaminin tayini için DPV tekniğini kullanmışlardır. 1.0, 1.5 ve 2.0 mM dopamin miktarları için idrar örneklerinden %96.9 ve %102.4 arasında dopamin geri kazanımı hesaplamışlardır. Kohori vd. (2018) grafen oksit-lakkaz veya indirgenmiş grafit oksit-lakkaz kombinasyonuna dayalı biyosensörleri değerlendirdikleri çalışmada, idrar ve serum numunelerinde dopamin tayini gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar 0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 µM derişimlerinde dopamin eklenen sentetik idrar numunelerinde %98.7 ila %103.9 arasında dopamin geri kazanımını ve 0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 µM dopamin eklenen sentetik serum numuneleri için %97.2 ile %104.5 arasında geri kazanım elde ettiklerini bildirmişlerdir.

5.3. Şarapta ve Meyve Suyunda (-)-Epikateşin Tayini için Lakkaz Temelli GO/TiS₂ Nanokompozitlerle Modifiye Perde Baskılı Elektrotların Hazırlanması

Günümüzde gıda numunelerinin kantitatif analizi, gıda ürünlerindeki kalitenin ortaya konmasındaki genel çaba nedeniyle gıda kimyası alanında büyük önem kazanmıştır. Polifenoller şaraba, zeytinyağına, çaya ve diğer meyvelere koku ve tat veren organoleptik özellikleri açısından önemlidir. Polifenoller kanser, felç, kalp hastalığı ve diyabet riskinin azalmasıyla ilişkilendirilen antioksidan özellikleriyle iyi bilinir ve bu sebeple gıda kalitesinde de önemli rol oynarlar (Di Fusco vd., 2010). Şarap, çay yaprakları ve meyve suları genellikle tanenler olarak adlandırılan ve tek başına belirlenemeyen çeşitli fenolik bileşikler içerir bu nedenle toplam polifenol indeksi olarak ölçülürler. Bu bileşikler, meyve ve sebzeler gibi doğal ürünlerin önemli bileşenleridir. Şaraptaki kateşin antioksidanının, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonuna karşı alfa-tokoferol gibi diğer antioksidanlara kıyasla daha etkili olduğu iddia edilmiştir (Gomes vd., 2004). Bu nedenle, başta şarap olmak üzere içeceklerin polifenolik içeriğinin belirlenmesi için yeni biyosensörlerin geliştirilmesi, içecek endüstrisi için oldukça önemlidir. Şarap numunelerinde toplam fenolik içeriğinin belirlenmesi, insan sağlığı üzerinde olumlu etkisi olan antioksidan özelliklerinin ölçülmesi için gereklidir. Şarapların fenolik içeriği coğrafi ve atmosferik faktörlerin yanı sıra farklı üretim sistemlerine de bağlıdır. Normalde fenolik

bileşiklerin içeriği kırmızı şaraplarda ortalama 2 ila 5 g/L arasında değişirken ve beyaz şaraplarda 0.1 g/L miktarlarındadır (Chawla vd., 2012b).

5.3.1. GO/TiS₂ Nanokompozitlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

0.9 eV dar bant aralığı enerjisine sahip ve IV. grup yarı iletken geçiş metali dikalkojenit (TMD) grubuna ait titanyum disülfür (TiS₂); süper kapasitör ve biyosensörde katalitik substrat olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır (Wang vd., 2019). Altıgen, sıkı paketlenmiş yapılarının her katmanı, üç atom yaprağı içerir. İki dış katmandaki S, trigonal piramidal tarzda üç Ti atomuna koordine şeklindedir ve orta katmandaki Ti, bir oktahedral geometride altı S atomuna koordine (Long vd., 2017). Bu katmanlı malzemelerin yarı metalik özelliği ve elektriksel iletkenliği gibi avantajlarına rağmen, zayıf kararlılıkları, π - π etkileşimleri yoluyla kümelenme eğilimleri ve TiS₂'ün atomik katmanları arasındaki zayıf van der Waals kuvvetleri gibi dezavantajları da vardır. Tüm bu sorunların üstesinden gelmekle beraber elektrokatalitik etkinliği artırmanın ve elektrot yüzeyi ile redoks probu arasındaki hızlı elektron transferini gerçekleştirmenin en etkileyici yolu, grafen (GO), karbon nanotüp (CNT), grafit karbon nitrür (g-C₃N₄) gibi çeşitli iletken karbon allotroplarının, yarı iletken geçiş metali dikalkojenitlerin yapılarına dahil edilmesidir (Pal vd., 2021). Bu karbon allotroplarından GO, CNT'lere kıyasla ultra yüksek bir spesifik yüzey alanına sahip ve 60 kat daha yüksek elektriksel iletkenlik sağlayan bir 2D nanomalzemedir (Du vd., 2014). Resim 4.11A ve B'de, yoğun bir şekilde toplanmış 2D yapıdaki GO ve TiS₂ nanotabakaların TEM görüntüleri verilmiştir. Ayrıca, TiS₂ nanotabakaların GO'nun birkaç tek katmanlı yapısı içerisinde yoğun bir şekilde iç içe geçtiğini ve heteroyapılı GO/TiS₂ nanokompozitinin oluşumunu gösteren TEM fotoğrafları Resim 4.12'de gösterilmektedir. GO/TiS₂ oluşumu büyük ölçüde fiziksel adsorpsiyon sürecine ve GO ile TiS₂ arasındaki π - π etkileşimlerine dayanır. Ultrasonikasyon sırasında, grafen oksidin katmanlı yapısında bulunan karboksil, karbonil ve hidroksil grupları gibi çeşitli hidrofilik gruplardan dolayı bir dizi çekirdeklenme bölgesi ortaya çıkmaktadır. Sonuç olarak, yüksek ultrasonikasyon ile sırayla GO'nun yüzey katmanı etkilenir ve parçalanmış TiS₂ nanotabakaların adsorpsiyonunu teşvik ederek kararlı bir nanokompozit yapı oluşur (Mahmoudabadi vd., 2021; Pal vd., 2021). Nanokompozit yapısı iyi mekanik ve elektronik özelliklere sahip

olmakla birlikte lakkaz enzimi için biyoyumludur ve redoks substratları için elektron transferini kolaylaştırdığı düşünülmektedir.

5.3.2. Perde Baskılı Elektrotların Modifikasyonu ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Resim 4.13A'da verilen CV grafiği, yalın SPE'lerin, GO/SPE'lerin, TiS₂/SPE'lerin, GO/TiS₂/SPE'lerin ve Lakkaz-GO/TiS₂/NAF-SPE'lerin [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ dönüşümü için iyi tanımlanmış pik zirvelerini göstermektedir. GO/SPE, TiS₂/SPE ve GO/TiS₂/SPE'lerin yalın SPE'ye kıyasla anodik ve katodik akım piklerinin arttığı gözlemlenmiştir. Ancak yapıya lakkazın katılması ve dolayısıyla enzim molekülünün yalıtkan yapısı nedeniyle [Fe(CN)₆]^{3/4-} dönüşümü için elektron transferini engellediği gözlemlenmiştir. Yalın SPE'lerin, GO/SPE'lerin, TiS₂/SPE'lerin, GO/TiS₂/SPE'lerin ve Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE'lerin elektron transfer dirençleri (R_{ct}) sırasıyla 2594 Ω, 1521 Ω, 99.07 Ω, 90.54 Ω ve 1118.5 Ω olarak bulunmuştur. TiS₂/SPE (R_{ct}=1521 Ω) elektron transfer direncinin nispeten GO/SPE'den (99.07 Ω) daha fazla olduğu gözlemlenmiştir ve bu da elektron transferinde engele neden olan TiS₂'nin GO'dan düşük elektroiletkenliğe atfedilebilir. Ancak TiS₂'nin 2D nanotabakalı yapısının, 2D GO tabakaları arasına adsorbsiyonu ile elektrotlar için elektron transfer direncinde düşüş gözlemlenmiştir (R_{ct}=90.54 Ω) ve bu, nanokompozitin elektron transferini hızlandırdığı şeklinde yorumlanabilir. Elde edilen EIS sonuçları (Resim 4.13B), önerilen biyosensörün gelişmiş iletkenliğini gösteren CV verilerine uygundur. Nanokompozitlerle modifiye edilmiş elektrotlarla karşılaştırıldığında, lakkazın mevcut olduğu SPE'lerde yarımların çapı artmıştır. Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE'lerin yarımların çapındaki ve R_{ct} değerindeki bu artış, düşük frekanslarda zayıf iletkenleri olan ve elektron transferini engelleyen enzimler dahil çoğu biyolojik moleküle atfedilmektedir (Chawla vd., 2012a). Vasilescu vd. (2016) lakkaz immobilizasyonu için destek materyali olarak kullanılan, MoS₂ nanotabakalara ve grafen quantum noktalara (GQDs) dayanan nanokompozitleri sundukları çalışmada kırmızı şaraptaki toplam polifenol içeriğini belirlemişlerdir. Karbon perde baskılı elektrot (CSPE), CSPE-MoS₂, CSPE-GQDs ve CSPE-MoS₂-GQDs elektrotlarının elektrokimyasal karakterizasyonunu 50 mV/s tarama hızında 0.1 M KCl ve 1 mM [Fe(CN)₆]^{3/4-} içeren

tampon çözeltide gerçekleştirmişlerdir. CSPE-MoS₂ elektrodunun akım pik tepelerinin yalnız elektroda göre düşük olduğunu bildirmişlerdir. CSPE'lerin, GQD'ler ile modifiye edildiğinde GQD'lerin iyi iletkenliğine bağlı olarak redoks tepe akımı yoğunluklarının arttığını rapor etmişlerdir. Son olarak, CSPE-MoS₂-GQDs elektroduna ait redoks tepe akımlarının tüm elektrotlardan daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Resim 4.14A'da, 50 mM pH 5.0 ABS tamponu çözeltisinde 100 µM (-)-epikateşin varlığında, elektrokatalitik özellikleri karşılaştırılan yalnız SPE, TiS₂/SPE, GO/SPE, GO/TiS₂/SPE ve Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE'lere ait CV ölçülerinin sonuçları gösterilmektedir. Yüz µM (-)-epikateşin için tüm elektrotlarla bir çift iyi tanımlanmış redoks tepe noktası gözlenmiştir ancak Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE'nin pik akım tepeleri önemli ölçüde farklıdır. Çünkü Ag/AgCl'ye karşı -0.126 V civarında gözlemlenen katodik tepe akımı diğer elektrotlara göre oldukça yüksektir. Ayrıca Resim 4.14A'da da görüldüğü gibi II ile gösterilen ve daha negatif bir potansiyelde (-0.590 V) bulunan ikinci bir indirgenme pik akımı gözlenirken, yalnız SPE, GO/SPE, TiS₂/SPE GO/TiS₂/SPE'ler için -0.590 V'da aynı indirgenme akım piki gözlenmemiştir. Bunun sebebi, (-)-epikateşinin sahip olduğu 5 hidroksil grubu ve antioksidan yeteneğini de kazandıran elektron verme yeteneği düşünüldüğünde daha negatif potansiyelde ikinci bir indirgenme tepkimesinin elektrot yüzeyinde gerçekleştiği düşünülmektedir (Resim 4.14B).

5.3.3. Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE'lerin Optimizasyonu

Polifenol tayini için tasarlanan biyosensörlerin gerçek numunelerde polifenol karışımlarının tayini için duyarlı, seçici ve kararlı olması gerekmektedir. Şaraplardaki polifenol analizinde kullanılan elektrokimyasal biyosensörler, polifenol oksidazların veya peroksidazların aktivitesine dayanmaktadır. Polifenol oksidazlar, oksijenin suya indirgenmesiyle birlikte seçilen fenollerin kinon türevlerine oksidasyonunu katalize eder ve kinon türevleri, negatif potansiyellerde elektrokimyasal olarak tayin edilebilir. (-)-Epikateşinin seçici tayininin yüksek duyarlılık ve düşük tayin sınırı (LOD) ile belirlenmesi için çalışma potansiyelinin seçimi oldukça önemlidir. Bu amaçla, -0.9 ve -0.1 V aralığında amperometrik ölçümler alınmıştır ve Şekil 4.17'de görüldüğü gibi en yüksek amperometrik

cevabın elde edildiği -0.6 V, çalışma potansiyeli olarak belirlenmiştir. Bu potansiyel aralığında düşük gürültü ve arka plan akımı vardır ve bu da düşük analit derişimlerinin tayin edilmesini sağlar. (-)-Epikateşin, okside lakkaz tarafından epikateşin-o-kinona yükseltgenir ve düşük potansiyelerde, epikateşin-o-kinon elektrokimyasal olarak indirgenir ve bu biyoelektrokatalitik reaksiyon, yüksek duyarlık ve elektrodun daha fazla kullanılabilirliği gibi avantajlar sunar (Njagi vd., 2008). Mohtar vd. (2019) propolis numunelerinde polifenol tayini için bir elektrokimyasal biyosensör rapor etmişlerdir. Perde baskılı bir karbon elektrot yüzeyini (SPCE) elektropolimerizasyon yoluyla polipirol (PPy) ile modifiye etmişler ve elektro-biriktirme yöntemi ile altın nanopartikülleri (AuNP'ler) yapıya entegre etmişlerdir. Nanokompozite lakkazın immobilizasyonunu gerçekleştiren araştırmacılar, lakkaz tarafından polifenollerin yükseltgenmesi ve böylece PPy/Lac/AuNPs/SPCE yüzeyinde yeniden indirgenmesini sağlayan potansiyelin -450 mV olduğunu rapor etmişlerdir. Daha negatif potansiyel değerlerinde sinyalde daha fazla artış gözlenmediğinden optimum olarak -450 mV'luk bir çalışma potansiyeli uygulamışlardır.

Elektrot yüzeyindeki lakkaz miktarı, biyosensörün amperometrik yanıtını etkilemektedir. Lakkaz miktarının biyosensör yanıtına etkisini incelemek için farklı miktarlarda enzim içeren elektrotlar hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.18'de gösterilmektedir ve buradan da görüldüğü gibi, en yüksek akım değeri 2.34 U enzim miktarı ile hazırlanan elektrotlar ile elde edilmiştir. Düşük miktarlarda lakkaz ile hazırlanan elektrotların amperometrik yanıtlarının düşük olması, elektrotların yüzeyinde elektron transferinin nispeten daha düşük olduğu şekilde açıklanabilir. Eremia vd. (2013) çay yapraklarında toplam polifenolik bileşiklerin tayini için tek kullanımlık bir amperometrik biyosensör geliştirilmişlerdir. Biyosensör tasarımını, platin nanopartiküller ve indirgenmiş grafen oksit ile perde baskılı karbon bir elektrodun yüzeyini modifiye ederek ve ardından lakkazın damlatılmasıyla gerçekleştirmişlerdir. Enzim miktarının amperometrik yanıtı etkileyen önemli bir faktör olmasından dolayı 100–500 mUI lakkaz miktarı aralığında çalışmışlardır. Akım yoğunluğunun, lakkaz miktarındaki artışla arttığını ve 300 mUI'lik enzim aktivitesi için maksimum değere ulaştığını rapor etmişlerdir.

Tampon çözelti pH'ının amperometrik yanıtı etkisini incelemek için hazırlanan elektrotların, her bir tampon çözelti içerisinde 100 µM (-)-epikateşin için akım değerleri kaydedilmiştir. Şekil 4.19'dan da görüldüğü üzere, tasarlanan biyosensör için optimum pH değeri 5.0 olarak belirlenmiştir. Kırmızı şarabın asidik pH'ı düşünüldüğünde, gözlemlenen

optimum pH kabul edilebilir bir değerdir. pH'a göre akım değerlerinin değişimi gözlemlendiğinde, tepe noktası olan 5.0'den sonra akımın azaldığı gözlemlenmiştir. pH arttıkça akımın azalması, polifenollerin yüksek pH değerlerinde anyonik forma dönüşmesi ve bu anyonik formlar ile elektrotların yüzeyi arasında elektrostatik itmeye neden olması ile açıklanabilir (Quan ve Shin, 2004; Qi ve Zhang, 2005; Nazari vd., 2015; Song vd., 2015). Vasilescu vd. (2016) lakkaz immobilizasyonunda destek materyali olarak MoS₂ nanotabakalara ve grafen quantum dotlara (GQDs) dayanan nanokompoziteri kullandıkları bir çalışmada kırmızı şaraptaki toplam polifenolik içeriğini belirlemek için çalışma pH'ı olarak 0.1 M pH 5.0 ABS tamponunu kullanmışlardır.

5.3.4. Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE'lerin Kinetik ve Analitik Performansları

Şarap analizi için polifenol oksidaz bazlı elektrokimyasal biyosensörün ilk uygulamalarından biri Gomes vd. (2004) tarafından önerilmiştir. Lakkaz temelli biyosensör, genellikle kırmızı şarapta bulunan çeşitli polifenoller için (kafeik asit, gallik asit, kateşin, rutin, trans-resveratrol, kersetin ve malvidin) uygulanmıştır (Della Pelle ve Compagnone, 2018).

Sunulun bu çalışmada şarap ve meyve suyu numunelerinde (-)-epikateşin tayinine yönelik geliştirilen lakkaz içeren GO/TiS₂ nanokompozit temelli biyosensörün analitik ve katalitik karakterizasyonu, (-)-epikateşin için bir kalibrasyon grafiğinin hazırlanması ile yapılmıştır. Tasarlanan biyosensörün (-)-epikateşin için gösterdiği doğrusal aralık, 0.1–250 µM olarak belirlenmiştir (Şekil 4.20) ($y=0.0408x+0.2476$ ve $R^2=0.9954$). Literatür ile karşılaştırıldığında bu doğrusal aralık, oldukça geniştir. Ölçülebilen en küçük derişim sınırı (LOD), sinyal gürültü oranı 3 olarak alınarak ($S/N=3$) 0.073 µM olarak belirlenmiştir. Ek olarak, biyosensör için ölçüm sınırı (LOQ) 0.223 µM olarak belirlenmiştir. ElKaoutit vd. (2008) çalışmalarında 23.3 U aktiviteye sahip lakkaz enzimi ile tasarladıkları biyosensör için LOD değerini 0.16 µM olarak hesaplamışlardır. Bu tezde, lakkaz içeren GO/TiS₂ nanokompozitler ile modifiye edilen elektrodun (-)-epikateşin için duyarlılığı, 0.3264 µAµM⁻² olarak bulunmuştur.

Enzimatik biyosensörün performansı hakkında bilgi veren kinetik parametreler, Lineweaver-Burk grafiğinden ve eşitliğinden hesaplanmıştır (Şekil 4.21 ve Eşitlik 9). Bu çalışmada K_m^{app} ve I_{max} değerleri sırasıyla 2.245 μM ve 0.757 μA olarak bulunmuştur. Yapılan deneylerde cevap süresinin ortalama olarak 8 saniyeden küçük olduğu bulunmuştur. Bulunan değerler, literatür araştırması sonucu gözlenen bir değer olduğu görülmüştür (Wardak vd., 2020).

Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE biyosensörünün tekrar kullanılabilirliğini göstermek için aynı elektrot ile 100 μM (-)-epikateşin varlığında amperometrik ölçümler tekrarlanmıştır ve sonuçlar Şekil 4.22A'da gösterilmiştir. Akım sinyalinin kademeli olarak düşmesiyle, lakkaz aktivitesinin ardışık 10 ölçüme kadar yaklaşık %86.3'ü, 15 ölçüme kadar yaklaşık %70.7'si korunmuştur. Akım sinyalindeki bu kademeli azalma, muhtemelen lakkaz ve elektrot yüzeyi arasındaki etkileşimin zayıflaması nedeniyle elektrottan sızan immobilize enzime ve kullanıma bağlı olarak yüzey deformasyonu ile açıklanabilir. Ardışık olarak alınan 15 ölçüm sonucu hesaplanan bağıl standart sapma değeri ise %4.5 (n=15) olarak bulunmuştur. ElKaoutit vd (2008) aralarında (-)-epikateşinin de bulunduğu bazı polifenollerin biradaki tayini için NafionTM-Lac/Sonogel-Carbon biyosensörünü tasarlamışlar ve biyosensörlerin stabilitesi ve tekrarlanabilirliğini, doğrudan gerçek bira numunelerinde çalışarak değerlendirmişlerdir. Ardışık olarak alınan 10 ölçümün sonunda bağıl standart sapma değerini %3.3 olarak belirlemişlerdir.

Aynı şartlarda hazırlanan 5 özdeş elektrodun 100 μM (-)-epikateşin için verdiği amperometrik cevapların yüzde değerleri ise Şekil 4.22B'de gösterilmektedir ve bu sonuçlara göre bağıl standart sapma değeri %3.07 (n=5) olarak bulunmuştur. Bu değer biyosensörün tekrar hazırlanabilirliğini göstermektedir. Vladimis vd. (2017) camsı karbon elektrodun (GCE) rGO ve MWCNT ile modifiye edilmiş amperometrik lakkaz biyosensörünün tekrar üretilebilirliğini değerlendirmek için 4 bağımsız elektrodun amperometrik yanıtlarını test etmişler ve ölçümlerin bağıl standart sapmasını %5.5 olarak bildirmişlerdir.

Lakkazın katekol dahil çok çeşitli organik substratları yükseltgediği yani geniş substrat yelpazesi olduğu iyi bilinmektedir. Bu nedenle, şarapta mevcut olan polifenollerin (-)-epikateşin tayinine girişim etkisi incelenmiştir. Amperometrik ölçümlerde kükürt dioksit (Na₂S₂O₅'in şarap organik asitleri ile reaksiyonundan gelir) ve indirgeyici şekerler sinyallere müdahale etmez. Kükürt dioksit şarap analizinde azot gazı ile basitçe ortadan kaldırılabılır

ancak, şaraplardaki varlığı polifenollerin toplam içeriğine göre kontrol edildiğinden eliminasyonu için bir ön işlem gerekli değildir. İndirgen şekerler ise elektroaktif türler değildirler. Askorbik asit, analit ile aynı molar derişimlerinde bulunduğundan en önemli girişim yapan maddedir. Askorbik asit girişimini değerlendirmek bu yüzden oldukça önemlidir (Di Fusco vd., 2010). Şekil 4.23'de de gösterildiği gibi 100 µM askorbik asit %2.56; 100 µM siyanidin %13.86; 100 µM klorojenik asit %6.76; 100 µM resveratrol %2.83; 200 µM quercetin %11.28; 100 µM rutin %22.92; 300 µM gallik asit %4.37; 300 µM kafeik asit %5.54 ve 100 µM glukoz %2.14'lük girişim etkisi göstermiştir. Yükseltgenmiş katekol bileşiklerinin lakkazın direkt elektron transfer mekanizması ile elektrokatalitik indirgenmesi, -0.6 V'luk daha negatif bir potansiyelde incelenmiştir. Bu nedenle, bu düşük potansiyelde, diğer polifenollerin benzer derişimlerde (-)-epikateşinin tayinine bir girişim etkisi olmamıştır. Kısacası, seçicilik çalışmaları, reaksiyon ortamına eklenen maddelerin biyosensörün performansına önemli ölçüde müdahale etmediğini göstermiştir. Bu nedenle, bu biyosensör, analitik yanıtta önemli bir müdahale olmaksızın, potansiyel olarak girişim oluşturan bu bileşiklerin varlığında (-)-epikateşin tayini için kullanılabilir.

Elektrotlar depo kararlılığı deneyleri süresinde kullanılmadıkları zaman +4°C'de saklanmıştır ve elektrotların 30. günün sonundaki kullanımından sonra aktivitesinin %95.9'nu, 60. günün sonunda %81.3'ünü ve 90. günün sonunda %72.2'sini koruduğu saptanmıştır (Şekil 4.24). Bu mükemmel depo kararlılığı, GO/TiS₂ nanokompozitinin lakkaz için biyoyumlu bir immobilizasyon ortamı oluşturmaya bağlanabilir. Rahman ve Noh (2008) Den-AuNPs PDATT film/GCE biyosensörünün kateşin için depo kararlılığını göstermek üzere 2 ay boyunca günde 3 kez amperometrik ölçümleri tekrar etmişlerdir. İkinci ayın sonunda biyosensörün, başlangıç aktivitesinin %92'sini koruduğunu bildirmişlerdir.

Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE biyosensörünün analitik özellikleri, Çizelge 7'de gösterildiği gibi çeşitli enzim temelli biyosensörlerle karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmada, Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE biyosensörü, katalitik aktivite, tayin sınırı, duyarlık ve doğrusal aralık açısından iyi bir performans göstermiştir. Ayrıca biyosensör oda sıcaklığında ve tekrar kullanılabilir performansını sergilemiştir. Genel olarak bu çalışmanın sonuçları kompozit nanomalzemelerin, enzimler için iyi korunmuş aktivite ve işlevsellik ile birlikte etkili bir immobilizasyon ortamı olarak kabul edilebileceğini göstermektedir.

Çizelge 7. (-)-Epikateşin tayini için tasarlanan çeşitli lakkaz ve tirozinaz temelli biyosensörlerin karşılaştırılması

Elektrot	Yöntem	Doğrusal aralık (µM)	Duyarlık	LOD (µM)	K _m (µM)	Referans
NAF/Lac/Sonogel-Karbon (<i>T. versicolor</i>)	AMP.	0.04–8.0	28.139 nAµM ⁻¹	0.16	57.16	ElKaoutit vd., 2008
SPE/rGO-CDBA-LAC (<i>C. unicolor</i>)	AMP.	2–60	7.81 nAµM ⁻¹	2.44	178	Jarosz-Wilkolazka vd., 2004
DEN-AuNPS PDATT film/GCE (<i>R. vernificera</i>)	AMP.	0.1–10.0	-	0.05	-	Rahman ve Noh, 2008
CSPE-MoS ₂ -GQDs-TvL (<i>T. versicolor</i>)	AMP.	2.86–100.0	16.42 nAµM ⁻¹	2.04	121.8	Vasilescu vd., 2016
LAC/ERGO-MWCNTS/GC (<i>T. versicolor</i>)	AMP.	300'e kadar	0.31 A/Mcm ²	0.5		Vladimis vd., 2017
Naylon nanofibers-TYR-GCE	AMP	100'e kadar	304 nAµM ⁻¹	0.05	-	Arecchi vd., 2010
AuNPs-PPy-TYR (<i>Mantar</i>)	CV	0.001–0.01	6.8x10 ⁻⁵ AM ⁻¹	1x10 ⁻⁹ M	130	Singh vd., 2012
Lakkaz-rGO/TiS ₂ -NAF-SPE (<i>T. versicolor</i>)	AMP.	0.1–250	0.3264 µAµM ⁻¹ cm ⁻²	0.073	2.245	Bu çalışma

5.3.5. Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE'lerin Şarapta ve Meyve Suyunda (-)-Epikateşin Tayini İçin Uygulanabilirliğinin Araştırılması

Şarap ve meyve suyu numunelerinde polifenollerin tayini için önerilen yöntemin analitik kullanılabilirliği gösterilmiş ve sonuçlar referans olarak kullanılan Folin-Ciocalteu yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE biyosensörü ile analiz edilen tüm numuneler için elde edilen sonuçlar, literatürde daha önce şarap analizi için rapor edilen diğer lakkaz temelli elektroanalitik yöntemlerle uyumlu sonuçlar göstermiştir (Di Fusco vd., 2010; Gamella vd., 2006). Çizelge 3'de her iki yöntemle numunelerde bulunan polifenol miktarı gösterilmiştir. Geri kazanım çalışmaları ise her iki numuneye 10 µM derişiminde (-

)-epikateşin eklenerek yapılmıştır. Spektrofotometrik yöntemle şarap ve meyve suyu numunelerinde geri kazanım sırasıyla %112.59 ve %105.91 olarak hesaplanırken, bu değerler hazırlanan biyosensör için sırasıyla %108.96 ve 109.19 olarak hesaplanmıştır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

Göl suyu ve musluk suyunda katekol tayini için lakkaz temelli Cys-Ag@Fe₃O₄ manyetik nanopartiküllerle modifiye perde baskılı elektrotlar; ticari serum ve yapay idrarda dopamin tayini için lakkaz immobilize Ni/Au/PPy-COOH nanoteller ile modifiye perde baskılı elektrotlar; şarapta ve meyve suyunda (-)-epikateşin tayini için lakkaz temelli GO/TiS₂ nanokompozitlerle modifiye perde baskılı elektrotlar hazırlanmıştır. Sentezlenen nanomalzemelerin karakterizasyonu yapıldıktan sonra malzeme özellikleri dikkate alınarak lakkaz ve nanomalzemeler ile bir biyokompozit yapısı elde edilerek elektrot yüzeyini modifiye etmek için kullanılmıştır.

Lakkaz/Cys-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörünün katekol için gösterdiği doğrusal aralık 0.1–100 µM, ölçülebilen en küçük derişim sınırı (LOD) 0.06 µM, ölçüm sınırı (LOQ) 0.203 µM, duyarlılığı 60.056 µA mM⁻¹ cm² olarak belirlenmiştir. Biyosensörün K_m^{app} ve I_{max} değerleri sırasıyla 0.021 mM ve 588.235 nA olarak ve cevap süresi 30 saniyeden kısa bulunmuştur. Lakkaz-Ag@Fe₃O₄/Kitosan/SPE biyosensörü musluk suyu ve göl suyu numunelerinde düşük miktarlarda olsa dahi katekolün tayini için güvenilir bir tasarımdır.

Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE biyosensörünün dopamin için gösterdiği doğrusal aralık 0.01–50 µM olarak belirlenmiştir. Ölçülebilen en küçük derişim sınırı (LOD) 2.265 nM, ölçüm sınırı (LOQ) 7.551 nM ve duyarlılığı 0.902 µA µM⁻¹ cm² olarak belirlenmiştir. Biyosensörün K_m^{app} ve I_{max} değerleri sırasıyla 2.056 µM ve 1.03 µA olarak ve cevap süresi 20 saniyeden kısa bulunmuştur. Lakkaz-Ni/Au/PPy-COOH/NAF/SPE biyosensörü ticari insan serumu ve yapay idrar numunelerinde geniş bir doğrusal aralık ile dopamin tayini için güvenilir bir tasarımdır.

Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE biyosensörünün (-)-epikateşin için gösterdiği doğrusal aralık 0.1–250 µM olarak belirlenmiştir. Ölçülebilen en küçük derişim sınırı (LOD) 0.073 µM, ölçüm sınırı (LOQ) 0.223 µM ve duyarlılığı 0.3264 µA µM⁻¹ cm² olarak belirlenmiştir. Biyosensörün K_m^{app} ve I_{max} değerleri sırasıyla 2.245 µM ve 0.757 µA olarak ve cevap süresi 8 saniyeden kısa bulunmuştur. Lakkaz-GO/TiS₂-NAF/SPE biyosensörü, kırmızı şarap ve

meyve suyu numunelerinde (-)-epikateşinin tayini ve gıda numunelerinde toplam polifenol içeriğın belirlenmesi için güvenilir bir tasarımıdır.

Gerçekleştirilen tüm deneylerde kullanılan lakkazın aktivitesi 0.78 U idi. Aktivitesi mg başına daha yüksek olan lakkazın kullanımı ile elektrot yüzeyinin daha düşük enzim miktarıyla modifikasyonu mümkün olabilirdi.

Amperometrik cihazlarda, enzimin kararlılığının bozulması ve dolayısıyla yetersiz performans en çok karşılaşılan problemlerin başında gelmektedir. Maliyeti düşük ve yeniden kullanılabilirliği mümkün nanomalzemeler ve enzimin aktivitesini etkilemeyen immobilizasyon yöntemlerinin uygun bir kompozisyonunun mümkün olduğu bu tez çalışmasının, biyosensör üretimi fizibilitesinin artırılması için literatüre önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Çevre sularında kirletici olarak bulunan ve insan sağlığı üzerinde zararlı etkileri olan birden fazla polifenolün aynı anda tayinini sağlayacak bi-enzim temelli nanobiyosensörler geliştirilebilir. Ayrıca, kirletici endüstriyel etkenlerin olduğu bölgelere yakın çevre sularında toksik polifenolların tayini için, hazırlanan biyosensör sistemine alternatif sistemlerin minyatürizasyonu ile cepte taşınabilir cihazlar üretilebilir.

Dopamin tayini için geliştirilen biyosensör, LOD değeri ve doğrusal aralığı ile gelecekteki *in vivo* uygulamalar için umut vadetmektedir. Dopamin seviyelerinin normal düzeylerinden farklı olduğu bilinen gerçek bir örnek üzerinde biyosensör test edilebilirdi ancak imkanların yetersizliği nedeniyle gerçek numunelerde dopamin tayini gerçekleştirilmemiştir. Ancak geliştirilen teknolojilerle beraber gelecekteki çalışmalarda hasta başı uygulamaları için kullanımının yanı sıra hastanın uzaktan takip edilmesini sağlayan sistemlerin hazırlanması mümkün olabilir. Ayrıca bu tezde, klasik yöntemlerle numune alımının bireyin patofizyolojisini değerlendirmek için acı verici yani invazif bir yöntem olması nedeniyle dopamin biyosensörünün uygulaması, yapay idrar numunelerinde de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, idrarda normal dopamin seviyelerinden sapma durumunda, tasarlanan biyosensör sisteminin seçici bir şekilde dopamin için doğru bir yanıt vereceğini göstermektedir. Biyomedikal uygulamalar için optik biyosensörler daha yüksek duyarlık sunmaktadır ancak bu cihazların kurulum maliyetleri oldukça yüksektir.

Gıda kalitesinin geliştirilmesi için tasarlanan lakkaz temelli biyosensörün ana avantajı, kullanılan elektroanalitik ekipmanların (perde baskılı elektrotlar, portatif potansiyostat ve dizüstü bilgisayar) kullanılabilirliği ve böylece gıda tüketim maddelerinde üretim sırasında polifenol ölçümlerinin yapılmasına izin vermesidir. Ayrıca spektroskopik yöntemle de karşılaştırılan biyosensör, başta şarap endüstrisi olmak üzere, birçok gıda ürünlerinde kalitenin izlenmesi için başarılı bir analitik cihazdır. Polifenollerin şarapta ve meyve suyunda tayini önemli olduğu için meyvelerin toplanmasından, oluşan son ürüne kadar her aşamada tasarlanan biyosensörün tekrar kullanılabilirlikle beraber uzun depolama süreleri ile kullanımı mümkündür. Ayrıca, bi-enzim sistemlerinin tasarımı ile aynı anda birden fazla polifenolün tayinini mümkün kılınabilir. (-)-Epikateşinin yüksek antioksidan aktivitesinin insan sağlığı üzerindeki pozitif etkilerinden dolayı, tasarlanan biyosensörler çay, kakao ürünleri ve meyvelerdeki tayini için geliştirilebilir.

KAYNAKLAR

- Alcalde, M. (2007). Laccases: biological functions, molecular structure and industrial applications. In *Industrial enzymes* (pp. 461-476). Springer, Dordrecht. doi: 10.1007/1-4020-5377-0_26
- Algieri, C., Drioli, E., Guzzo, L., Donato, L. (2014). Bio-Mimetic Sensors Based on Molecularly Imprinted Membranes. *Sensors* 14, 13863–13912. doi: 10.3390/s140813863
- Amorim, A. D. G. N., Sánchez-Paniagua, M., de Oliveira, T. M., Mafud, A. C., da Silva, D. A., de Almeida, J. R. D. S., & López-Ruiz, B. (2021). Synthesis, characterization and use of enzyme cashew gum nanoparticles for biosensing applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 9(34), 6825-6835. doi: 10.1039/D1TB01164B
- Annachhatre, A. P., & Gheewala, S. H. (1996). Biodegradation of chlorinated phenolic compounds. *Biotechnology Advances*, 14(1), 35-56. doi: 10.1016/0734-9750(96)00002-X
- Arduini, F., Micheli, L., Moscone, D., Palleschi, G., Piermarini, S., Ricci, F., & Volpe, G. (2016). Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 79, 114-126. doi: 10.1016/j.trac.2016.01.032
- Arecchi, A., Scampicchio, M., Drusch, S., & Mannino, S. (2010). Nanofibrous membrane based tyrosinase-biosensor for the detection of phenolic compounds. *Analytica Chimica Acta*, 659(1-2), 133-136. doi: 10.1016/j.aca.2009.11.039
- Aydar S. (2019). Modifiye karbon pasta elektrotlar kullanılarak bazı kozmetik ürünlerde kullanılan maddelerin voltametrik tayini. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
- Balu, S., Palanisamy, S., Velusamy, V., Yang, T. C., & El-Shafey, E. S. I. (2020). Tin disulfide nanorod-graphene- β -cyclodextrin nanocomposites for sensing dopamine

in rat brains and human blood serum. *Materials Science and Engineering: C*, 108, 110367. doi:10.1016/j.msec.2019.110367

Barber, D. J., & Freestone, I. C. (1990). An investigation of the origin of the colour of the Lycurgus Cup by analytical transmission electron microscopy. *Archaeometry*, 32(1), 33-45. doi: 10.1111/j.1475-4754.1990.tb01079.x

Bargeron Jr, L. M., Clark Jr, L. C., & Lyons, C. (1962). Modern methods in the diagnosis of congenital heart disease. *Medical Clinics of North America*, 46(6), 1555-1582 doi: 10.1016/S0025-7125(16)33641-0

Barrière, F., Kavanagh, P., & Leech, D. (2006). A laccase–glucose oxidase biofuel cell prototype operating in a physiological buffer. *Electrochimica Acta*, 51(24), 5187–5192. doi:10.1016/j.electacta.2006.03.050

Bento, I., Martins, L. O., Lopes, G. G., Carrondo, M. A., & Lindley, P. F. (2005). Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective. *Dalton Transactions*, (21), 3507-3513. doi:10.1039/B504806K

Benvidi, A., & Jahanbani, S. (2016). Self-assembled monolayer of SH-DNA strand on a magnetic bar carbon paste electrode modified with Fe₃O₄@ Ag nanoparticles for detection of breast cancer mutation. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 768, 47-54. doi: doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.02.038.

Bernatova, I. (2018). Biological activities of (–)-epicatechin and (–)-epicatechin-containing foods: Focus on cardiovascular and neuropsychological health. *Biotechnology Advances*, 36(3), 666–681. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.01.009

Bertrand, G. (1894). Sur le latex de l'arbre à laque. *Compt. rend.*, 118, 1215-1218.

Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 1–8. doi:10.1042/EBC20150001

Binnig, G., & Rohrer, H. (2000). Scanning tunneling microscopy. *IBM Journal of research and development*, 44(1/2), 279 - 293.

- Blum, L.J., & Coulet, P.R. (Eds.). (2019). *Biosensor Principles and Applications*. CRC Press. doi: 10.1201/9780367810849
- Bogomolova, A., Komarova, E., Reber, K., Gerasimov, T., Yavuz, O., Bhatt, S., & Aldissi, M. (2009). Challenges of electrochemical impedance spectroscopy in protein biosensing. *Analytical Chemistry*, 81(10), 3944-3949. doi: 10.1021/ac9002358
- Bosch, M. E., Sánchez, A. J. R., Rojas, F. S., & Ojeda, C. B. (2007). Recent development in optical fiber biosensors. *Sensors*, 7(6), 797-859. doi: 10.3390/s7060797
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2): 248–254. doi: 10.1006/abio.1976.9999
- Buckingham, J., & Munasinghe, V. R. N. (2015). *Dictionary of Flavonoids with CD-ROM*. CRC Press.
- Bucur, B., Purcarea, C., Andreescu, S., Vasilescu, A., (2021). Addressing the selectivity of enzyme biosensors: Solutions and perspectives. *Sensors* 21. doi: 10.3390/s21093038
- Cajthaml, T., Křesinová, Z., Svobodová, K., & Möder, M. (2009). Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. *Chemosphere*, 75(6), 745-750. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.01.034
- Cammann, K. (1977). Bio-sensors based on ion-selective electrodes. *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie*, 287(1), 1-9. doi: 10.1007/BF00539519
- Castrovilli, M. C., Bolognesi, P., Chiarinelli, J., Avaldi, L., Cartoni, A., Calandra, P., ... & Scognamiglio, V. (2020). Electrospray deposition as a smart technique for laccase immobilisation on carbon black-nanomodified screen-printed electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 163, 112299. doi: 10.1016/j.bios.2020.112299

- Catuogno, S., Esposito, C.L., (2017). Aptamer Cell-Based Selection: Overview and Advances. *Biomedicines* 5, 49. doi: 10.3390/biomedicines5030049
- Cesarino, I., Galesco, H. V., Moraes, F. C., Lanza, M. R. V., & Machado, S. A. S. (2013). Biosensor Based on Electrocodeposition of Carbon Nanotubes/Polypyrrole/Laccase for Neurotransmitter Detection. *Electroanalysis*, 25(2), 394–400. doi: 10.1002/elan.201200542
- Cevher, Ş. C., Bekmezci, S. A., Udum, Y. A., Toppare, L., & Çırpan, A. (2021). Indenoquinoxalinone based conjugated polymer substrate for laccase biosensor. *Materials Chemistry and Physics*, 257, 123788. doi: 10.1016/j.matchemphys.2020.123788
- Chan, Y. Y., Eng, A. Y. S., Pumera, M., & Webster, R. D. (2015). Assessments of Surface Coverage after Nanomaterials are Drop Cast onto Electrodes for Electroanalytical Applications. *ChemElectroChem*, 2(7), 1003–1009. doi:10.1002/celec.201500047
- Chandran, M., Aswathy, E., Shamna, I., Vinoba, M., Kottappara, R., & Bhagiyalakshmi, M. (2021). Laccase immobilized on Au confined MXene based electrode for electrochemical detection of catechol. *Materials Today: Proceedings*, 46, 3136-3143. doi: 10.1016/j.matpr.2021.02.697.
- Chawla, S., Rawal, R., Kumar, D., & Pundir, C. S. (2012b). Amperometric determination of total phenolic content in wine by laccase immobilized onto silver nanoparticles/zinc oxide nanoparticles modified gold electrode. *Analytical biochemistry*, 430(1), 16-23.
- Chawla, S., Rawal, R., Sharma, S., & Pundir, C. S. (2012a). An amperometric biosensor based on laccase immobilized onto nickel nanoparticles/carboxylated multiwalled carbon nanotubes/polyaniline modified gold electrode for determination of phenolic content in fruit juices. *Biochemical engineering journal*, 68, 76-84. doi: 10.1016/j.bej.2012.07.008
- Chen, J., Yan, J., Chen, Y., Hou, S., Ji, Y., & Wu, X. (2018). Unique role of non-mercapto groups in thiol-pinning-mediated Ag growth on Au nanoparticles. *Nano Research*, 11(2), 614-624. doi: 10.1007/s12274-017-1666-4

- Cheng, A. K., Ge, B., & Yu, H. Z. (2007). Aptamer-based biosensors for label-free voltammetric detection of lysozyme. *Analytical chemistry*, 79(14), 5158-5164. doi: 10.1021/ac062214q
- Clark Jr. L.C. (1956). Monitor and Control of Blood and Tissue Oxygen Tensions. *Transactions of the American Society for Artificial Internal Organs*, 2, 41-48.
- Coelho, J. H., Eisele, A. P., Valezi, C. F., Mattos, G. J., Schirmann, J. G., Dekker, R. F., ... & Sartori, E. R. (2019). Exploring the exocellular fungal biopolymer botryosphaeran for laccase-biosensor architecture and application to determine dopamine and spironolactone. *Talanta*, 204, 475-483. doi: 10.1016/j.talanta.2019.06.033
- Cosnier, S., & Popescu, I. C. (1996). Poly(amphiphilic pyrrole)-tyrosinase-peroxidase electrode for amplified flow injection-amperometric detection of phenol. *Analytica Chimica Acta*, 319(1-2), 145-151. doi:10.1016/0003-2670(95)00479-3
- Cosnier, S., Fombon, J.-J., Labbé, P., & Limosin, D. (1999). Development of a PPO-poly(amphiphilic pyrrole) electrode for on site monitoring of phenol in aqueous effluents. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 59(2-3), 134-139. doi:10.1016/S0925-4005(99)00210-5
- Cox, J. C., & Ellington, A. D. (2001). Automated selection of anti-protein aptamers. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 9(10), 2525-2531. doi: 10.1016/S0968-0896(01)00028-1
- Damiati, S., & Schuster, B. (2020). Electrochemical biosensors based on S-layer proteins. *Sensors*, 20(6), 1721. doi: 10.3390/s20061721
- Das, D., Nag, S., De, S., Hazarika, A. K., Sabhapondit, S., Tudu, B., ... & Roy, R. B. (2021). Electrochemical Detection of Epicatechin in Green Tea Using Quercetin-Imprinted Polymer Graphite Electrode. *IEEE Sensors Journal*, 21(23), 26526-26533. doi: 10.1109/JSEN.2021.3122145
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability,

and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1818–1892. doi: 10.1089/ars.2012.4581

Della Pelle, F., & Compagnone, D. (2018). Nanomaterial-based sensing and biosensing of phenolic compounds and related antioxidant capacity in food. *Sensors*, 18(2), 462. doi: 10.3390/s18020462

Di Fusco, M., Tortolini, C., Deriu, D., & Mazzei, F. (2010). Laccase-based biosensor for the determination of polyphenol index in wine. *Talanta*, 81(1-2), 235-240. doi: 10.1016/j.talanta.2009.11.063.

Drexler, K. E. (1981). Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(9), 5275-5278. doi: 10.1073/pnas.78.9.5275

Du, J., Yue, R., Ren, F., Yao, Z., Jiang, F., Yang, P., & Du, Y. (2014). Novel graphene flowers modified carbon fibers for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. *Biosensors and Bioelectronics*, 53, 220–224. doi: 10.1016/j.bios.2013.09.064

Dzyadevych, S. V., Arkhypova, V. N., Soldatkin, A. P., El'Skaya, A. V., Martelet, C., & Jaffrezic-Renault, N. (2008). Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. *Irbm*, 29(2-3), 171-180. doi: 10.1016/j.rbmret.2007.11.007

ElKaoutit, M., Naranjo-Rodriguez, I., Tamsamani, K. R., Hernández-Artiga, M. P., Bellido-Milla, D., & de Cisneros, J. L. H. H. (2008). A comparison of three amperometric phenoloxidase–Sonogel–Carbon based biosensors for determination of polyphenols in beers. *Food chemistry*, 110(4), 1019-1024. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.03.006

Eremia, S. A., Vasilescu, I., Radoi, A., Litescu, S. C., & Radu, G. L. (2013). Disposable biosensor based on platinum nanoparticles-reduced graphene oxide-laccase biocomposite for the determination of total polyphenolic content. *Talanta*, 110, 164-170. doi: 10.1016/j.talanta.2013.02.029

- Evli, S., & Uygun, D. A. (2019). Enzymatic Activity of Urokinase Immobilized onto Cu²⁺-Chelated Cibacron Blue F3GA-Derived Poly (HEMA) Magnetic Nanoparticles. *Applied biochemistry and biotechnology*, 188(1), 194-207. doi: 10.1007/s12010-018-2923-z
- Fan, L., Li, X., & Kan, X. (2016). Disposable graphite paper based sensor for sensitive simultaneous determination of hydroquinone and catechol. *Electrochimica Acta*, 213, 504-511. doi: 10.1016/j.electacta.2016.06.096
- Ferapontova, E. E. (2017). Electrochemical Analysis of Dopamine: Perspectives of Specific In Vivo Detection. *Electrochimica Acta*, 245, 664–671. doi: 10.1016/j.electacta.2017.05.183
- Ferrari, M. (2007). *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology: Volume IV: Biomolecular Sensing, Processing and Analysis* (Vol. 4). Springer Science & Business Media. doi: doi.org/10.1007/b136241
- Ferry, Y., & Leech, D. (2005). Amperometric detection of catecholamine neurotransmitters using electrocatalytic substrate recycling at a laccase electrode. *Electroanalysis*, 17(2), 113–119. doi: 10.1002/elan.200403069
- Freire, R. S., Duran, N., & Kubota, L. T. (2002). Development of a laccase-based flow injection electrochemical biosensor for the determination of phenolic compounds and its application for monitoring remediation of Kraft E1 paper mill effluent. *Analytica Chimica Acta*, 463(2), 229-238. doi: 10.1016/S0003-2670(02)00417-8
- Fu, C., Sun, Y., Huang, C., Wang, F., Li, N., Zhang, L., Ge, S., & Yu, J. (2021). Ultrasensitive sandwich-like electrochemical biosensor based on core-shell Pt@CeO₂ as signal tags and double molecular recognition for cerebral dopamine detection. *Talanta*, 223, 121719. doi: 10.1016/j.talanta.2020.121719
- Fu, J., Li, D., Li, G., Huang, F., & Wei, Q. (2015). Carboxymethyl cellulose assisted immobilization of silver nanoparticles onto cellulose nanofibers for the detection of catechol. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 738, 92-99. doi: 10.1016/j.jelechem.2014.11.025

- Gamella, M., Campuzano, S., Reviejo, A. J., & Pingarrón, J. M. (2006). Electrochemical estimation of the polyphenol index in wines using a laccase biosensor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 7960-7967. doi:10.1021/jf061451r
- García, M., Batalla, P., & Escarpa, A. (2014). Metallic and polymeric nanowires for electrochemical sensing and biosensing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 57, 6–22. doi:10.1016/j.trac.2014.01.004
- Ghindilis, A.L., Atanasov, P., Wilkins, M., Wilkins, E., (1998). Immunosensors: electrochemical sensing and other engineering approaches. *Biosens. Bioelectron.* 13, 113–131. doi:10.1016/S0956-5663(97)00031-6
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., & Sannia, G. (2010). Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(3), 369-385. doi: 10.1007/s00018-009-0169-1
- Gomes, A., Mattos, G. J., Coldibeli, B., Dekker, R. F. H., Barbosa Dekker, A. M., & Sartori, E. R. (2020). Covalent attachment of laccase to carboxymethyl-botryosphaeran in aqueous solution for the construction of a voltammetric biosensor to quantify quercetin. *Bioelectrochemistry*, 135, 107543. doi:10.1016/j.bioelechem.2020.107543
- Gomes, S. A. S. S., Nogueira, J. M. F., & Rebelo, M. J. F. (2004). An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(6), 1211-1216. doi: doi.org/10.1016/j.bios.2004.05.013
- González-Domínguez, E., Comesaña-Hermo, M., Mariño-Fernández, R., Rodríguez-González, B., Arenal, R., Salgueiriño, V., Moldes, D., Othman, A. M., Pérez-Lorenzo, M., & Correa-Duarte, M. A. (2016). Hierarchical Nanoplatfoms for High-Performance Enzyme Biocatalysis under Denaturing Conditions. *ChemCatChem*, 8(7), 1264–1268. doi:10.1002/cctc.201501401
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. *Sensors*, 8(3), 1400-1458. doi: 10.3390/s80314000

- Griffiths, D., & Hall, G. (1993). Biosensors - what real progress is being made?. *Trends in Biotechnology*, 11(4), 122-130. doi: 10.1016/0167-7799(93)90086-O
- Gualandi, I., Ferraro, L., Matteucci, P., & Tonelli, D. (2015). Assessment of the Antioxidant Capacity of Standard Compounds and Fruit Juices by a Newly Developed Electrochemical Method: Comparative Study with Results from Other Analytical Methods. *Electroanalysis*, 27(8), 1906–1914. doi:10.1002/elan.201500076
- Guilbault, G. G., & Montalvo Jr, J. G. (1969). Urea-specific enzyme electrode. *Journal of the American Chemical Society*, 91(8), 2164-2165. doi: 10.1021/ja01036a083
- Guo, M., Wang, H., Huang, D., Han, Z., Li, Q., Wang, X., & Chen, J. (2014). Amperometric catechol biosensor based on laccase immobilized on nitrogen-doped ordered mesoporous carbon (N-OMC)/PVA matrix. *Science and Technology of Advanced Materials*. doi: 10.1088/1468-6996/15/3/035005
- György, I., Lewenstam A., Fritz, S., (2013). Handbook of Reference Electrodes. Springer (5). doi: 10.1007/978-3-642-36188-3
- Hao, J., Song, G., Liu, T., Yi, X., Yang, K., Cheng, L., Liu, Z. (2017). In Vivo Long-Term Biodistribution, Excretion, and Toxicology of PEGylated Transition-Metal Dichalcogenides MS 2 (M = Mo, W, Ti) Nanosheets. *Advanced Science*, 4, 1600160. doi: 10.1002/advs.201600160
- Hashem, M., Saion, E., Al-Hada, N. M., Kamari, H. M., Shaari, A. H., Talib, Z. A., ... & Kamarudeen, M. A. (2016). Fabrication and characterization of semiconductor nickel oxide (NiO) nanoparticles manufactured using a facile thermal treatment. *Results in physics*, 6, 1024-1030. doi: 10.1016/j.rinp.2016.11.031
- Hernández-Vélez, M. (2006). Nanowires and 1D arrays fabrication: An overview. *Thin solid films*, 495(1-2), 51-63. doi: 10.1016/j.tsf.2005.08.331
- Hidayat, M. A., Maharani, D. A., Purwanto, D. A., Kuswandi, B., & Yuwono, M. (2020). Simple and sensitive paper-based colorimetric biosensor for determining total polyphenol content of the green tea beverages. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 25(2), 255-263. doi: 10.1007/s12257-019-0299-8.

<https://www.metrohm.com/en/products/electrochemistry/electrochemistry-electrodes/>,

[Erişim Tarihi: 16/02/2022].

<https://www.nano.gov>, [Erişim tarihi: 19/02/2022].

Hua, Z., Qin, Q., Bai, X., Wang, C., & Huang, X. (2015). β -Cyclodextrin inclusion complex as the immobilization matrix for laccase in the fabrication of a biosensor for dopamine determination. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 220, 1169-1177. doi: 10.1016/j.snb.2015.06.108

Huffman, M. L., & Venton, B. J. (2008). Electrochemical Properties of Different Carbon-Fiber Microelectrodes Using Fast-Scan Cyclic Voltammetry. *Electroanalysis*, 20(22), 2422–2428. doi: 10.1002/elan.200804343

Hummers, W.S., Offeman, R.E., (1958). Preparation of Graphitic Oxide. *J. Am. Chem. Soc.* 80, 1339–1339. doi: 10.1021/ja01539a017

Hussain, M., Wackerlig, J., & Lieberzeit, P. (2013). Biomimetic Strategies for Sensing Biological Species. *Biosensors*, 3(1), 89–107. doi:10.3390/bios3010089

Jarosz-Wilkolażka, A., Ruzgas, T., & Gorton, L. (2004). Use of laccase-modified electrode for amperometric detection of plant flavonoids. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2-3), 238-241. doi: 10.1016/j.enzmictec.2004.04.016

Josypčuk, O., Barek, J., & Josypčuk, B. (2018). Amperometric determination of catecholamines by enzymatic biosensors in flow systems. *Electroanalysis*, 30(6), 1163-1171. doi: 10.1002/elan.201800078

Kamin, R. A., & Wilson, G. S. (1980). Rotating ring-disk enzyme electrode for biocatalysis kinetic studies and characterization of the immobilized enzyme layer. *Analytical Chemistry*, 52(8), 1198-1205. doi: 10.1021/ac50058a010

Karami, C., & Taher, M. A. (2019). A catechol biosensor based on immobilizing laccase to Fe₃O₄@ Au core-shell nanoparticles. *International journal of biological macromolecules*, 129, 84-90. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.015

- Karunakaran, C., Rajkumar, R., & Bhargava, K. (2015). Introduction to biosensors. In *Biosensors and bioelectronics* (pp. 1-68). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-803100-1.00001-3
- Kazemi-Darsanaki, R., Azizzadeh, A., Nourbakhsh, M., Raeisi, G., & AzizollahiAliabadi, M. (2013). Biosensors: functions and applications. *Journal of Biology and Today's World*, 2(1), 53-61. doi:10.15412/J.JBTW. 01020105
- Kerman, K., Saito, M., Tamiya, E., Yamamura, S., & Takamura, Y. (2008). Nanomaterial-based electrochemical biosensors for medical applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(7), 585-592. doi: 10.1016/j.trac.2008.05.004
- Kirchner, P., Oberländer, J., Friedrich, P., Berger, J., Rysstad, G., Keusgen, M., & Schöning, M. J. (2012). Realisation of a calorimetric gas sensor on polyimide foil for applications in aseptic food industry. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 170, 60-66. doi: 10.1016/j.snb.2011.01.032
- Kohori, N. A., da Silva, M. K. L., & Cesarino, I. (2018). Evaluation of graphene oxide and reduced graphene oxide in the immobilization of laccase enzyme and its application in the determination of dopamine. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 22(1), 141-148. doi: 10.1007/s10008-017-3738-5
- Kraus, C. A. (1922). The constitution of metallic substances. *Journal of the American Chemical Society*, 44(6), 1216-1239. doi: doi.org/10.1021/ja01427a006
- Krishnamoorthi, R., Anbazhagan, R., Tsai, H.-C., Wang, C.-F., & Lai, J.-Y. (2022). Biodegradable, superwetable caffeic acid/chitosan polymer coated cotton fibers for the simultaneous removal of oils, dyes, and metal ions from water. *Chemical Engineering Journal*, 427, 131920. doi: 10.1016/j.cej.2021.131920
- Kucherenko, I. S., Soldatkin, O. O., Kucherenko, D. Y., Soldatkina, O. V., & Dzyadevych, S. V. (2019). Advances in nanomaterial application in enzyme-based electrochemical biosensors: A review. *Nanoscale Advances*, 1(12), 4560-4577. doi: 10.1039/C9NA00491B

- Leboukh, S., Gouzi, H., Coradin, T., & Yahia, H. (2018). An optical catechol biosensor based on a desert truffle tyrosinase extract immobilized into a sol–gel silica layered matrix. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 86(3), 675-681. doi: 10.1007/s10971-018-4696-9
- Lee, S. K., George, S. D., Antholine, W. E., Hedman, B., Hodgson, K. O., & Solomon, E. I. (2002). Nature of the intermediate formed in the reduction of O₂ to H₂O at the trinuclear copper cluster active site in native laccase. *Journal of the American Chemical Society*, 124(21), 6180-6193. doi: 10.1021/ja0114052
- Li, B. L., Wang, J., Zou, H. L., Garaj, S., Lim, C. T., Xie, J., ... & Leong, D. T. (2016a). Low-dimensional transition metal dichalcogenide nanostructures based sensors. *Advanced Functional Materials*, 26(39), 7034-7056. doi: 10.1002/adfm.201602136
- Li, D., Ao, K., Wang, Q., Lv, P., & Wei, Q. (2016b). Preparation of Pd/bacterial cellulose hybrid nanofibers for dopamine detection. *Molecules*, 21(5), 618. doi:10.3390/molecules21050618
- Li, D., Luo, L., Pang, Z., Ding, L., Wang, Q., Ke, H., ... & Wei, Q. (2014). Novel phenolic biosensor based on a magnetic polydopamine-laccase-nickel nanoparticle loaded carbon nanofiber composite. *ACS applied materials & interfaces*, 6(7), 5144-5151. doi: 10.1021/am500375n
- Li, S.-M., Wang, Y.-S., Hsiao, S.-T., Liao, W.-H., Lin, C.-W., Yang, S.-Y., Tien, H.-W., Ma, C.-C. M., & Hu, C.-C. (2015). Fabrication of a silver nanowire-reduced graphene oxide-based electrochemical biosensor and its enhanced sensitivity in the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid. *Journal of Materials Chemistry C*, 3(36), 9444–9453. doi:10.1039/C5TC01564B
- Li, Y. Y., Kang, P., Wang, S. Q., Liu, Z. G., Li, Y. X., & Guo, Z. (2021). Ag nanoparticles anchored onto porous CuO nanobelts for the ultrasensitive electrochemical detection of dopamine in human serum. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 327, 128878. doi: 10.1016/j.snb.2020.128878

- Li, Y., Qi, H., Peng, Y., Yang, J., & Zhang, C. (2007). Electrogenated chemiluminescence aptamer-based biosensor for the determination of cocaine. *Electrochemistry Communications*, 9(10), 2571-2575. doi:10.1016/j.elecom.2007.07.038
- Li, Y., Zhang, L., Li, M., Pan, Z., Li, D., (2012). A disposable biosensor based on immobilization of laccase with silica spheres on the MWCNTs-doped screen-printed electrode. *Chem. Cent. J.* 6, 103. doi: 10.1186/1752-153X-6-103
- Li, Y.-Y., Kang, P., Wang, S.-Q., Liu, Z.-G., Li, Y.-X., & Guo, Z. (2021). Ag nanoparticles anchored onto porous CuO nanobelts for the ultrasensitive electrochemical detection of dopamine in human serum. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 327, 128878. doi: 10.1016/j.snb.2020.128878
- Li, Z., Zheng, Y., Gao, T., Liu, Z., Zhang, J., & Zhou, G. (2018). Fabrication of biosensor based on core-shell and large void structured magnetic mesoporous microspheres immobilized with laccase for dopamine detection. *Journal of Materials Science*, 53(11), 7996–8008. doi: 10.1007/s10853-018-2165-z
- Liu, A., Wang, K., Weng, S., Lei, Y., Lin, L., Chen, W., ... & Chen, Y. (2012). Development of electrochemical DNA biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 37, 101-111. doi: 10.1016/j.trac.2012.03.008
- Liu, L., Anwar, S., Ding, H., Xu, M., Yin, Q., Xiao, Y., Yang, X., Yan, M., & Bi, H. (2019). Electrochemical sensor based on F,N-doped carbon dots decorated laccase for detection of catechol. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 840, 84–92. doi: 10.1016/j.jelechem.2019.03.071
- Liu, R., Duay, J., & Lee, S. B. (2011). Heterogeneous nanostructured electrode materials for electrochemical energy storage. *Chemical Communications*, 47(5), 1384-1404. doi: 10.1039/C0CC03158E
- Liu, T., Zhao, Q., Xie, Y., Jiang, D., Chu, Z., & Jin, W. (2020). In situ fabrication of aloe-like Au-ZnO micro/nanoarrays for ultrasensitive biosensing of catechol. *Biosensors and Bioelectronics*, 156, 112145. doi: 10.1016/j.bios.2020.112145

- Liu, Y., Qu, X., Guo, H., Chen, H., Liu, B., & Dong, S. (2006). Facile preparation of amperometric laccase biosensor with multifunction based on the matrix of carbon nanotubes–chitosan composite. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(12), 2195-2201. doi: 10.1016/j.bios.2005.11.014
- Long, E., O'Brien, S., Lewis, E. A., Prestat, E., Downing, C., Cucinotta, C. S., Sanvito, S., Haigh, S. J., & Nicolosi, V. (2017). An in situ and ex situ TEM study into the oxidation of titanium (IV) sulphide. *Npj 2D Materials and Applications*, 1(1), 22. doi:10.1038/s41699-017-0024-4
- Loos, M. (2015). Chapter 1-nanoscience and nanotechnology. *Carbon Nanotube Reinforced Composites: CNR Polymer Science and Technology*, 1-36. doi:10.1016/B978-1-4557-3195-4.00001-1
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265-75
- Madhavi, V., & Lele, S. S. (2009). Laccase: properties and applications. *BioResources*, 4(4), 1694-1717
- Mahato, K., & Wang, J. (2021). Electrochemical sensors: From the bench to the skin. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 344, 130178. doi: 10.1016/j.snb.2021.130178
- Mahmoudabadi, Z. S., Rashidi, A., Tavasoli, A., Esrafil, M., Panahi, M., Askarieh, M., & Khodabakhshi, S. (2021). Ultrasonication-assisted synthesis of 2D porous MoS₂/GO nanocomposite catalysts as high-performance hydrodesulfurization catalysts of vacuum gasoil: Experimental and DFT study. *Ultrasonics Sonochemistry*, 74, 105558. doi: 10.1016/j.ultsonch.2021.105558
- Malcovati, P., Baschiroto, A., d'Amico, A., & Natale, C. (2010). Sensors and microsystems. In *AISEM 2009 Proc.*, Springer. doi: 10.1007/978-90-481-3606-3
- Maleki, N., Kashanian, S., Nazari, M., & Shahabadi, N. (2019). A novel sensitive laccase biosensor using gold nanoparticles and poly L-arginine to detect catechol in

natural water. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 66(4), 502–509.
doi:10.1002/bab.1746

Malhotra, B. D., & Chaubey, A. (2003). Biosensors for clinical diagnostics industry. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 91(1-3), 117-127. doi: 10.1016/S0925-4005(03)00075-3

Malik, P., Gupta, R., Malik, V., & Ameta, R. K. (2021). Emerging nanomaterials for improved biosensing. *Measurement: sensors*, 16, 100050. doi: 10.1016/j.measen.2021.100050

Mansoori, G. A., & Soelaiman, T. F. (2005). Nanotechnology--An introduction for the standards community. ASTM International. doi: 10.1520/JAI13110

Marques de Souza, C. G., & Peralta, R. M. (2003). Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 43(4), 278-286. doi: 10.1002/jobm.200390031

Miller, J. C., Serrato, R., Represas-Cardenas, J. M., & Kundahl, G. (2004). *The handbook of nanotechnology: Business, policy, and intellectual property law*. John Wiley & Sons.

Minoli, D. (2005). *Nanotechnology applications to telecommunications and networking*. John Wiley & Sons.

Mohammadi, S., Maeki, M., Mohamadi, R.M., Ishida, A., Tani, H., Tokeshi, M., (2015). An instrument-free, screen-printed paper microfluidic device that enables bio and chemical sensing. *Analyst*, 140, 6493–6499. doi: 10.1039/c5an00909j

Mohtar, L. G., Aranda, P., Messina, G. A., Nazareno, M. A., Pereira, S. V., Raba, J., & Bertolino, F. A. (2019). Amperometric biosensor based on laccase immobilized onto a nanostructured screen-printed electrode for determination of polyphenols in propolis. *Microchemical Journal*, 144, 13-18. doi:10.1016/j.microc.2018.08.038

- Mol, N. J. D., & Fischer, M. J. (2010). Surface plasmon resonance: a general introduction. In *Surface plasmon resonance* (pp. 1-14). Humana Press. doi: 10.1007/978-1-60761-670-2_1
- Nagy, G., Gerhardt, G. A., Oke, A. F., Rice, M. E., Adams, R. N., Szentirmay, M. N., & Martin, C. R. (1985). Ion exchange and transport of neurotransmitters in nation films on conventional and microelectrode surfaces. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 188(1–2), 85–94. doi: 10.1016/S0022-0728(85)80052-8
- National Academy of Engineering, 2007. *Memorial Tributes: Volume 11*. Washington, DC: The National Academies Press. doi: 10.17226/11912.
- Nazari, M., Kashanian, S., & Rafipour, R. (2015). Laccase immobilization on the electrode surface to design a biosensor for the detection of phenolic compound such as catechol. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 145, 130–138. doi:10.1016/j.saa.2015.01.126
- Njagi, J., Ispas, C., & Andreescu, S. (2008). Mixed ceria-based metal oxides biosensor for operation in oxygen restrictive environments. *Analytical Chemistry*, 80(19), 7266–7274. doi: 10.1021/ac800808a
- Nochit, P., Sub-udom, P., & Teepoo, S. (2021). Multiwalled carbon nanotube (MWCNT) based electrochemical paper-based analytical device (ePAD) for the determination of catechol in wastewater. *Analytical Letters*, 54(15), 2484-2497. doi: 10.1080/00032719.2021.1872591
- Novoselov, K. S., Geim, A. K., Morozov, S. V., Dubonos, S. V., Zhang, Y., & Jiang, D. (2004). Room-temperature electric field effect and carrier-type inversion in graphene films. doi: 10.48550/arXiv.cond-mat/0410631
- Pal, P., Bhattacharjee, S., Paul Das, M., Shim, Y.-B., Neppolian, B., Cho, B.J., Veluswamy, P., Das, J., (2021). Design of Electrochemically Reduced Graphene Oxide/Titanium Disulfide Nanocomposite Sensor for Selective Determination of Ascorbic Acid. *ACS Applied Nano Materielas*, 4, 10077–10089. doi: 10.1021/acsanm.1c01464

- Palanisamy, S., Ramaraj, S. K., Chen, S. M., Yang, T. C., Yi-Fan, P., Chen, T. W., ... & Selvam, S. (2017). A novel laccase biosensor based on laccase immobilized graphene-cellulose microfiber composite modified screen-printed carbon electrode for sensitive determination of catechol. *Scientific reports*, 7(1), 1-12. doi: 10.1038/srep41214
- Pandey, C. M., & Malhotra, B. D. (2019). *Biosensors: fundamentals and applications*. Walter de Gruyter GmbH & Co KG.
- Piontek, K., Antorini, M., & Choinowski, T. (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37663-37669. doi: 10.1074/jbc.M204571200
- Protti, P. (2001). Introduction to modern voltammetric and polarographic analysis techniques. *AMEL srl*, p10.
- Qi, H., & Zhang, C. (2005). Simultaneous determination of hydroquinone and catechol at a glassy carbon electrode modified with multiwall carbon nanotubes. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 17(10), 832-838. doi: 10.1002/elan.200403150
- Qu, J., Wang, Y., Guo, J., Lou, T., & Dong, Y. (2014). Determination of Catechol by a Laccase Biosensor Based on Silica-Modified Zirconia Nanoparticles. *Analytical Letters*, 47(15), 2537–2547. doi:10.1080/00032719.2014.915402
- Quan, D., & Shin, W. (2004). Amperometric detection of catechol and catecholamines by immobilized laccase from *DeniLite*. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 16(19), 1576-1582. doi: 10.1002/elan.200302988
- Rahman, M. A., & Noh, H. B. (2008). Direct electrochemistry of laccase immobilized on Au nanoparticles encapsulated-dendrimer bonded conducting polymer: application for a catechin sensor. *Analytical chemistry*, 80(21), 8020-8027. doi: 10.1021/ac801033s

- Rasooly, A., & Jacobson, J. (2006). Development of biosensors for cancer clinical testing. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(10), 1851-1858. doi: 10.1016/j.bios.2006.01.003
- Rechnitz, G. A., & Llenado, R. (1971). Enzyme electrode for amygdalin. *Analytical Chemistry*, 43(2), 283-283. doi: 10.1021/ac60297a035
- Rein, D., Lotito, S., Holt, R. R., Keen, C. L., Schmitz, H. H., & Fraga, C. G. (2000). Epicatechin in Human Plasma: In Vivo Determination and Effect of Chocolate Consumption on Plasma Oxidation Status. *The Journal of Nutrition*, 130(8), 2109S-2114S. doi: 10.1093/jn/130.8.2109S
- Ren, X., Meng, X., Chen, D., Tang, F., & Jiao, J. (2005). Using silver nanoparticle to enhance current response of biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(3), 433-437. doi: doi.org/10.1016/j.bios.2004.08.052
- Renneberg, R., Pfeiffer, D., Lisdat, F., Wilson, G., Wollenberger, U., Ligler, F., & Turner, A. P. (2007). Frieder Scheller and the short history of biosensors. In *Biosensing for the 21st Century* (pp. 1-18). Springer, Berlin, Heidelberg. doi: doi.org/10.1007/10_2007_086
- Rivera-Hoyos, C. M., Morales-Álvarez, E. D., Poutou-Piñales, R. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., Rodríguez-Vázquez, R., & Delgado-Boada, J. M. (2013). Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews*, 27(3-4), 67-82. doi: 10.1016/j.fbr.2013.07.001
- Rocha-Santos, T. A. (2014). Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 62, 28-36. doi: 10.1016/j.trac.2014.06.016
- Rodríguez-Delgado, M. M., Alemán-Nava, G. S., Rodríguez-Delgado, J. M., Dieck-Assad, G., Martínez-Chapa, S. O., Barceló, D., & Parra, R. (2015). Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 74, 21-45. doi: 10.1016/j.trac.2015.05.008
- Romero-Arcos, M., Garnica-Romo, M., & Martínez-Flores, H. E. (2016). Electrochemical study and characterization of an amperometric biosensor based on the

immobilization of laccase in a nanostructure of TiO₂ synthesized by the sol-gel method. *Materials*, 9(7), 543. doi: 10.3390/ma9070543

Ropero, A. B., Alonso-Magdalena, P., Garcia-Garcia, E., Ripoll, C., Fuentes, E., & Nadal, A. (2008). Bisphenol-A disruption of the endocrine pancreas and blood glucose homeostasis. *International journal of andrology*, 31(2), 194-200. doi: 10.1111/j.1365-2605.2007.00832.x

Rubio-Govea, R., Hickey, D. P., Garcia-Morales, R., Rodriguez-Delgado, M., Dominguez-Rovira, M. A., Minter, S. D., ... & Garcia-Garcia, A. (2020). MoS₂ nanostructured materials for electrode modification in the development of a laccase based amperometric biosensor for non-invasive dopamine detection. *Microchemical Journal*, 155, 104792. doi: 10.1016/j.microc.2020.104792

Sadeghi, S., Fooladi, E., & Malekaneh, M. (2015). A new amperometric biosensor based on Fe₃O₄/polyaniline/laccase/chitosan biocomposite-modified carbon paste electrode for determination of catechol in tea leaves. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175(3), 1603-1616. doi: 10.1007/s12010-014-1380-6

Sajanlal, P. R., Sreepasad, T. S., Samal, A. K., & Pradeep, T. (2011). Anisotropic nanomaterials: structure, growth, assembly, and functions. *Nano reviews*, 2, doi:10.3402/nano.v2i0.5883.

Sajid, M. (2021). Nanomaterials: Types, properties, synthesis, emerging materials, and toxicity concerns. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 100319. doi: 10.1016/j.coesh.2021.100319

Saleh, T. A. (2020). Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. *Environmental Technology & Innovation*, 101067. doi:10.1016/j.eti.2020.101067

Sarika, C., Shivakumar, M. S., Shivakumara, C., Krishnamurthy, G., Narasimha Murthy, B., & Lekshmi, I. C. (2017). A novel amperometric catechol biosensor based on α -Fe₂O₃ nanocrystals-modified carbon paste electrode. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 45(3), 625-634. doi: 10.3109/21691401.2016.1167702

- Saylan, Y., Akgönüllü, S., Yavuz, H., Ünal, S., Denizli, A. (2019). Molecularly Imprinted Polymer Based Sensors for Medical Applications. *Sensors* 19, 1279. doi:10.3390/s19061279
- Shalini, J., Sankaran, K. J., Dong, C. L., Lee, C. Y., Tai, N. H., & Lin, I. N. (2013). In situ detection of dopamine using nitrogen incorporated diamond nanowire electrode. *Nanoscale*, 5(3), 1159–1167. doi:10.1039/c2nr32939e
- Shen, X., Ju, F., Li, G., & Ma, L. (2020). Smartphone-Based Electrochemical Potentiostat Detection System Using PEDOT: PSS/Chitosan/Graphene Modified Screen-Printed Electrodes for Dopamine Detection. *Sensors*, 20(10), 2781. doi: 10.3390/s20102781
- Siddeeg, S. M. (2020). Electrochemical detection of neurotransmitter dopamine. *Int. J. Electrochem. Sci*, 15, 599-612. doi: 10.20964/2020.01.61
- Silva, T. R., & Vieira, I. C. (2016). A biosensor based on gold nanoparticles stabilized in poly (allylamine hydrochloride) and decorated with laccase for determination of dopamine. *Analyst*, 141(1), 216-224. doi: 10.1039/C5AN01784J
- Singh, R., Mukherjee, M. D., Sumana, G., Gupta, R. K., Sood, S., & Malhotra, B. D. (2014). Biosensors for pathogen detection: A smart approach towards clinical diagnosis. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 197, 385-404. doi.org/10.1016/j.snb.2014.03.005
- Singh, S., Jain, D. V. S., & Singla, M. L. (2013). One step electrochemical synthesis of gold-nanoparticles–polypyrrole composite for application in catechin electrochemical biosensor. *Analytical Methods*, 5(4), 1024-1032. doi: 10.1039/C2AY26201K
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press. doi: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1

- Sirim, D., Wagner, F., Wang, L., Schmid, R. D., & Pleiss, J. (2011). The Laccase Engineering Database: a classification and analysis system for laccases and related multicopper oxidases. *Database*, 2011. doi:10.1093/database/bar006
- Soldatkin, O. O., Kucherenko, I. S., Siediuko, D. V., Kucherenko, D. Y., Dzyadevych, S. V., & Soldatkin, A. P. (2021). Development of Enzyme Conductometric Biosensor for Dopamine Determination in Aqueous Samples. *Electroanalysis*, 33(10), 2187–2195. doi:10.1002/elan.202100257
- Song, D., Xia, J., Zhang, F., Bi, S., Xiang, W., Wang, Z., ... & Xia, L. (2015). Multiwall carbon nanotubes-poly (diallyldimethylammonium chloride)-graphene hybrid composite film for simultaneous determination of catechol and hydroquinone. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 206, 111-118. doi: 10.1016/j.snb.2014.08.084
- Sorrentino I, Stanzione I, Nedellec Y, Piscitelli A, Giardina P, Le Goff A. (2020). From Graphite to Laccase Biofunctionalized Few-Layer Graphene: A “One Pot” Approach Using a Chimeric Enzyme. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11):3741. doi: 10.3390/ijms21113741
- Soylemez, S., Bekmezci, S. A., Goker, S., & Toppare, L. (2019). Fabrication of a Novel Polymeric Scaffold for Amperometric Laccase Biosensor. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 57(23), 2333–2339. doi:10.1002/pola.29537
- Sundar, S., Venkatachalam, G., & Kwon, S. J. (2018). Biosynthesis of copper oxide (CuO) nanowires and their use for the electrochemical sensing of dopamine. *Nanomaterials*, 8(10), 823. doi: 10.3390/nano8100823
- Tahmasebi, E., & Yamini, Y. (2012). Facile synthesis of new nano sorbent for magnetic solid-phase extraction by self assembling of bis-(2, 4, 4-trimethyl pentyl)-dithiophosphinic acid on Fe₃O₄@ Ag core@ shell nanoparticles: Characterization and application. *Analytica Chimica Acta*, 756, 13-22. doi: 10.1016/j.aca.2012.10.040.
- Tan, C., Robbins, E. M., Wu, B., & Cui, X. T. (2021). Recent advances in in vivo neurochemical monitoring. *Micromachines*, 12(2), 208. doi: 10.3390/mi12020208

- Taniguchi, N. (1974). On the basic concept of nanotechnology. *Proceeding of the ICPE*.
- Tetyana, P., Morgan Shumbula, P., & Njengele-Tetyana, Z. (2021). Biosensors: Design, Development and Applications. İçinde *Nanopores*. IntechOpen. doi:10.5772/intechopen.97576
- Thamilselvan, A., Manivel, P., Rajagopal, V., Nesakumar, N., & Suryanarayanan, V. (2019). Improved electrocatalytic activity of Au@ Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for sensitive dopamine detection. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 180, 1-8. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.04.034
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and bioelectronics*, 16(1-2), 121-131. doi: 10.1016/S0956-5663(01)00115-4
- Thomas, F. G., & Henze, G. (2001). *Introduction to voltammetric analysis: theory and practice*. Csiro Publishing.
- Tichý, J., Erhart, J., Kittinger, E., & Privratska, J. (2010). *Fundamentals of piezoelectric sensorics: mechanical, dielectric, and thermodynamical properties of piezoelectric materials*. Springer Science & Business Media.
- Toumey, C. (2010). 35 atoms that changed the nanoworld. *Nature Nanotechnology*, 5(4), 239-241. doi: doi.org/10.1038/nnano.2010.61
- Turner, A. P. (2013). Biosensors: sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*, 42(8), 3184-3196. doi: 10.1039/C3CS35528D
- Updike, S.J., Hicks, G.P., (1967). The Enzyme Electrode. *Nature* 214, 986–988. doi: 10.1038/214986a0
- Uygun, M., Jurado-Sanchez, B., Uygun, D. A., Singh, V. V., Zhang, L., & Wang, J. (2017). Ultrasound-propelled nanowire motors enhance asparaginase enzymatic activity against cancer cells. *Nanoscale*, 9(46), 18423-18429. doi: 10.1039/C7NR07396H

- Üge, A., Zeybek, D. K., & Zeybek, B. (2018). An electrochemical sensor for sensitive detection of dopamine based on MWCNTs/CeO₂-PEDOT composite. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 813, 134-142. doi: 10.1016/j.jelechem.2018.02.028
- Vasilescu, I., Eremia, S. A., Kusko, M., Radoi, A., Vasile, E., & Radu, G. L. (2016). Molybdenum disulphide and graphene quantum dots as electrode modifiers for laccase biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 75, 232-237. doi.org/10.1016/j.bios.2015.08.051
- Verrastro, M., Cicco, N., Crispo, F., Morone, A., Dinescu, M., Dumitru, M., ... & Centonze, D. (2016). Amperometric biosensor based on Laccase immobilized onto a screen-printed electrode by Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation. *Talanta*, 154, 438-445. doi: 10.1016/j.talanta.2016.03.072
- Vlamidis, Y., Gualandi, I., & Tonelli, D. (2017). Amperometric biosensors based on reduced GO and MWCNTs composite for polyphenols detection in fruit juices. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 799, 285-292. doi: 10.1016/j.jelechem.2017.06.012
- Wang, H., Qiu, Z., Xia, W., Ming, C., Han, Y., Cao, L., Lu, J., Zhang, P., Zhang, S., Xu, H., & Sun, Y.-Y. (2019). Semimetal or Semiconductor: The Nature of High Intrinsic Electrical Conductivity in TiS₂. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 10(22), 6996–7001. doi:10.1021/acs.jpcclett.9b02710
- Wang, K., Liu, P., Ye, Y., Li, J., Zhao, W., & Huang, X. (2014). Fabrication of a novel laccase biosensor based on silica nanoparticles modified with phytic acid for sensitive detection of dopamine. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 197, 292–299. doi: 10.1016/j.snb.2014.03.002
- Wang, S., Tan, Y., Zhao, D., & Liu, G. (2008). Amperometric tyrosinase biosensor based on Fe₃O₄ nanoparticles–chitosan nanocomposite. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(12), 1781-1787. doi: 10.1016/j.bios.2008.02.014
- Wardak, C., Paczosa-Bator, B., & Malinowski, S. (2020). Application of cold plasma corona discharge in preparation of laccase-based biosensors for dopamine

determination. *Materials Science and Engineering: C*, 116, 111199. doi: 10.1016/j.msec.2020.111199

Warsinke, A., Benkert, A., & Scheller, F. W. (2000). Electrochemical immunoassays. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 366(6), 622-634. doi: 10.1007/s002160051557

Wei, M., Lu, W., Zhu, M., Zhang, R., Hu, W., Cao, X., Jia, J., & Wu, H. (2021). Highly sensitive and selective dopamine sensor uses three-dimensional cobalt phosphide nanowire array. *Journal of Materials Science*, 56(10), 6401–6410. doi: 10.1007/s10853-020-05713-0

Wu, L., Lu, X., Niu, K., & Chen, J. (2020). Tyrosinase nanocapsule based nano-biosensor for ultrasensitive and rapid detection of bisphenol A with excellent stability in different application scenarios. *Biosensors and Bioelectronics*, 165, 112407. doi: 10.1016/j.bios.2020.112407

Xiang, L., Lin, Y., Yu, P., Su, L., & Mao, L. (2007). Laccase-catalyzed oxidation and intramolecular cyclization of dopamine: A new method for selective determination of dopamine with laccase/carbon nanotube-based electrochemical biosensors. *Electrochimica Acta*, 52(12), 4144–4152. doi: 10.1016/j.electacta.2006.11.040

Xie, B., Ramanathan, K., & Danielsson, B. (1999). Principles of enzyme thermistor systems: applications to biomedical and other measurements. *Thermal Biosensors, Bioactivity, Bioaffinity*, 1-33. doi: 10.1007/3-540-49811-7_1

Xu, X., Guo, M., Lu, P., & Wang, R. (2010). Development of amperometric laccase biosensor through immobilizing enzyme in copper-containing ordered mesoporous carbon (Cu-OMC)/chitosan matrix. *Materials Science and Engineering: C*, 30(5), 722-729. doi: 10.1016/j.msec.2010.03.006

Yashas, S. R., Shivakumara, B. P., Udayashankara, T. H., & Krishna, B. M. (2018). Laccase biosensor: green technique for quantification of phenols in wastewater (a review). *Oriental Journal of Chemistry*, 34(2), 631. doi: 10.13005/ojc/340204

- Yavaşer, R. Poliakrilamid-aljinat kriyojellere lakkaz immobilizasyonu ve uygulamalarının araştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2019.
- Yogeswaran, U., & Chen, S.-M. (2008). A Review on the Electrochemical Sensors and Biosensors Composed of Nanowires as Sensing Material. *Sensors*, 8(1), 290–313. doi: 10.3390/s8010290
- Yoshida, H. (1883). Chemistry of laquer (urushi). *J. Chem. Soc.*, 43, 472-486.
- Yu, S., Wei, Q., Du, B., Wu, D., Li, H., Yan, L., Ma, H., & Zhang, Y. (2013). Label-free immunosensor for the detection of kanamycin using Ag@Fe₃O₄ nanoparticles and thionine mixed graphene sheet. *Biosensors and Bioelectronics*, 48, 224–229. doi: 10.1016/j.bios.2013.04.025
- Zhang, B., Wu, Q., Li, B., Tang, X., Ju, F., Yang, Q., ... & Zhou, Y. L. (2020b). Electrochemical Detection of Dopamine in Real Samples by an Indium Tin Oxide-Coated Glass Electrode Modified with Carbon Nanotubes. *Int. J. Electrochem. Sci*, 15, 137-148. doi: 10.20964/2020.01.27
- Zhang, Y., Li, X., Li, D., & Wei, Q. (2020a). A laccase based biosensor on AuNPs-MoS₂ modified glassy carbon electrode for catechol detection. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 186, 110683. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110683
- Zhao, P., Chen, C., Ni, M., Peng, L., Li, C., Xie, Y., & Fei, J. (2019). Electrochemical dopamine sensor based on the use of a thermosensitive polymer and an nanocomposite prepared from multiwalled carbon nanotubes and graphene oxide. *Microchimica Acta*, 186(3), 134. doi: 10.1007/s00604-019-3238-7
- Zhao, W., Wang, K., Wei, Y., Ma, Y., Liu, L., & Huang, X. (2014). Laccase Biosensor Based on Phytic Acid Modification of Nanostructured SiO₂ Surface for Sensitive Detection of Dopamine. *Langmuir*, 30(37), 11131–11137. doi:10.1021/la503104x
- Zheng, Y., Wang, D., Li, Z., Sun, X., Gao, T., & Zhou, G. (2018). Laccase biosensor fabricated on flower-shaped yolk-shell SiO₂ nanospheres for catechol

detection. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 538, 202-209. doi: 10.1016/j.colsurfa.2017.10.086

Zhou, W., Jimmy Huang, P.-J., Ding, J., Liu, J. (2014). Aptamer-based biosensors for biomedical diagnostics. *Analyst* 139, 2627. doi:10.1039/c4an00132j



T.C.

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

“KATEKOL, DOPAMİN ve (-) EPİKATEŞİN TAYİNİ İÇİN LAKKAZ TEMELLİ NANOBİYOSENSÖRLERİN HAZIRLANMASI” başlıklı doktora tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Sinem EVLİ

... / ... / ...

ÖZ GEÇMİŞ

Soyadı, Adı : Evli, Sinem

Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi(Yıl)
Doktora	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	
Y. Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	2017
Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	2015

BURSLAR ve ÖDÜLLER:

- 1) Uysal Eğitim Kültür ve Sosyal Yardımlaşma Vakfı, Lisans Bursu, 2014-2015.
- 2) Kredi ve Yurtlar Genel Müdürlüğü, Yüksek Lisans Bursu, 2015-2017.
- 3) Türkiye Yükseköğretim Kurumu, YÖK 100/2000 Öncelikli Alanlar Doktora Bursu, 2018-2022.
- 4) Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı, 2020-2023.

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

- 1) Evli, S., Orhan, H., Aktaş, P. S., Uygun, M., & Uygun, D. A. (2018). Metal-chelated cryogels for amyloglucosidase adsorption: application for continuous starch hydrolysis. *Bulletin of Materials Science*, 41(6), 140. doi: 10.1007/s12034-018-1660-9

- 2) Bayraktaroğlu, M., Orhan, H., Evli, S., Akgöl, S., Aktaş Uygun, D., & Uygun, M. (2018). Lectin attached affinity cryogels for amyloglucosidase adsorption. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 37(5), 302–317. doi: 10.1080/07328303.2018.1487972
- 3) Uygun, M., Bayraktaroğlu, M., Güven, G., Evli, S., Akpınar, F., & Aktaş Uygun, D. (2018). Environmental Applications of Immobilized Peroxidase onto Epoxy Bearing Cryogels. *European Journal of Science and Technology*, 388–392. doi: 10.31590/ejosat.490358
- 4) Orhan, H., Evli, S., Dabanca, M. B., Başbülbül, G., Uygun, M., & Uygun, D. A. (2019). Bacteria killer enzyme attached magnetic nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, 94 (September 2018), 558–564. doi:10.1016/j.msec.2018.10.003
- 5) Evli, S., & Uygun, D. A. (2019). Enzymatic Activity of Urokinase Immobilized onto Cu²⁺-Chelated Cibacron Blue F3GA-Derived Poly (HEMA) Magnetic Nanoparticles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 188(1), 194–207. doi:10.1007/s12010-018-2923-z
- 6) Akpınar, F., Evli, S., Güven, G., Bayraktaroğlu, M., Kilimci, U., Uygun, M., & Aktaş Uygun, D. (2020). Peroxidase Immobilized Cryogels for Phenolic Compounds Removal. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 190(1), 138–147. doi: 10.1007/s12010-019-03083-1
- 7) Evli, S., Karagözler, A. A., Güven, G., Orhan, H., Uygun, M., & Uygun, D. A. (2020). Heavy metal removal by N-acetylcysteine-functionalized cryogels. *Bulletin of Materials Science*, 43(1). doi: 10.1007/s12034-020-2060-5
- 8) Uygun, M., Asunción-Nadal, V. de la, Evli, S., Uygun, D. A., Jurado-Sánchez, B., & Escarpa, A. (2021). Dye removal by laccase-functionalized micromotors. *Applied Materials Today*, 23. doi: 10.1016/j.apmt.2021.101045
- 9) Evli, S., Öndeş, B., Uygun, M., & Uygun, D. A. (2021). Asparaginase immobilized, magnetically guided, and bubble-propelled micromotors. *Process Biochemistry*, 108, 103–109. doi: 10.1016/j.procbio.2021.06.009
- 10) Öndeş, B., Evli, S., Uygun, M., & Aktaş Uygun, D. (2021). Boron nitride nanosheet modified label-free electrochemical immunosensor for cancer antigen 125 detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 191(May). doi: 10.1016/j.bios.2021.11345

- 11) Kilimci, U., Evli, S., Öndeş, B., Uygun, M., & Uygun, D. A. (2021). Inulinase Immobilized Lectin Affinity Magnetic Nanoparticles for Inulin Hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(5), 1415–1426. doi: 10.1007/s12010-020-03476-7
- 12) Öndeş, B., Uygun, M., Evli, S., & Aktaş Uygun, D. (2022). Immobilization of Urokinase onto Magnetically Directed Micromotors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 0123456789. doi:10.1007/s12010-022-03878-9
- 13) Öndeş, B., Evli, S., Şahin, Y., Uygun, M., & Aktaş Uygun, D. (2022). Uricase Based Amperometric Biosensor Improved by AuNPs-TiS₂ Nanocomposites for Uric Acid Determination. *Microchemical Journal*, 107725. doi: 10.1016/j.microc.2022.107725
- 14) Uygun, M., Evli, S., Öndeş, B. Özaydın, M.S., Uygun, D.A. (2022). Uricase Modified Au/Ni/PANI Microrockets to Reduce Uric Acid Level. *Catalysis Letters*, doi:10.1007/s10562-022-04123-y

2. PROJELER

- 1) Katekol, Dopamin ve (-)-Epikateşin Tayini İçin Lakkaz Temelli Nanobiyosensörlerin Hazırlanması, FEF-20024 numaralı Doktora/Uzmanlık Tez Projesi, Araştırmacı, 2020-2022.
- 2) Ürik Asit Tayini İçin Nanokompozit Temelli Amperometrik Enzim Biyosensörlerinin Hazırlanması, FEF-21018 numaralı Araştırma Projesi, Araştırmacı, 2021-2022.
- 3) Trombolizis için Ürokinaz Enzimini Taşıyan Manyetik Nanomotorların Hazırlanması ve Uygulanması, FEF-21011 numaralı GÜdümlü Proje, Araştırmacı, 2021-Devam ediyor.
- 4) İki Boyutlu Nanomalzemelerin Kanser Teşhisinde Biyosensör Uygulamaları, FEF-19011 numaralı Araştırma Projesi, Araştırmacı, 2019-2021.
- 5) Enzimatik Fenol Giderimi için Mikromotorlar, FEF-21019 numaralı Araştırma Projesi, Araştırmacı, 2021-Devam ediyor.
- 6) Ürokinazın Saflaştırılması için Manyetik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu, FEF-17002 numaralı Araştırma Projesi, Araştırmacı, 2017-2019.
- 7) Ağır Metallerin Gideriminde Kriyojellerin Kullanımı, FEF-17008 numaralı Araştırma Projesi, Araştırmacı, 2017-2019.

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

- 1) S. Evli, N. Günay, M. Uygun & D. Aktaş Uygun, An Amperometric Biosensor Based On Modified Gold Screen Printed Electrodes For Determination of Hydrogen Peroxide, Poster Sunumu, 4th International Congress On Biosensors, 08 Temmuz 2019 - 11 Temmuz 2019.
- 2) M. Aytar, S. Evli, B. Bozdoğan & G. Başbülbul, Aydın İlinden İzole Edilmiş Termofilik Bakterilerde Selülaz Enzim Aktivitelerinin Tayini, Sözlü Sunum, 2nd International Eurasian Conference On Biological And Chemicals Sciences, 28 Haziran 2019 - 29 Haziran 2019, 1491 - 1500.
- 3) M. Uygun, S. Evli, A. A. Karagözler, G. Güven, H. Orhan & D. Aktaş Uygun, Heavy Metal Removal From Environmental And Biological Samples By Metal Chelated Cryogels, Sözlü Sunum, 1.Euroasia Biochemical Approaches & Technologies Congress, 27 Ekim 2018 - 30 Ekim 2018.

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

- 1) U. Kilimci, S. Evli, F. Akpınar, M. Uygun & D. Aktaş Uygun, Lektin Afinite Desteği Olarak Con-A Bağlı Gümüş Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Kullanımı, Poster Sunumu, 12. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi, 05 Eylül 2018 - 07 Eylül 2018.
- 2) F. Akpınar, S. Evli, G. Güven, M. Bayraktaroğlu, U. Kilimci, M. Uygun & D. Aktaş Uygun, Peroksidaz İmmobilize Kriyojel Sistemleri, Poster Sunumu, 12. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi, 05 Eylül 2018 - 07 Eylül 2018.
- 3) S. Evli & D. Aktaş Uygun, Ürokinaz Adsorpsiyonu İçin Manyetik Nanopartiküller, Poster Sunumu, 12. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi, 05 Eylül 2018 - 07 Eylül 2018.
- 4) M. Bayraktaroğlu, H. Orhan, S. Evli, D. Aktaş Uygun, S. Akgöl & M. Uygun, Amiloglukozidaz Adsorpsiyonu İçin Lektin Bağlı Afinite Kriyojeller, Poster Sunumu, 11. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi, 15 Haziran 2017 - 17 Haziran 2017.

- 5) S. Evli, H. Orhan, P. Aktaş, M. Uygun & D. Aktaş Uygun, Amiloglukozidazın Geri Dönüşümlü İmmobilizasyonu İçin Metal Şelat Afinite Kriyojellerinin Hazırlanması, Poster Sunumu, 11. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi, 15 Haziran 2017 - 17 Haziran 2017.
- 6) H. Orhan, S. Evli, M. B. Dabanca, G. Başbülbul, M. Uygun & D. Aktaş Uygun, Bakteri Öldürücü Enzim Bağlı Nanopartiküller, Poster Sunumu, 11. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi, 15 Haziran 2017 - 17 Haziran 2017.

