



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA PROGRAMI

**GRAFEN TEMELLİ ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖRLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Dursun Yaşar BAYRAMLI

Birinci Danışman: Prof. Dr. Durali MENDİL

İkinci Danışman: Prof. Dr. Filiz KURALAY

TOKAT- 2023

ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Durali MENDİL danıŐmanlıđında hazırlamıŐ olduğum “GRAFEN TEMELLİ ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ” adlı Doktora tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

25/08/2023

Dursun Yaşar BAYRAMLI

İmza

JÜRİ KABUL VE ONAY

Dursun Yaşar BAYRAMLI tarafından hazırlanan “Grafen Temelli Elektrokimyasal Biyosensörlerin Geliştirilmesi” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 25.08.2023 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı Soyadı)

İmzası

Üye (Başkan) : Prof. Dr. Bora GARİPCAN

Üye (Danışman) : Prof. Dr. Durali MENDİL

Üye : Prof. Dr. Hayati SARI

Üye : Prof. Dr. İbrahim TÜRKEKUL

Üye : Doç. Dr. Mutlu SÖNMEZ ÇELEBİ

ONAY

Doç. Dr. Yusuf TEMÜR

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım sürecinde bilgisi ve tecrübelerini paylaşarak bana katkı sunan değerli danışmanım Prof. Dr. Durali MENDİL'e, deneysel çalışmalarımında laboratuvarını, bilgisini, emeklerini, maddi manevi her türlü desteğini esirgemeyen, beni araştırma grubuna ekleyerek daha fazla araştırma yapmamı sağlayan ve bu süreçte 2. Danışmanlığımı yürüten değerli hocam Prof. Dr. Filiz KURALAY'a, yoğun çalışmalarım ve stresli dönemlerimde her zaman yanımda olan kıymetli eşim Deniz Güneş BAYRAMLI'ya ve biricik kızım Ada BAYRAMLI'ya, çalışmalarım sırasında aynı laboratuvarı paylaştığım, bana her zaman destek ve yardımcı olan arkadaşlarım Selma TUNÇ, Nilgün DÜKAR, Sultan GÜRSOY, Taner GÜRSOY, Hilmi Kaan KAYA ve Mustafa Ali GÜNGÖR'e sonsuz teşekkür ederim.

Dursun Yaşar BAYRAMLI
25.08.2023

ÖZET

GRAFEN TEMELLİ ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Bayramlı, Dursun Yaşar
Doktora Tezi, Kimya Ana Bilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Durali Mendil
İkinci Danışman: Prof. Dr. Filiz Kuralay
Ağustos 2023, xv + 79 sayfa

Bu tez çalışması kapsamında, glikoz ve ürenin amperometrik tayini amacıyla enzim/elektroaktif polimer/grafen/tungsten disülfür (WS_2) modifiye nanokompozit yüzeye sahip kalem grafit elektrotlar (PGE'ler) hazırlandı. Glikoz oksidaz (GOx) ve üreaz (Urs) enzimlerini elektrot yüzeyine kararlı ve verimli bir şekilde bağlamak amacıyla orto-fenilendiamin (oPD), pirol (Py) ve grafen kullanıldı. Optimum koşullarda üretilen PPy-grafen/ WS_2 nanokompozit yüzeye enzim immobilizasyonunun kararlı bir şekilde yapılabilmesi için glutaraldehit (GA) yardımıyla çapraz bağlayıcı kullanıldı. Bu şekilde üretilen GOx/PPy-grafen/ WS_2 modifiye ve Urs/PPy-grafen/ WS_2 modifiye enzim elektrotlar sırasıyla duyarlı ve seçici amperometrik glikoz ve üre biyosensörleri olarak kullanıldı. Elektrotların elektrokimyasal davranışları dönüşümlü voltametri (CV) ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ile belirlendi. Elektrotların morfolojik ve yüzey karakterizasyonları ise taramalı elektron mikroskopisi (SEM), enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) ve X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) ile yapıldı. Enzimlerin çalışma performansına etkisi bulunan enzim konsantrasyonu, enzim immobilizasyon süresi, ortamın pH değeri ve çalışma potansiyeli gibi parametreler optimize edildi. GOx modifiye glikoz biyosensörünün çalışma aralığı 0.05 mM ile 7 mM olup, teşhis sınırı 12.3 μM olarak hesaplanırken, Urs modifiye üre biyosensörünün çalışma aralığı 0.25 mM'den 18 mM'ye kadar olup, teşhis sınırı 30.1 μM olarak hesaplandı. Girişim çalışmaları glikoz biyosensörü için askorbik asit ve üre varlığında yapılırken, üre biyosensörü için glikoz ve askorbik asit varlığında gerçekleştirildi ve türlerin cevaba önemli bir etkisinin olmadığı tespit edildi. Geri kazanım çalışmaları ise glikoz için seyreltilmiş serumda, üre için seyreltilmiş idrar örneklerinde gerçekleştirildi.

Anahtar Kelimeler: Glikoz Biyosensörü, Üre Biyosensörü, Enzim Elektrodu, Grafen, Elektroaktif Polimer.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF GRAPHENE BASED ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS

Bayramlı, Dursun Yaşar
Doctorate Thesis, Department Of Chemistry
Advisor: Prof.Dr. Durali Mendil
Second Advisor: Prof. Dr. Filiz Kuralay
August 2023, xv + 79 Pages

In this thesis, pencil graphite electrodes (PGEs) with enzyme/electroactive polymer/graphene/tungsten disulfide (WS₂) modified nanocomposite surface were prepared for the amperometric determination of glucose and urea. Orthophenylenediamine (*o*PD), pyrrole (Py) and graphene were used to stably and efficiently bind glucose oxidase (GOx) and urease (Urs) enzymes to the electrode surface. Glutaraldehyde (GA) crosslinker was used for stable enzyme immobilization to the PPy-graphene/WS₂ nanocomposite surface produced under optimum conditions. So-formed GOx/PPy-graphene/WS₂ modified and Urs/PPy-graphene/WS₂ modified enzyme electrodes were used as sensitive and selective amperometric glucose and urea biosensors, respectively. Electrochemical behavior of the electrodes was determined by cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). Morphological and surface characterizations of the electrodes were performed by scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). Parameters that affect the working performance of the enzymes such as enzyme concentration, enzyme immobilization time, pH value of the environment and working potential were optimized. The working range of the GOx modified glucose biosensor was 0.05 mM to 7 mM, with a detection limit of 12.3 μM, while the operating range of the Urs modified urea biosensor was from 0.25 mM to 18 mM, with a detection limit of 30.1 μM. Interference studies were performed in the presence of ascorbic acid and urea for the glucose biosensor, whereas for the urea biosensor, they were performed in the presence of glucose and ascorbic acid, and it was determined that the species did not have a significant effect on the amperometric current. Recovery studies were carried out in diluted serum for glucose and diluted urine samples for urea.

Keywords: Glucose Biosensor, Urea Biosensor, Enzyme Electrode, Graphene, Electroactive Polymer.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ETİK SÖZLEŞME.....	i
JÜRİ KABUL VE ONAY	ii
ÖNSÖZ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGE LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
KISALTMA ve SİMGELER LİSTESİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER / LİTERATÜR ÖZETLERİ	4
2.1. Elektrokimya	4
2.1.1. Dönüşümlü voltametri.....	5
2.1.2. Sabit gerilimde elektroliz yöntemi	6
2.1.3. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS).....	6
2.2. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM).....	7
2.3. Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX).....	8
2.4. X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)	8
2.5. Biyosensörler.....	8
2.5.1. Optik biyosensörler	9
2.5.2. Piezoelektrik biyosensörler	9
2.5.3. Kalorimetrik Biyosensörler	9
2.5.4. Elektrokimyasal biyosensörler	10
2.6. İletken Polimerler	12
2.6.1. Poli(orto-fenilendiamin) (PoPD).....	13
2.6.2. Polipirol (PPy).....	14

2.7. Karbon Bazlı Nanomalzemeler	16
2.8. Geçiş Metali Dikalkojenitler (TMDs)	17
2.9. Enzimler	17
2.9.1. Glikoz oksidaz	18
2.9.2. Üreaz	19
2.10. Enzim İmmobilizasyon Teknikleri	19
2.10.1. Tutuklama	19
2.10.2. Kovalent bağlama	20
2.10.3. Fiziksel adsorpsiyon	20
2.10.4. Çapraz bağlama	20
2.11. Glutaraldehit	20
2.12. Önceki Çalışmalar	21
2.12.1. Glikoz tayini için yapılan çalışmalar	21
2.12.2. Üre tayini için yapılan çalışmalar	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM	26
3.1. Cihazlar ve Elektrotlar	26
3.2. Kimyasallar	26
3.3. Çözeltilerin Hazırlanması	26
3.3.1. Fosfat tampon çözeltisinin hazırlanması	27
3.3.2. 5 mM ferri-ferrosiyanür $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}]$ içeren 0.1 M KCl çözeltisinin hazırlanması	27
3.3.3. oPD monomer çözeltisinin hazırlanması	27
3.3.4. Pirel monomer çözeltisinin hazırlanması	27
3.3.5. İletken polimer-grafen nanokompozit çözeltilerinin hazırlanması	27
3.3.6. İletken polimer-grafen/tungsten disülfür çözeltisinin hazırlanması	28
3.3.7. Glikoz oksidaz çözeltisinin hazırlanması	28
3.3.8. Üreaz çözeltisinin hazırlanması	28
3.3.9. Glikoz çözeltisinin hazırlanması	28
3.3.10. Üre çözeltisinin hazırlanması	28
3.3.11. Askorbik asit çözeltisinin hazırlanması	29
3.4. Yöntem	29

3.4.1.	Elektrotların kaplanması prosedüründe kullanılan elektropolimerizasyon koşulları.....	30
3.4.2.	Modifiye elektrotların hazırlanması prosedürü.....	30
3.4.3.	Modifiye elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonu.....	30
3.5.	Glikoz oksidaz ve üreaz immobilize elektrotlar için en uygun çalışma koşullarının belirlenmesi	31
3.5.1.	Enzim konsantrasyonunun etkisi.....	31
3.5.2.	Enzim immobilizasyon süresinin etkisi.....	31
3.5.3.	Enzim elektrot için tampon çözeltinin pH'sinin etkisi	32
3.5.4.	Enzim elektrot için çalışma potansiyelinin belirlenmesi.....	32
3.6.	Glikoz ve Ürenin Enzim İmmobilize Elektrotlarla Tayini	32
3.7.	Enzim Modifiye Elektrotların Seçiciliği	32
3.8.	Enzim Modifiye Elektrotların Tekrar Üretilirliği.....	33
3.9.	Enzim Modifiye Elektrotların Kararlılığı.....	33
3.10.	Enzim Modifiye Elektrotlarla Yapılan Gerçek Numune Çalışmaları.....	33
4.	BULGULAR	34
4.1.	Grafen sentezi ve karakterizasyonu	34
4.2.	PPy-grafen Modifiye Elektrotların Polimerizasyon Koşullarının Optimizasyonu ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu.....	34
4.3.	PoPD-grafen Modifiye Elektrotların Polimerizasyon Koşullarının Optimizasyonu ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu	37
4.4.	Optimum Koşullarda Hazırlanan PPy-grafen ve PoPD-grafen Modifiye Elektrotların Elektrokimyasal Davranışlarının Karşılaştırılması	40
4.5.	WS ₂ 'nin PPy-grafen Yüzeye Eklenmesi	41
4.6.	Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) Metodu ile Elektrotların Karakterizasyonu	43
4.7.	PPy-grafen/WS ₂ Modifiye Elektrota GOx Enzim İmmobilizasyonu ve Çalışma Koşullarının Optimizasyonu.....	44
4.7.1.	GOx enzim konsantrasyonunun etkisi.....	44
4.7.2.	GOx enzim immobilizasyon süresinin etkisi	45
4.7.3.	GOx immobilize elektrota tampon çözeltinin pH'sinin etkisi	46
4.7.4.	GOx immobilize elektrota potansiyelin etkisi.....	47

4.8. PPy-grafen/WS ₂ Modifiye Elektrota Urs Enzim İmmobilizasyonu ve Çalışma Koşullarının Optimizasyonu.....	48
4.8.1. Urs enzim konsantrasyonunun etkisi.....	48
4.8.2. Urs enzim immobilizasyon süresinin etkisi	49
4.8.3. Urs immobilize elektrota tampon çözeltinin pH'sinin etkisi	50
4.8.4. Urs immobilize elektrota potansiyelin etkisi.....	51
4.9. Modifiye Elektrotların Yüzey Karakterizasyonu	52
4.9.1. Modifiye elektrot yüzeylerinin taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile karakterizasyonu.....	52
4.9.2. Modifiye elektrot yüzeylerinin enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) ile karakterizasyonu.....	54
4.9.3. Elektrot yüzeylerinin X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) ile karakterizasyonu.....	56
4.10. Glikoz Tayini İçin Yapılan Amperometrik Çalışmalar.....	57
4.10.1. Glukoz konsantrasyonunun biyosensör yanıtına etkisi	57
4.10.2. GOx/PPy-grafen/WS ₂ modifiye elektrotun seçiciliği	58
4.10.3. GOx/PPy-grafen/WS ₂ modifiye elektrotun tekrar üretilebilirliği	59
4.10.4. GOx/PPy-grafen/WS ₂ modifiye elektrotun kararlılığı	60
4.10.5. GOx/PPy-grafen/WS ₂ modifiye elektrotla gerçek numune analizi.....	60
4.11. Üre Tayini İçin Yapılan Amperometrik Çalışmalar	61
4.11.1. Üre konsantrasyonunun biyosensör yanıtına etkisi.....	61
4.11.2. Urs/PPy-grafen/WS ₂ modifiye elektrotun seçiciliği	63
4.11.3. Urs/PPy-grafen/WS ₂ modifiye elektrotun tekrar üretilebilirliği	63
4.11.4. Urs/PPy-grafen/WS ₂ modifiye elektrotun kararlılığı	64
4.11.5. Urs/PPy-grafen/WS ₂ Modifiye Elektrotla Gerçek Numune Analizi	65
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	66
6. KAYNAKLAR	67

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Bazı iletken polimerler ve yapısal gösterimleri (Namsheer ve Rout, 2021; Jadoun ve ark., 2021)	13
Çizelge 4.1. GOx modifiye çeşitli glikoz biyosensörlerinin analitik performanslarının karşılaştırılması	58
Çizelge 4.2. GOx/PPy-grafen/WS ₂ bazlı biyosensör kullanılarak seyreltilmiş serum örneklerinde glikoz tayini (n=3).....	61
Çizelge 4.3. Urs modifiye çeşitli üre biyosensörlerinin analitik performanslarının karşılaştırılması	62
Çizelge 4.4. Urs/PPy-grafen/WS ₂ bazlı biyosensör kullanılarak seyreltilmiş idrar örneklerinde üre tayini (n=3)	65

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 2. 1. Tipik bir dönüşümlü voltamogram	5
Şekil 2. 2. Sabit gerilimde elektrolizde akımın zamanla değişimi.....	6
Şekil 2. 3. Modifiye edilmemiş PGE'nin elektrokimyasal empedans spektrumu	7
Şekil 2. 4. oPD monomerine ait elektrokimyasal polimerleşme mekanizması (Muthirulan ve ark. 2013)	14
Şekil 2. 5. Pirel monomerinin elektrokimyasal polimerleşme mekanizması (Özdemir ve ark. 2020)	15
Şekil 3. 1. PPy-grafen/WS ₂ @PGE modifiye PGE'ler ile glikoz ve üre tayinine yönelik gerçekleştirilen deneysel prosedürün şematik gösterimi.....	29
Şekil 4. 1. Sentezlenen grafen ve ticari satın alınan grafen ile hazırlanan PGE'lere ait elektrokimyasal davranışların 5 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks türlerini içeren elektrolit içerisinde karşılaştırılması (n=3).....	34
Şekil 4. 2. Dönüşümlü voltametri ile hazırlanmış hazırlanmış PPy-grafen modifiye elektrotlar için döngü sayıları değişiminin 5 mM [Fe(CN) ₆ ^{3-/4-}] içeren 0.1 M KCl çözeltisi içerisinde etkisini gösteren bar diyagramları.	35
Şekil 4. 3. Dönüşümlü voltametri ile hazırlanmış PPy-grafen modifiye elektrotlar için grafen konsantrasyonu değişiminin 5 mM [Fe(CN) ₆ ^{3-/4-}] içeren 0.1 M KCl çözeltisi içerisinde etkisini gösteren bar diyagramları.....	36
Şekil 4. 4. Dönüşümlü voltametri ile hazırlanmış PPy-grafen modifiye elektrotlar için pirol konsantrasyonu değişiminin 5 mM [Fe(CN) ₆ ^{3-/4-}] içeren 0.1 M KCl çözeltisi içerisinde etkisini gösteren bar diyagramları.....	37
Şekil 4. 5. Sabit gerilimde elektroliz ile hazırlanmış PoPD-grafen modifiye elektrot için elektropolimerizasyon süresi değişiminin 5 mM [Fe(CN) ₆ ^{3-/4-}] içeren 0.1 M KCl çözeltisi içerisinde etkisini gösteren bar diyagramları.	38
Şekil 4. 6. Sabit gerilimde elektroliz ile hazırlanmış PoPD-grafen modifiye elektrot için grafen konsantrasyonu değişiminin 5 mM [Fe(CN) ₆ ^{3-/4-}] içeren 0.1 M KCl çözeltisi içerisinde etkisini gösteren bar diyagramları.....	39
Şekil 4. 7. Sabit gerilimde elektroliz ile hazırlanmış PoPD-grafen modifiye elektrot için oPD konsantrasyonu değişiminin 5 mM [Fe(CN) ₆ ^{3-/4-}] içeren 0.1 M KCl çözeltisi içerisinde etkisini gösteren bar diyagramları.....	40
Şekil 4. 8. Optimum koşullarda hazırlanmış PPy-grafen modifiye PGE (siyah) ile PoPD-grafen modifiye PGE'nin 5 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks türlerini içeren elektrolit içerisindeki elektrokimyasal davranışlarının karşılaştırılması (İç çizelge: Modifiye elektrotlara ait en büyük ve en küçük pik akım değerleri (□A) ve indirgenme-yükseltgenme potansiyelleri (V))	41
Şekil 4. 9. Dönüşümlü voltametri ile hazırlanmış PPy-grafen/WS ₂ modifiye elektrotlar için WS ₂ konsantrasyonu değişiminin 5 mM [Fe(CN) ₆ ^{3-/4-}] içeren 0.1 M KCl çözeltisi içerisinde etkisini gösteren bar diyagramları.....	42

Şekil 4. 10. PPy-grafen/WS ₂ modifiye elektrotun (yeşil), PPy-grafen modifiye elektrotun (mavi), PPy modifiye elektrotun (kırmızı) ve çıplak elektrotun (siyah) CV'lerinin 5 mM [Fe(CN) ₆ ^{3-/4-}] içeren 0.1 M KCl çözeltisi içerisindeki elektrokimyasal davranışlarının karşılaştırılması	42
Şekil 4. 11. PPy-grafen/WS ₂ modifiye elektrota ait tekrarlanabilirliği gösteren bar grafikleri.....	43
Şekil 4. 12. (A) Elektrotların EIS spektrumlarının ve (B) R _{ct} değerlerinin 5 mM [Fe(CN) ₆ ^{3-/4-}] içeren 0.1 M KCl çözeltisi içerisindeki karşılaştırılması (n=3)	44
Şekil 4. 13. GOx enzim konsantrasyonunun PPy-grafen/WS ₂ modifiye elektrotun analitik performansına olan etkisi (0.1 M fosfat tamponu içerisinde).....	45
Şekil 4. 14. GOx enzim immobilizasyon süresinin PPy-grafen/WS ₂ modifiye elektrotun analitik performansına olan etkisi (0.1 M fosfat tamponu içerisinde)	46
Şekil 4. 15. Farklı pH'taki tampon çözeltilerin GOx/PPy-grafen/WS ₂ modifiye elektrotun analitik performansına olan etkisi	47
Şekil 4. 16. Uygulanan potansiyelin GOx immobilize edilmiş PPy-grafen/WS ₂ modifiye elektrotun analitik performansına olan etkisi (0.1 M fosfat tamponu içerisinde)	48
Şekil 4. 17. Urs enzim konsantrasyonunun PPy-grafen/WS ₂ modifiye elektrotun analitik performansına olan etkisi (0.1 M fosfat tamponu içerisinde).....	49
Şekil 4. 18. Urs enzim immobilizasyon süresinin PPy-grafen/WS ₂ modifiye elektrotun analitik performansına olan etkisi (0.1 M fosfat tamponu içerisinde)	50
Şekil 4. 19. Farklı pH'taki tampon çözeltilerin Urs/PPy-grafen/WS ₂ modifiye elektrotun analitik performansına olan etkisi	51
Şekil 4. 20. Uygulanan potansiyelin Urs immobilize edilmiş PPy-grafen/WS ₂ modifiye elektrotun analitik performansına olan etkisi (0.1 M fosfat tamponu içerisinde)	52
Şekil 4. 21. (a,b) PPy modifiye, (c,d) PPy-grafen modifiye, (e,f) PPy-grafen/WS ₂ modifiye, (g,h) GOx/PPy-grafen/WS ₂ modifiye, (i,j) Urs/PPy-grafen/WS ₂ modifiye elektrotlara ait SEM görüntüleri.....	53
Şekil 4. 22. PPy modifiye (A), PPy-grafen modifiye (B), PPy-grafen/WS ₂ modifiye (C), GOx/PPy-grafen/WS ₂ modifiye (D) ve Urs/PPy-grafen/WS ₂ modifiye (E) elektrotlara ait EDX spektrumu ve temel haritalama.....	55
Şekil 4. 23. A) PPy-grafen@PGE ve B) PPy-grafen/WS ₂ @PGE'nin XPS spektrumları	56
Şekil 4. 24. A) Ardışık glikoz ilavesi sonrası GOx/PPy-grafen/WS ₂ modifiye elektrotun fosfat tamponundaki (pH 7.4) amperometrik yanıt eğrisi, B) Glikoz biyosensörünün kalibrasyon grafiği (Hata çubukları, 3 sıralı deneyden elde edilen standart sapmaları göstermektedir)	57
Şekil 4. 25. Girişim yapan türlerin glikoz tespiti için amperometrik akımlarını gösteren çubuk diyagramlar (n=3)	59
Şekil 4. 26. Glikoz ilavesi (1 mM) için GOx/PPy-grafen/WS ₂ modifiye elektrotun tekrarlanabilirliği (n=3).....	59

Şekil 4. 27. GOx/PPy-grafen/WS ₂ modifiye elektrotun kararlılığı (n=3).....	60
Şekil 4. 28. Ardışık üre ilavesi sonrası Urs/PPy-grafen/WS ₂ modifiye elektrotun fosfat tamponundaki (pH 7.4) amperometrik yanıt eğrisi, B) Üre biyosensörünün kalibrasyon grafiği (Hata çubukları, 3 sıralı deneyden elde edilen standart sapmaları göstermektedir).....	62
Şekil 4. 29. Girişim yapan türlerin üre tespiti için amperometrik akımlarını gösteren çubuk diyagramlar (n=3)	63
Şekil 4. 30. Üre ilavesi (4 mM) için Urs/PPy-grafen/WS ₂ modifiye elektrotun tekrarlanabilirliği (n=3).....	64
Şekil 4. 31. Urs/PPy-grafen/WS ₂ modifiye elektrotun kararlılığı (n=3).....	64



KISALTMA ve SİMGELER LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
AA	Askorbik asit
Asn	Mannoz Asparagin
CNT	Karbon nanotüp
CV	Dönüşümlü voltametri
EDS	Enerji dağılımlı x-ışını spektroskopisi
EIS	Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
ESCA	Kimyasal analiz için elektron spektroskopisi
FAD	Flavin adenin dinükleotit
GOx	Glikoz oksidaz
IR	Kızılötesi
kDa	Kilo Dalton
LOD	Teşhis sınırı
oPD	Orto-fenilendiamin
PANI	Polianilin
PEDOT	Poli(3,4-etilendioksitiyofen)
PGE	Kalem grafit elektrot
PoPD	Poli(orto-fenilendiamin)
PPy	Polipirol
PTh	Politiyofen
Py	Pirol
R _{ct}	Yük transfer direnci
RNA	Ribonükleik asit
RSD	Bağıl standart sapma
SEM	Taramalı elektron mikroskopisi
Ser	Serin
Thr	Treonin
TMDs	Geçiş metali dikalkojenitleri
Urs	Üreaz
XPS	X-ışını fotoelektron spektroskopisi

Simgeler	Açıklama
μA	Mikroamper
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
eV	Elektronvolt
Hz	Hertz
M	Molar
mg/mL	Miligram bölü mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mV/s	Milivolt bölü saniye
mV	Milivolt
nm	Nanometre
V	Volt

1. GİRİŞ

İnsan sağlığına olumsuz etkileri bulunduğu bilinen glikoz ve üre gibi maddelerin kontrol altında tutulabilmesi amacıyla basit, maliyeti düşük ve hassasiyeti yüksek analizine ihtiyaç vardır. Kan şekeri sensörlerinin geliştirilmesi, gıda endüstrisi, atık su arıtımı ve çevresel izleme gibi birçok alanda potansiyel olarak uygulamasından dolayı glikoz ölçümü büyük ilgi görmüştür (Toghill ve ark., 2010; Meng ve ark., 2009).

Karbonhidrat metabolizmasının en önemli hastalıklarından birisi şüphesiz diyabet olup, halk arasında şeker hastalığı adıyla bilinmektedir. Vücuttaki insülin üretiminin yetersizlik ya da işlev bozukluğu sonucunda Tip I türü diyabet, vücudun insüline karşı direnç göstermesi sonucu ise Tip II türü diyabet oluşmaktadır (Wang ve ark. 2008).

İnsülin eksikliği, kandaki şeker miktarının normal değerinden fazla olmasına neden olmaktadır. Bu durum yüksek kan şekeri yani hiperglisemi olarak adlandırılır ve görme bozukluğu, sinir hastalıkları, dolaşım sistemi hastalığı ve kalp yetmezliği gibi rahatsızlıklara yol açar. Kan şekerinin olması gereken seviyeden daha az olması durumu ise hipoglisemi olarak adlandırılmaktadır ve özellikle Tip I türü hastalar insülin tedavisine bağlı olarak haftada 1-2 kez hipoglisemi atağı geçirmektedirler. Bu tür ataklar sonucunda ise beyindeki sinir hücrelerinde hasar ve ölüm gerçekleşebilir. Bu nedenlerden ötürü diyabet hastalarında sık ve hızlıca kan şekeri ölçümü gerekmektedir (Comba ve ark., 2010).

Yapılan araştırmalar neticesinde, günümüzde diyabet hastalığının insanlar arasında dünya çapında en yüksek ölüm ve hastalığa yakalanma oranına sahip olduğu belirlenmiştir. 2022 yılı verilerine göre dünya genelinde yetişkinler üzerindeki diyabet yaygınlığının 537 milyon kişi olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu rakamın 2030 yılında 643 milyona, 2045 yılında ise 783 milyona ulaşacağı öngörülmektedir (Osuna ve ark., 2022).

Diabetes mellitus ölümlere neden olan bir hastalık olup bu hastalığı kronik bir hastalık haline getiren sebeplerden biri de yetersiz beslenmedir (Izadyar ve ark., 2021). Bu sebeple diabetes mellitus, günümüzde halk sağlığını ilgilendiren sorunlardan biridir ve tüm dünyada büyük ilgi görmektedir. Kan şekeri seviyesini tespit edebilmek ve kontrol altında tutabilmek için günde bir ya da birkaç kez kan şekerini ölçmek gerekir. Bu durum ise, biyolojik numunelerdeki glikoz seviyesinin tespitinin doğru bir şekilde yapılabilmesini

sağlamak amacıyla glikoz sensörleri ve biyosensörlerin geliştirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır (Baghayeri ve ark., 2017). Bu amaçla, ticari olarak temin edilebilen glikoz biyosensörleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca gıda, içecek ve ilaç endüstrilerinde glikoz ölçümü için glikoz biyosensörleri kullanılmaktadır (Minkstimiene ve ark., 2020).

Glikoz tayini için başlıca kolorimetrik yöntem, akış enjeksiyon analizi, elektrokemilüminesans ve elektrokimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Elektrokimyasal biyosensörler, hızlı yanıt vermeleri, basit uygulama, yüksek kararlılık, minyatürleştirme, yüksek seçicilik ve hassasiyet, üretim kolaylığı ve bulanık ortamlarda kullanılabilmesi nedeniyle diğer tespit yöntemlerine göre daha popülerdir (Maity ve ark., 2019; Altuntaş ve Kuralay, 2021). Günümüzde kan şekerinin ölçümü amacıyla hazırlanan ve bunun yanı sıra yaygın bir şekilde piyasada bulunan glikoz oksidaz temelli amperometrik enzim elektrotlar, üzerinde en çok çalışılan materyal haline geldi (Minkstimiene ve ark., 2020). Bir amperometrik biyosensörün yüksek duyarlılıkta ve buna bağılı hızla cevap özelliklerine sahip olabilmesi, biyobileşen ile elektrot arasındaki hızlı elektron transferi ile olabilmektedir (Habermüller ve ark., 2000).

İnsan vücudunda seviyesi kontrol edilmesi gereken bir diğer metabolit ise üredir. Üre, nitrojen metabolizmasının toksik olmayan son ürünüdür. Miktarı daha yüksek bir seviyeye ulaştığında akut veya kronik böbrek yetmezliğine, dehidratasyona, yanıklara, idrar yolu tıkanıklığına, şoka ve gastrointestinal kanamaya neden olabilir. (Bozgeyik ve ark., 2011; Dervisevic ve ark., 2017).

Günümüzde üre analizi yapabilmek amacıyla kullanılan başlıca yöntemler arasında spektroskopi, kolorimetrik deney, kromatografi ve elektrokimyasal yöntemler yer almaktadır. Fakat maliyetlerin yüksek veya analiz süresinin uzun olabilmesi veya organik çözücü kullanılması gibi nedenlerden ötürü akut üre zehirlenmesi vakalarında ya da uzak bölgelerdeki tahlillerde kullanımlar sınırlı olabilmektedir. Bu sebeplerden ötürü kolay taşınabilen, maliyeti düşük olan, hızlıca, basit ve doğru bir şekilde üre tespiti yapabilen yöntemler üzerine yapılan çalışmalara olan ilgi günden güne artmaktadır (Zhang ve Yang, 2021).

Son 20 yılda farklı numune ortamlarında üre tayini yapabilmek amacıyla polipirol, polianilin ve politiyofen gibi iletken özellikteki çeşitli polimerlerin kullanımıyla

oluşturulan elektrokimyasal biyosensörlerin geliştirildiğini görmekteyiz (Singh ve ark., 2020). Ayrıca iletken polimer kullanımının yanı sıra nanomalzemelerin protein immobilizasyonunda uygun platform sağlama, biyoaktivitelerinde bozulmama ve indirgenme-yükseltgenme merkezleri ile elektrot yüzeyi arasında kolayca elektron transferi sağlama gibi bazı özelliklerinin olması nedeniyle nano yapılı biyosensörler inşa edilmiştir (Hassan ve ark., 2018). Mükemmel elektrokimyasal ve fiziksel özelliklere sahip olan grafen ise sahip olduğu geniş yüzey alanı, termal iletkenliği, mükemmel elektron hareketliliği gibi özellikleri sayesinde elektrokimyasal algılama platformlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Literatürde sayısız grafen tabanlı enzimatik üre biyosensörü ile ilgili çalışma yer almaktadır (Srivastava ve ark., 2012; Kumar ve ark., 2015; Bahadır ve Sezgintürk, 2016; Sha ve ark., 2017).

Bu tez çalışmasında, amperometrik glikoz ve üre tayinleri için enzim/elektroaktif polimer/grafen/tungsten disülfür (WS_2)'e dayalı elektrot malzemeleri hazırlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER / LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.1. Elektrokimya

Elektrokimya, kimyasal enerjinin elektrik enerjisine çevrilmesini, maddenin elektrik enerjisi ile etkileşimi sonucu ortaya çıkan kimyasal dönüşümlerle fiziksel değişiklikleri inceleyen kimyanın alt bilim dallarından birisidir. Elektrokimyasal tepkimelerde indirgenme (redüksiyon) ve yükseltgenme (oksidasyon) olayları gerçekleşir. Genellikle karbon temelli, metal ya da yarı metal gibi iletken bir madde ile iyonik elektrolit ara yüzeyinde gerçekleşen reaksiyonları inceler.

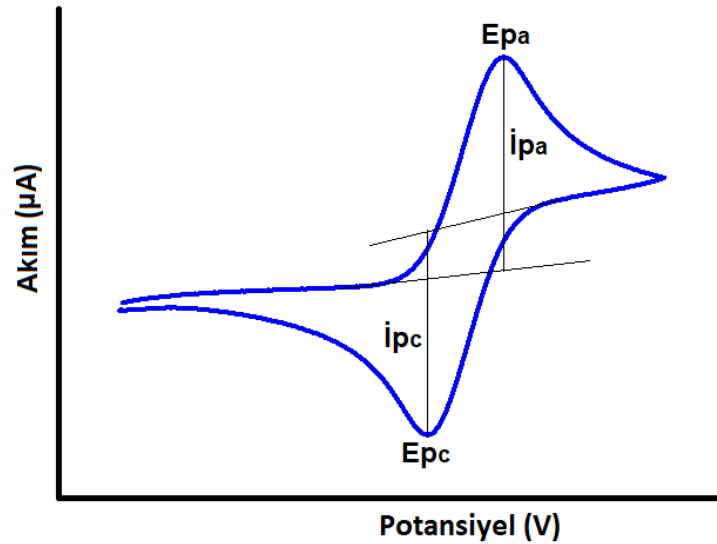
Elektrokimyasal hücre olarak bilinen ortamda elektrokimyasal olaylar yürütülür. Bu hücre, içerisinde analiti içeren bir çözeltiyle birlikte indirgenme ve yükseltgenmenin gerçekleştiği elektrotlar ve bu elektrotlar arasında bağlantıyı sağlayan bir dış devre bulundurmaktadır (Palecek ve ark., 1998). Hücre içerisinde katot olan elektrotta iyon veya molekül halindeki maddenin indirgenmesi gerçekleşirken, anot adı verilen diğer elektrotta ise elektrot ya da iyon veya molekül halindeki madde elektron vererek yükseltgenme tepkimesini gerçekleştirir. Elektrotlarda gerçekleşen tepkime sonrası dış devrede elektron geçişi oluşur. Buna bağlı olarak elektrik yükünün akışı gerçekleşir ve elektrik akımı oluşur.

Elektroanalitik yöntemlerle yapılan çalışmalardaki tayin sınırları oldukça düşük olmaktadır. Elektrokimyasal yöntemler sayesinde, ara yüzeyler arasındaki kütle aktarım hızı, yük aktarımının stokiyometrisi ve hızı, kimyasal tepkimelerin hız sabitleri ve denge sabitleri, kemisorpsiyonun ve adsorpsiyonun derecesi hakkında bilgiler edinilebilir (Skoog,1998).

Elektrokimyasal ölçümlerin genelde bir elementin farklı bir yükseltgenme basamağına özgü ve elektrokimyada kullanılan cihazların maliyetinin düşük olması elektrokimyanın en önemli avantajlardan birisidir. Ayrıca kimyasal türlerin aktiviteleri hakkında fazlaca bilgi ediniliyor olması da diğer avantajları arasında yer almaktadır (Skoog ve ark., 1996).

2.1.1. Dönüşümlü voltametri

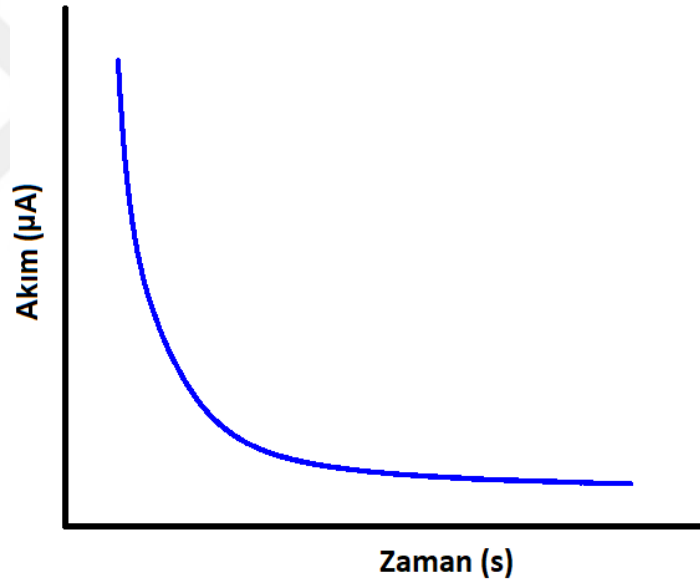
Hücre içerisine daldırılan çalışma ve karşıt elektrotlar arasında oluşan akımın ölçüldüğü metoda voltametri adı verilir. Ölçüm esnasında çalışma elektrotu ile referans elektrot arasına değeri ölçüm süresince değiştirilen bir gerilim uygulanmaktadır. Dönüşümlü voltametri (CV) yöntemi, ileri yöndeki gerilim taraması belli bir değere ulaştırıldıktan sonra doğrusal biçimde azalacak şekilde terse çevrilerek elde edilmektedir (Wang, 2006). Elektrokimyasal yöntemler içinde bu yöntem en çok tercih edilenlerden birisidir. Yönteme ait voltamogramların detaylı incelenmesi yapılarak, bir sisteme ait indirgenme ve yükseltgenmenin hangi potansiyelde gerçekleştiği, elektrot tepkimesinin çözeltide bir kimyasal tepkime içerisinde yer alıp almadığı, elektrokimyasal tersinirliğin varlığı ve tepkime sonucu elde edilen ürünlerin ne kadar kararlı oldukları hakkında sonuç elde edilebilir. Tüm bu özellikler sebebiyle dönüşümlü voltametri, çoğu elektroanalitik çalışmanın öncesinde karakterizasyon amaçlı kullanılmaktadır. Farklı çalışmalar için tam bir tek döngü veya birden çok döngü kullanılabilir. Elektropolimerizasyon çalışmaları, elektrokimyasal karakterizasyon işlemleri ve elektroanalitik sistemlerin tasarım çalışmaları dönüşümlü voltametriden en çok yararlanan alanlar olarak göze çarpmaktadır (Heinze 1984; Wang 2005). Şekil 2.1 de tez kapsamında elde ettiğimiz bir voltamogram görülmektedir.



Şekil 2. 1. Tipik bir dönüşümlü voltamogram

2.1.2. Sabit gerilimde elektroliz yöntemi

Elektroliz işlemi belirlenen uygun bir gerilimde yapıldığında, her bir tepkimenin ayrı ayrı incelenmesine olanak sağladığından elektrokimyasal mekanizmaların belirlenmesinde önem taşımaktadır. Bu sayede elektroliz hücresi içerisindeki diğer maddelere etki etmeden sadece ilgili maddenin yükseltgenmesi ya da indirgenmesi sağlanmaktadır. Bunun yanı sıra, birden çok adımda gerçekleşen bir elektrot tepkimesinde sadece istenen adım incelenebilir. Bu yöntemde de diğer yöntemlerde olduğu gibi çalışma elektrotu, karşılaştırma elektrotu ve karşıt elektrotu içeren üç elektrotlu hücre sisteminden yararlanılmaktadır. Bu elektrotlardan elektroyükseltgenmenin gerçekleştiği çalışma elektrodu anot, karşıt elektrot ise katottur (Schwartz ve Shain, 1963). Şekil 2.2 tez kapsamında elde ettiğimiz tipik bir gerilim kontrollü kulometri eğrisini göstermektedir.

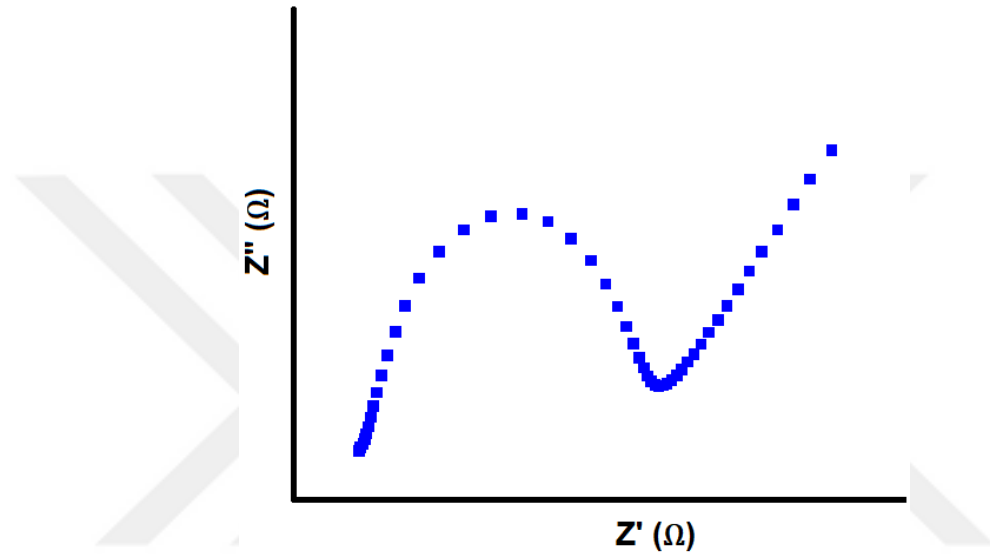


Şekil 2. 2. Sabit gerilimde elektrolizde akımın zamanla değişimi

2.1.3. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS)

Elektrokimyasal bir sisteme ait mekanik ve kinetik özellikler, elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) yöntemiyle belirlenmektedir. Bu yöntemdeki temel amaç, zaman sabitleri ile bağlantılı olarak elektrot ile çözelti ara yüzeyi arasında bilgi elde edebilmektir. Bu yöntemde de iletken malzemelere ait elektriksel özellikler, elektrot-çözelti arayüzeyleri, moleküllere ait adsorpsiyon gibi özellikler de belirlenebilmektedir (Dhillon ve Kant, 2017). Karakterizasyon yöntemi olarak kullanılan empedans

ölçümlerinin, aynı zamanda farklı amaca bağlı olarak analiz yöntemi olarak kullanımı da mevcuttur. Elektrot yüzeyine zarar vermemesi nedeniyle empedans yöntemi, biyosensörler, iletken polimerlerin karakterizasyonları, korozyon ve metal kaplama gibi çeşitli alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır (Bard ve Faulkner, 2001). Şekil 2.3’de tez kapsamındaki modifiye edilmemiş kalem grafit elektrota ait tipik bir elektrokimyasal empedans spektrumu grafiği görülmektedir.



Şekil 2. 3. Modifiye edilmemiş PGE’nin elektrokimyasal empedans spektrumu

2.2. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) yönteminde, yüksek enerjili elektron ışınlarının taranacak malzeme üzerine gönderilmesi ile yüzey görüntülenmesi gerçekleştirilmektedir. Elektron demeti bir noktaya çarptırıldıktan sonra yüzeyde bulunan enerjisi düşük elektronlar yüzeyden koparılarak emisyonları ölçülür. Elde edilen 3D görüntüler yüksek çözünürlüğe sahiptir (Çankaya ve Sökmen, 2021). Taramalı elektron mikroskopu ile analiz sürecinde iletken olmayan veya iletkenliği az olan bir numunenin yüzeyi, vakumlu bir ortamda daha iletken hale getirilmektedir. Bunun için altın veya platin gibi elementler kullanılmaktadır. İletken hale gelen numuneden bu sayede görüntü elde edilmektedir (Balci, 2020).

2.3. Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX)

Bu teknikte, incelenen numuneye ait yüzeyde yer alan bileşenlerin gerek kalitatif gerekse kantitatif tayininin yanı sıra, istenen elementler dışında numune içerisinde farklı bir elementin var olup olmadığı da belirlenmektedir. Çalışma prensibi, numuneye ait yüzeye gönderilen elektronlar aracılığı ile oluşan etkileşim sonrasında açığa çıkan X-ışınlarının ölçülmesine dayanmaktadır. Her elementin kendine özgü elektron dağılımı yapısına bağlı olarak elektron bombardımanı sonrasındaki açığa çıkan enerjisi de farklı olmaktadır. Bu karakterizasyon yönteminde ayrıca yapıda bulunan elementlerin oranı da belirlenebilmektedir (Echlin, 2011).

2.4. X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)

Bir yüzeye ait karakterizasyonda kullanılan önemli bir spektroskopik tekniktir. Bu yöntemde, incelenen elemente ait bileşik yapısının yanı sıra numunedeki atomik bileşim miktarı ve elementlerin yükseltgenme basamakları ile ilgili bilgi sahibi olunmaktadır (Masuda ve ark., 2013). XPS analizinde, yüzeyde bulunan atomların iç kabuklarına ait enerji düzeylerinde yer alan temel haldeki elektronlar uyarılmakta ve uyarılma sonucu oluşan elektronun kinetik enerjisinden yola çıkılarak bağlanma enerjisi ve spektrumlar belirlenmektedir. Her bir spektrumdaki tepe enerjisinin yardımıyla numunede hangi atomların bulunduğu tespit edilmektedir (Çabuk, 2020).

2.5. Biyosensörler

Biyosensörler, tayini yapılmak istenen analit ile spesifik şekilde etkileşimde bulunan biyolojik yapıdaki aktif tanıyıcı bölüm ile etkileşime sonrasındaki ölçülebilen sinyali dönüştüren çeviriciden oluşan, analitik ölçümlerde kullanılan aygıtlardır. Biyosensörün en önemli elementlerinden olan tanıyıcı kısmın (biyoreseptör), analiti tanıma yetisine sahip olması tayinin gerçekleşmesi için olmazsa olmaz koşullardan biridir. Etkileşim sonucu, analit konsantrasyonuna bağlı olarak biyosensörün yapısındaki sinyal çeviricinin türüne göre akımda, potansiyelde, sıcaklık değişiminde, ışık absorpsiyonunda ya da kütlede değişim sonucundaki durumlar ölçülebilir sinyallere dönüştürülür. Kullanılabilecek biyoreseptörler arasında ise enzimler, aptamerler, antikolar, bakteriler, veya nükleik asitler sayılabilir (Gerrard ve ark. 2002; Kuralay ve Demirci 2016; Wang ve ark. 2005; Cornell ve ark. 1997).

Biyosensörler çeşitli bilim dallarında kullanılabilir. Bu bilim dalları arasında kimya, biyoloji, tıp, eczacılık, fizik, gıda ve çevre gibi bilim dalları sayılabilir. Bu disiplinlerin başlangıçta biyosensör olgusuna yaklaşımı farklılıklar gösterse de, devamında ortak yaklaşımlar ortaya konulmuştur (Clark ve ark. 1973; Skotheim ve ark. 1992). Bu yaklaşımlar, tasarlanan biyosensörlerin efektif kullanımını açısından önem taşımaktadır.

Sinyal dönüştürücünün türü baz alınarak yapılan sınıflandırmaya göre optik, piezoelektrik, kalorimetrik ve elektrokimyasal olmak üzere 4 çeşit biyosensör mevcuttur. Bu gruplara arasında, elektrokimyasal biyosensörler önemli bir yere sahiptir. Ayrıca, farklı sınıflandırmaların da yapılabildiği bilinmektedir (Cornell ve ark. 1997; Turner ve ark. 1990).

2.5.1. Optik biyosensörler

Biyolojik olarak gerçekleşen bir reaksiyon sonrasında absorbe edilen ya da açığa çıkan ışığın şiddetinin ölçülmesi prensibine dayanan türdür. Bu biyosensör türü absorpsiyon, biyoluminesans ya da floresans gibi prensiplere dayanarak çalışmaktadır (Can, 2010; Tothill, 2009).

2.5.2. Piezoelektrik biyosensörler

Analit madde ile biyoaktif molekül arasındaki etkileşim sonucu oluşan kütle değişimi bu biyosensör türünün çalışma prensibini oluşturmaktadır. Bu tür biyosensör grubunda, bir piezoelektrik kristalin yüzeyinde biriken analitin kütlelerinin ölçülmesi temel alınır. Analit madde, kristal yüzeyinde biriktiğinde piezoelektrik kristale ait rezonans frekansında bir farklılaşma oluşur (Atan, 2013).

2.5.3. Kalorimetrik Biyosensörler

Bu tür bir biyosensör grubunda, genellikle enzim temelli reaksiyon sonucu açığa çıkan ısı değişiminin ölçülmesi ilkesine dayanan ölçüm mekanizması kullanılır. Entalpi değişimine bağlı olarak analit konsantrasyonu hakkında bilgi edinilen bu biyosensör çeşidi termal biyosensörler olarak da adlandırılmaktadır (Ramanathan ve Danielsson, 2001).

2.5.4. Elektrokimyasal biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler, analit madde ile seçici olarak etkileşime girip elektriksel bir sinyal üreten, protein, nükleik asit, enzim, doku ya da hücre gibi bir biyo-tanıyıcı materyal bulunduran bir sensör türüdür (Ronkainen ve ark., 2010; Turner, 2013). Elektrokimyasal biyosensörler ucuz, hızlı, hassasiyeti yüksek, tekrarlanabilir ve minimal olmaları nedeniyle oldukça tercih edilirler (Mittal ve ark. 2017). Genel olarak biyosensörlerin çeşitli avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Mesela, biyosensör tasarlanırken kullanılan biyokomponentin spesifik olması ortamda girişime neden olabilecek türlerin varlığında ön işlemsiz analizi mümkün kılmaktadır. Bunun dışında, bir biyosensöre ait cevabın hassas, doğru, tekrarlanabilir ve duyarlı olması beklenir. Belirtilen özellikler, farklı grupta yer alan biyosensörlerin kullanımlarında çeşitli olumsuz durumlar meydana getirmektedir. Optik biyosensörlerin bulanık ortamda kullanılamamaları, piezoelektrik ve termal ise kullanım alanlarının dar olması bu olumsuzluklar arasında sayılabilir. Elektrokimyasal biyosensörler ise bu olumsuzlukların daha kolay bertaraf edildiği sensör grubu olarak gösterilebilir (Thevenot ve ark., 2001). Diğer biyosensörlerde olduğu gibi elektrokimyasal biyosensörlerin de sahip olmaları gerekli temel özellikleri arasında seçicilik, yüksek duyarlılık, tekrarlanabilirlik, düşük teşhis sınırı, hızlı cevap zamanı, geniş ölçüm aralığı, ekonomik oluş ve kullanım ömrü gibi özellikler yer almaktadır (Song ve ark., 2016).

Elektrokimyasal temelli ilk biyosensör çalışmaları Leland C. Clark'a aittir. Bu çalışma Clark tarafından 1956 senesinde yayınlanmıştır (Clark, 1956). Yaptığı çalışma sonucundaki biyosensör kalp ameliyatlarında kullanılan ilk sensördür. Dr. Clark, hazırladığı biyosensör ile altın ya da platin elektrot üzerinde oksijen miktarını tayin etmiştir. Sonrasında ise Clark, glikoz oksidaz enzimi (GOx) kullanarak 1962 senesinde amperometrik enzim elektrodunu geliştirerek kanın glikoz miktarını ölçmüştür (Clark, 1962). Bu biyosensör de ticari anlamdaki ilk elektrokimyasal biyosensör özelliğini taşımaktadır (Wang, 2001).

Elektrokimyasal biyosensörler, tekrar kullanılabilen elektrot substratlarında hazırlanabileceği gibi tek kullanımlık olarak da hazırlanabilmektedirler. Bu tek kullanımlık elektrotlar da maliyetlerinin düşük olması nedeniyle dikkat çekmektedir.

Ayrıca, elektrokimyasal sensörlerin küçük ve taşınabilir olması onlara geniş bir kullanım imkânı sunmaktadır.

Sinyal çeviricinin çeşidine göre elektrokimyasal biyosensörler amperometrik, potansiyometrik, iletkenlik ve impedimetrik biyosensörler olmak üzere 4 farklı gruba ayrılabilir.

2.5.4.1. Amperometrik biyosensörler

Sıklıkla tercih edilen bu biyosensör çeşidinde biyoreseptör ile analit arasındaki etkileşime dayalı olarak çalışma elektrotunda oluşan ve analit konsantrasyonuna göre artış gösteren akım ya da akım değişimi ölçülür (Luppa ve ark., 2001). Akım sisteme uygulanan sabit potansiyel sonrasında oluşur. Amperometrik biyosensörler, enzimatik olan ve olmayan olmak üzere ikiye ayrılır. Tez çalışmasında kullanılan analitlerin amperometrik tayininin enzim kullanılmadan da yapıldığı sistemler mevcuttur. Örneğin, enzimatik olmayan amperometrik glikoz biyosensörleri, glikozun doğrudan yükseltgenmesine dayanmakta olup en büyük avantajı enzimatik olanlarda görülen enzim kararlılığının uzun süre korunması gerekliliğinin burada olmamasıdır. Dezavantajları arasında ise bu yöntemde kullanılan elektrokatalitik malzemelerin, glikozun yükseltgenmesini katalizleyen enzimler kadar karakteristik bir yapıda olmamasıdır. Bu durum, enzimatik glikoz biyosensörlerinin enzimatik olmayanlara göre daha yüksek seçiciliğe sahip olmasını sağlamaktadır (Chen ve ark. 2013).

2.5.4.2. Potansiyometrik biyosensörler

Potansiyometri, elektrokimyasal hücrede oluşan gerilim değerlerinin bir çalışma elektrodu ve referans elektrot kullanılarak ölçüldüğü yöntemdir (Özbek ve Isildak, 2021). Konsantrasyonu değişen numune çözeltisinde potansiyelde bir değişim meydana gelir ve ölçümü gerçekleştirilir (Topcu, 2009).

2.5.4.3. İletkenlik biyosensörleri

Bu biyosensör çeşidinde etkileşim sonucunda elektriksel iletkenlikte değişim meydana gelmektedir (Kuralay ve Demirci, 2016; Mello ve Kubota, 2002).

2.5.4.4. İmpedimetrik biyosensörler

Bu biyosensör grubunda empedansta meydana gelen değişimler ele alınır ve frekans düzleminde birtakım elektriksel bilgiler elde edilir; elektrot ile çözelti ara yüzeyinde elektron aktarımına bağlı oluşan direnç ölçülür (Khan ve ark. 2009).

Elektrokimyasal biyosensörler günümüzde birçok alanda yer bulmuştur. Elektrot modifikasyonlarının da yardımıyla daha hassas, seçici ve pratik hale getirilen bu biyosensörler yoğun ilgi uyandırmaktadır. Elektrot modifikasyonlarında; nano yapıları malzemeler, birim hacimde yüksek yüzey alanına sahip olmaları nedeniyle elektroaktif yüzey alanını arttırmaktadırlar. Buna ilaveten, yüzeydeki iletkenliği ve buna bağlı elektron transfer hızını arttırmaları sonucu bu malzemelere olan ilgi de artmaktadır.

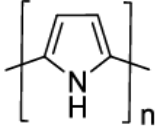
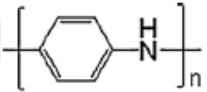
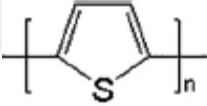
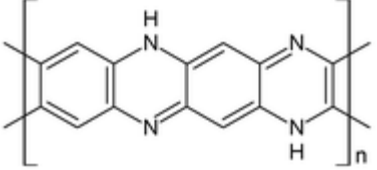
2.6. İletken Polimerler

İletkenler polimerler, iletkenliği oldukça iyi olan ve polimerin gövdesi boyunca konjugasyona sahip ikili bağlar bulduran polimerlerdir. Bu tür polimerlerin iletkenlikleri metallerle yarı iletkenler arasında olup çoğunlukla π -elektron yapısına sahiptirler. Konjuge π -elektron omurları üzerinde elektronların serbest bir şekilde kolaylıkla hareket edebiliyor olması sayesinde biyomoleküllerin elektrokatalitik özellikleri gelişmektedir (Ahuja ve ark., 2007). Bu durum ise bir biyosensörün tasarımında iletken polimer kullanımına olanak sağlamaktadır. Elektrokimyasal metotlarla sentezlenebilen iletken polimerler, sadece biyosensörün hızı, duyarlılığı ve seçici olması gibi özelliklerini geliştirmekle kalmayıp aynı zamanda çalışmalarda kullanılacak olan enzimlerin de immobilize olabilmeleri için uygun bir matriks ortamı sağlamaktadır (Gerrard, 2002; Rahman ve ark., 2008).

Özellikle son zamanlarda iletken polimerlerin mevcut özelliklerini daha da iyileştirebilme amacıyla nanomalzemeler ile iletken polimerlerden oluşturulan nanokompozitler (grafen, nanopartiküller, karbon nanotüpler gibi) önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir (Luo ve ark, 2006; Xia ve ark., 2010). Bu şekilde hazırlanan nanokompozit yapılar oldukça üstün kimyasal, mekanik, optik ve termal özelliklere sahiptirler. Tüm bu özellikler nanomalzemelerin, gıda, klinik, çevre, farmasötik ve enerji depolama gibi sayısız alanda kullanımına olanak sağlamaktadır. İletken polimerlerle yaptıkları çalışmalar, 2000 senesinde A. J. Heeger, A. G. Mac Diarmid ve H. Shirakawa'ya Nobel

Kimya Ödülünü kazandırmıştır. Çizelge 2.1. de bazı iletken polimerler ve yapısal gösterimleri görülmektedir.

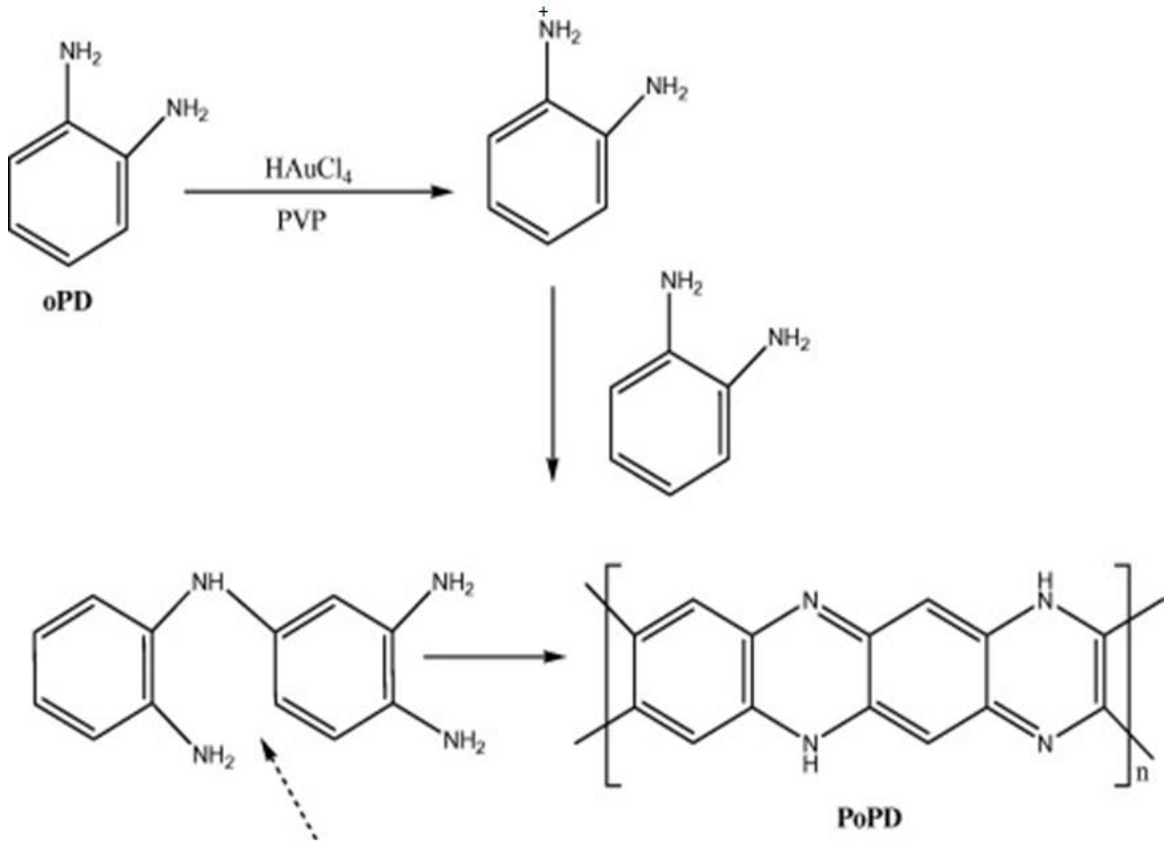
Çizelge 2.1. Bazı iletken polimerler ve yapısal gösterimleri (Namsheer ve Rout, 2021; Jadoun ve ark., 2021)

Polimerin adı	Kısa adı	Yapısal gösterimi
Polipirol	(PPy)	
Polianilin	(PANI)	
Politiyofen	(PTh)	
Poli(orto-fenilendiamin)	(PoPD)	

2.6.1. Poli(orto-fenilendiamin) (PoPD)

İletken polimer eldesinde kullanılan monomerlerden biri olan orto-fenilendiamin (*o*PD), yüzey tutucu özelliğe sahip bir monomer olup formülü $C_6H_4(NH_2)_2$ şeklindedir. Pek çok elektroaktif ve iletken polimer arasında, poli(*o*-fenilendiamin) (PoPD), teknolojinin çeşitli alanlarındaki potansiyel kullanımı nedeniyle özellikle ilgi çekicidir. PoPD'nin polipirol veya polianilin gibi olağan iletken polimerlerin özelliklerinden farklı olan iki ilginç özelliği, onu sensörlerdeki uygulamalar açısından ümit verici kılmaktadır. Bu özelliklerden biri, elektrik iletkenliğinin bu polimerin redoks durumuna bağımlılığıdır ve bu polimer polipirol veya polianilin aksine, indirgenmiş durumunda iletkenlik sergilerken oksitlenmiş durumu yalıtkan özellik göstermektedir. Bu özellik ise PoPD'nin elektrokimyasal özelliklerini belirler, çünkü birçok elektrot redoks işleminin, bu

polimerin indirgenmiş (iletken) formuna karşılık gelen nispeten dar bir potansiyel pencere içinde gerçekleştiği görülmektedir. PoPD film ile kaplanan bir elektrotun, polimerin geçirgenlik özelliğinden dolayı iletken olmadığı potansiyellerde bazı çözülmüş organik nötr ve inorganik iyonik türlere reaksiyon gösterebileceği bilinmektedir (Ojani ve ark. 2016). Şekil 2.5’de *o*PD monomerinin elektrokimyasal polimerleşme mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 2. 4. *o*PD monomerine ait elektrokimyasal polimerleşme mekanizması (Muthirulan ve ark. 2013)

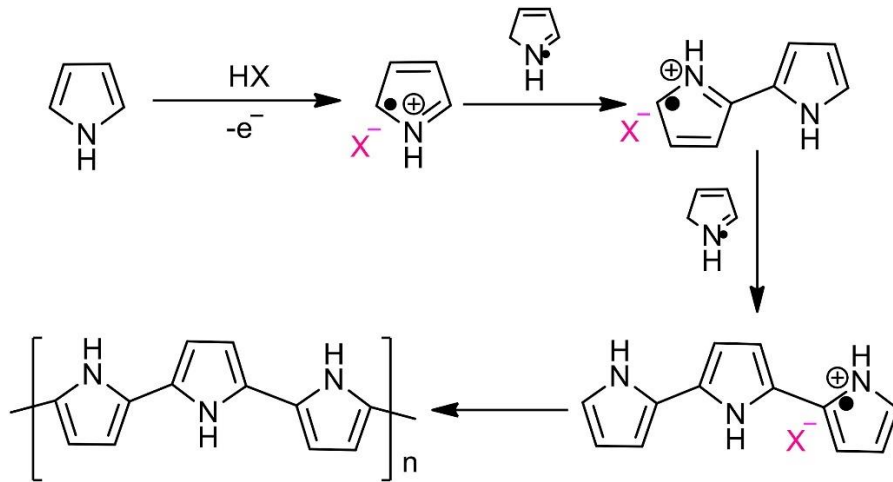
2.6.2. Polipirol (PPy)

Pirol (Py) monomerinden elektropolimerleşme ile polipirol (PPy) eldesi ilk defa 1968 senesinde Dall’Olio ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Polipirol ile kaplanmış polimerik film yüzeyler, iyi iletkenlik göstermekte, kararlı bir yapıya sahip olmakta ve kolay hazırlanabilmektedir. Ayrıca gözenekli yapıları sayesinde çoğu biyomolekül yapıya

kolay bir şekilde immobilize olmaktadır. Tüm bu özellikler biyosensör çalışmalarında PPy kullanımını sıkça tercih nedeni yapmaktadır (Ramanavičius ve ark., 2006).

PPy, yüksek elektriksel iletkenliği, nispeten basit sentezi ve çevresel koşullarda uzun süre kalıcı olmasıyla bilinen en önemli kendinden iletken polimerlerden biridir (Zarei ve ark., 2021). Dönüşümlü voltametri (CV) ile PPy elektropolimerizasyonu, pozitif yüklü bir elektrot yüzeyinde tekdüze bir PPy filmi oluşturur (Hosseinian ve ark., 2019). PPy, elektrot ve enzim arasındaki bağ oluşumunu iyileştirmek için iletken bir bağlayıcı olarak çalışır. Tekrarlanan ölçüm sırasında sinyali ve uzak sızıntı olasılığını iyileştirir (Maity ve Kumar. 2019)

PPy zincirlerinin hem molekül içerisindeki hem de moleküller arasındaki etkileşimlerinin yanı sıra, PPy zincirlerinin muhtemel çapraz bağlanması ve çözücü moleküller ile oluşturduğu zayıf etkileşimler nedeniyle PPy çözünmeyen ve bozunmayan bir yapıya sahiptir (Lee ve ark., 2000). Polipirolün sulu çözeltisi kimyasal ve elektrokimyasal metotlarla basitçe hazırlanabilmektedir (Şahin ve ark., 2004). Elektrokimyasal polimerizasyonda elektrot üzerinde oluşturulan radikalik katyon ya başka bir radikalik yapıdaki katyon ile veya monomer yapıdaki pirol ile önce birleşme, ardından da elektrofilik aromatik yer değiştirme reaksiyonlarını meydana getirmektedir. Bu tepkimede iki proton ayrılarak dimer yapıyı oluşturmaktadır (Imanishi ve ark., 1988). Şekil 2.6 pirol monomerinin elektrokimyasal olarak polimerleşme mekanizmasını göstermektedir.



Şekil 2. 5. Pirol monomerinin elektrokimyasal polimerleşme mekanizması (Özdemir ve ark. 2020)

2.7. Karbon Bazlı Nanomalzemeler

Nanoteknolojide kullanılan karbon bazlı nanomalzemelerden en çok bilinenler arasında grafen, karbon nanotüpler, nano yapılı iletken polimerler ve nanopartiküller yer almaktadır. Maddenin boyutu 100 nanometrenin altına düştüğünde bazı fiziksel özellikler değiştiği için maddenin makro hali ile mikro hali arasında farklılıklar meydana gelmektedir. Örneğin makro halde opak özelliğe sahip olan bir maddenin şeffaflaştığı ya da çözünme özelliğine sahip olmayan bir maddenin çözünebildiği bir durum oluşabilmektedir (Pérez-López ve Merkoçi 2012; Cha ve ark., 2013).

Karbon bazlı nanomalzemelerden biri olan grafen literatüre A. Geim ve K. Novoselov tarafından 2004 senesinde kazandırılmış olup 2010 yılında bu bilim insanlarına Nobel Fizik Ödülünü kazandırmıştır ve sayısız özellikleri mevcuttur. Bunlar arasında, bilinen en dayanıklı madde olması, mekanik, termal, optik ve elektriksel özellikler açısından üstünlüğü, şeffaf ve esnek bir malzeme olması yer almaktadır (Alwarappan ve ark., 2009; Bae ve ark., 2010; Zhu ve ark., 2011). Karbonun en çok bilinen allotroplarından birisi olan grafit, 1 atom kalınlığında ayrıldığında grafen elde edilmektedir. Grafen, çelikten 100 kat daha kuvvetli, ısıyı en iyi ileten maddeler arasındadır. Belirtilen bu özellikleri sayesinde grafen, biyosensörlerde, yakıt hücrelerinde, elektronik cihazlarda, kompozitlerde, süper kapasitörlerde, pillerde ve fotonik biliminde özellikle son birkaç yıldır bir hayli fazla ilgi odağı haline gelmiştir (Zhou ve ark., 2009; Moon ve ark., 2010; Zhu ve ark., 2011; Erdem ve ark., 2012).

İki boyutlu grafen tabakaları, oldukça üstün elektron taşıma özelliğine sahiptirler. Bunun sonucunda grafen ile modifiye edilmiş elektrotlar bir hayli fazla uygulama alanında kullanılmaktadır. Grafen, diğer malzemelerin özelliklerini de iyileştirir, bu da grafen esaslı nanokompozit yapılara güçlü özellikler kazandırır (Grosan ve ark., 2015). Grafen temelli nanomalzemeler; düşük maliyet, mükemmel elektrokatalitik aktivite, büyük ve etkin yüzey alanı, eşsiz fizikokimyasal özellikler, termal ve mekanik özellikler, iyi elektriksel iletkenlik ve yük transfer özellikleri gibi üstün özellikleri sebebiyle inşaat sektörü, otomobiller, antimikrobiyal malzemeler, rüzgâr türbinleri, pil ve akü yapımı, süperkapasitörler, güneş pilleri, uçakların iç donanımları ve kanat yapımında kullanılmaktadır (Alwarappan ve ark., 2012).

2.8. Geçiş Metali Dikalkojenitler (TMDs)

İki boyutlu (2B) nanomalzemelerden olan geçiş metali dikalkojenitlerinin genel formülü MX_2 şeklinde olup formüldeki M harfi Molibden (Mo), Tungsten (W), Titanyum (Ti), Zirkonyum (Zr) ve Hafniyum (Hf) gibi geçiş metallerini gösterirken, X harfi Kükürt (S), Selenyum (Se) ve Tellür (Te) gibi kalkojenitleri (6A grubu) göstermektedir. Geçiş metali dikalkojenitleri (TMDs) 2B özellikli malzemelere ve grafenin yarı iletken özelliğine alternatif olması amacıyla oluşturulmaktadır (Lv ve ark., 2015; Tan ve Zhang 2015). Grafen ile karşılaştırıldığında, bu metal dikalkojenitler, orta derecede elektron taşıma özellikleriyle beraber, etkili kütle taşıyıcılarına sahiptir ve katmanlı formlarına dayalı elektrokimyasal biyosensör tasarımları son yıllarda umut verici gelişmeler göstermiştir (Hsiao ve ark., 2020; Güngör ve ark., 2022; Rohaizad ve ark., 2017; Sun ve ark., 2017). Geçiş metali dikalkojenitleri arasında yer alan MoS_2 ve WS_2 , biyoyumluluk, orta düzeyde elektron taşınımı, geniş yüzey alanları ve lüminesans gibi özelliklerinden dolayı biyomedikal uygulamalarda ekstra ilgi görmektedir. WS_2 'nin teorik olarak MoS_2 'den daha iyi elektron hareketliliğine sahip olduğu da bilinmektedir (Cheng ve ark., 2014; Nguyen ve ark., 2016; Anbazhagan ve ark., 2016).

2.9. Enzimler

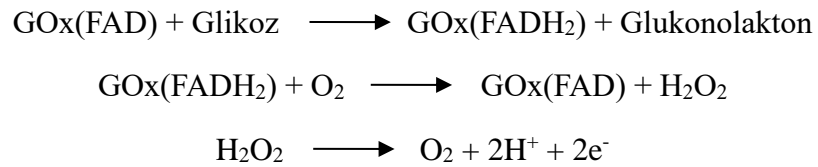
Enzimler, canlı bir organizmada gerçekleşen biyokimyasal bir reaksiyonun hızını arttıran biyolojik katalizörlerdir (Robinson, 2015). Genellikle renksiz olup, kahverengi, yeşil, sarı veya mavi renkte de olabilirler. Çözünmeleri suda ya da tampon çözeltilerde olmaktadır. Sentezlenmeleri canlılar tarafından yapılmaktadır. Hücre içerisinde organik maddelerin yapım ve yıkımı, sindirim, kasların kasılması, hücredeki solunum gibi önem arz eden fizyolojik olayların tümü enzimlerin katalitik etkisi sonucu oluşmaktadır (Lehninger, 1982, Tekman ve Öner, 1986).

Enzimler, bir tepkime esnasında aktivasyon enerjisini düşürerek, oluşan katalitik etki sonucunda substratın ürüne dönüşmesini sağlarlar. Kimyasal bir olayın başlayabilmesi için substratların aşması gereken enerjiye ise aktivasyon enerjisi denir. Enzim etkisi sonucu katalizlenen bir tepkime, katalizlenmeyen tepkimeye göre yaklaşık 10^3 - 10^8 kat daha hızlı gerçekleşmektedir. Saniyede 100 ile 1000 arasında substrat molekülü enzim molekülleri aracılığı ile ürüne dönüşmektedir.

Bir enzimin miktarı belirlenirken, aktivitesi esas alınır ve enzim ünitesi cinsinden verilir. Her ne kadar farklı türde enzim ünitesi tarifi olsa da 1 enzim ünitesi için çoğunlukla optimal şartlarda ve 25 °C’de 1 dakikada 1 mikromol substratı ürüne çeviren enzim miktarı tanımı kabul edilmektedir. Spesifik aktivite ise, 1 mg protein başına düşen enzim ünitesini göstermekte olup, enzime ait saflığı belirtmektedir (Lehninger, 1993, Bingöl, 1983). Enzimlerin önemli iki özelliğinden biri ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı spesifik olmaları, diğeri ise laboratuvar ortamında birçok basamakta ve çok uzun sürede gerçekleşen, yüksek sıcaklık, basınç veya aşırı asidik ya da bazik ortam şartı gereken tepkimelerin enzimlerin katalizlemesi ile çok kısa zamanda gerçekleşmesidir (Söyler, 2006, Lehninger, 1993, Stryer, 1981).

2.9.1. Glikoz oksidaz

Glikoz oksidaz (GOx), kovalent olmayan bir yapıya sahip olup her 80 kDa alt biriminin aktif bölgesine sıkıca bağlı bir FAD molekülü ile dimerik bir protein yapısına sahip olan bir enzimdir (Ferri ve ark., 2011). Yapısı içerisindeki her monomerinde kofaktör olarak flavin adenin dinükleotit (FAD) mevcuttur. Bir enzim molekülü içerisinde iki FAD bağlanma bölgesi vardır (Gökoğlan ve ark., 2017). GOx enzimi, glikozu hidrojen peroksit (H₂O₂) ve D-glukono-δ-laktona yükseltmektedir. Kandaki, meyvedeki ve çeşitli gıda ürünlerindeki serbest glikozu tayin etmek dışında, biyoteknolojide ve özellikle biyosensörlerde birçok uygulaması bulunmaktadır. Birinci nesil glikoz biyosensörlerinde oksijen kosubstratı kullanılarak hidrojen peroksit elde edilmiş ve tayini yapılmıştır. Burada gerçekleşen reaksiyonda GOx’ın yapısındaki FAD indirgenmektedir (FADH₂). Redükte olmuş flavin ise tekrar oksijen ile yükseltgenerek hidrojen peroksit dönüşür. Bu tepkime aşağıda gösterilmektedir (D’costa ve ark., 1986).



Yukarıdaki zincirleme reaksiyonda kullanılan oksijen ortamdan sağlandığı için sınırlıdır. Bu nedenle de geniş aralıkta glikoz tayinine imkân sağlamamaktadır. İkinci nesil glikoz biyosensörlerinde ise oksijenin yerini sentetik bir elektron alıcı almaktadır. Bu alıcı enzimin redoks merkezinde bulunan elektronları elektrotun yüzeyine aktarmaktadır.



Denklemdede yer alan M(oks) ve M(red) kullanılan medyatörün yükseltgenmiş ve indirgenmiş halini belirtmektedir. İndirgenmeye uğrayan medyatör elektrot yüzeyine elektron vererek hem bir sinyal oluşmasını sağlar hem de kendisi tekrar yükseltgenir (Wang, 2008).

2.9.2. Üreaz

Üreaz (Urs) enzimi, bakteriyel lümen metabolizması için oldukça önem arz eden bir enzimdir. Bakteri, maya ve birçok bitkinin yapısında bulunur. Ürenin amonyum ve bikarbonat iyonlarına katalizlenmesini sağlar.



Organizmanın amonyak ve karbondioksiti azot kaynağı şeklinde kullanabilmesi amacıyla üreyi bu maddelere dönüştürme işlemi üreaz enzimi ile gerçekleşmektedir. Reaksiyon esnasında oluşan amonyak, toprakta bulunan mikroorganizmalar ve bitkiler tarafından da kullanılmaktadır. Sentezlenmesi bitkiler, funguslar ve bakteriler tarafından gerçekleştirilmektedir. (Moblely ve Hausinger, 1989).

2.10. Enzim İmmobilizasyon Teknikleri

Biyosensörlerde enzim immobilizasyonunda yaygın olarak tutuklama, kovalent bağlama, adsorpsiyon ve çapraz bağlama metotları kullanılmaktadır (D'Souza, 2001).

2.10.1. Tutuklama

Enzim molekülleri bu metotta agar ve agaroz gibi doğal veya poliüretan ve poliakrilamid gibi doğal olmayan polimer matrikslerde tutuklanmaktadır. Kolay ve ucuz bir yöntem olması avantaj, zamanla enzimin sızıyor olması, yüksek difüzyon eşiği ve sterik engel ise dezavantajdır (Mello ve Kubota, 2002).

2.10.2. Kovalent bağlama

Bu yöntemde enzim molekülleri ile destek yüzey arasında uygun bir yöntem ile kovalent bağ oluşumu sağlanır. Enzimler, yapılarında bulunan katalitik aktivitesi olmayan fonksiyonel gruplar sayesinde kovalent bağlanmayı gerçekleştirmektedir (Mello ve Kubota, 2002).

2.10.3. Fiziksel adsorpsiyon

Bu yöntemde geçirgen yapıya sahip bir membran üzerine van der Waals etkileşimleri ile enzimin doğrudan absorbe edilmesi sağlanır. Basit ve ucuz olması avantajlı yanındır. Fakat ölçümler yapılırken pH, sıcaklık ve iyonik şiddette değişiklik sonucunda absorbe edilen enzim miktarında kayıp gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Mello ve Kubota, 2002).

2.10.4. Çapraz bağlama

Bu yöntemde bir enzim başka bir enzime ya da suda çözünemeyen bir matrikse ait fonksiyonel gruba moleküller arası çapraz bağlanma gerçekleştirmektedir. Bağlanma esnasında enzim molekülleri genellikle bir destek gibi davranırlar. Bu nedenle bu yöntem pahalı ve yetersizdir. Bunun yanı sıra göreceli olarak düşük aktiviteye sahiptir (Telefoncu ve Dinçkaya, 1997). Çapraz bağlanmayı sağlamak amacıyla bifonksiyonel yapıdaki ajanlardan faydalanılmaktadır. Bunlar arasında en yaygın kullanılanlardan birisi, sulu çözücülerde çözünebilmesi ve kararlı kovalent bağ oluşturabilmesi nedeniyle glutaraldehitir.

2.11. Glutaraldehit

Çoğunlukla enzimlerin kovalent immobilizasyonu sırasında kullanılan çok fonksiyonlu bir reaktiftir. Bir biyosensörün geliştirilmesi esnasında kitosan, jelatin ve kollajen gibi biyolojik moleküller, biyoaktif materyaller (enzim, hücre, doku, vb.) ile glutaraldehitin çapraz bağ oluşturması sayesinde immobilize olurlar (Akyılmaz, 2002).

2.12. Önceki Çalışmalar

2.12.1. Glikoz tayini için yapılan çalışmalar

Yu ve ark., (2015), camsı bir karbon elektrot (GCE) yüzeyine grafen oksit (GO)–Prusya Mavisi (PB)-3,4,9,10-perilentetrakarboksilik dianhidrit türevi (PTC-NH₂) nanokompozit filmi yayarak bir glikoz biyosensörü elde etmişlerdir. Glikoz oksidaz (GOD), içi boş Pt nanokürelerin spesifik yapısı aracılığıyla modifiye edilmiştir. Fourier transform kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) yöntemleri ile oluşturulan yüzey karakterize edilmiştir. Glikoz tayini için kronoamperometri yöntemi ile elde edilen biyosensörün cevap süresi 5 s olarak tespit edilmiştir. Lineer kalibrasyon aralığı 0.01 ± 0.06 mM ile 5.23 ± 0.04 mM arasında olup, teşhis sınırı $3.3 \mu\text{M}$ (S/N = 3) olarak hesaplanmıştır.

Kazemi ve ark., (2015), glikoz konsantrasyonunun belirlenmesi için camsı karbon elektrot yüzeyine kısmen indirgenmiş grafen-altın nanokompozit üzerinde immobilize edilmiş glikoz oksidaz (PRGO-AuNPs/GOx) oluşturmuşlardır. Glikozu tayin etmek amacıyla kronoamperometri (CA) ile gerçekleştirdikleri çalışmada, PRGO–AuNPs/GOx modifiye elektrotun üstün elektrokatalitik aktivite özeliğine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Teşhis sınırı ise $0.06 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır.

Mijowska ve ark., (2015), çalışmalarında elektrot malzemesi olarak camsı bir karbon elektrot (GCE) kullanmışlardır. İlk olarak bu elektrot üzerine indirgenmiş grafen oksit/paladyum nanokompozit (RGO–Pd) yapıyı modifiye edilmiştir. Daha sonra glikoz oksidaz (GOx) enziminin yüzeye immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. RGO–Pd–GOx biyosensörü, 2 - 10 mM aralığında glikozu iyi bir elektrokataliz ortamı sergilemiştir. Sistem, 0.996 korelasyon katsayısı ile incelenen konsantrasyon aralığında -0.085 V potansiyelde akımda doğrusal bir artış göstermiştir.

Özel (2018), yaptığı çalışmada kitosan, çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNTs) içeren iletken polimere dayalı yüzeyi grafit elektrot üzerine modifiye etmiştir. Monomer olarak 4,7-bis(3,4-dihidro-2H-thieno[3,4-b][1,4]oxathiepin-8yl)benzo[c][1,2,5]thiadiazole monomeri kullanılmıştır. Glikoz oksidaz enzimi ise Glutaraldehit çapraz bağlayıcısı ile immobilize edilmiştir. Bu şekilde üretilen CP/CHIT/MWCNTs/GOx enzim elektrotunun

lineer tepki aralığı 0.01-0.75 mM, teşhis sınırı 0.032 mM, duyarlılığı $63.76 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ ve K_M^{app} değeri 0.05 mM olarak belirlenmiştir.

Janmanee ve ark., (2019), poli(pirrol-3-karboksilik asit)/grafen oksit (PP3C/GO) kompozit ince filmi elektrokimyasal polimerizasyon ile indiyum kalay oksit (ITO) elektrot üzerine oluşturmuşlar ve glikoz oksidazı (GOx) kovalent bağlama yoluyla kompozit ince filmin yüzeyine immobilize etmişlerdir. Hazırladıkları biyosensör, 1 - 20 mM arasında geniş bir algılama lineer aralığına, $R^2 = 0.9957$ korelasyon katsayısına, 5 s'lik yanıt süresine ve 0.05 mM'lık düşük teşhis sınırı ($S/N = 3$) ile glikoz tespiti için yüksek bir hassasiyet ve seçicilik sergilemiştir.

Çete ve ark., (2020), glikoz oksidaz enzimini (GOX) polipirrol-poli(sodyum 4-stirensülfonat) (PPy-PSS) kompozit film üzerine immobilize ederek glikoz tayini için yeni bir biyosensör hazırlamıştır. Glikoz tayini, 0.4 V'ta biyosensör yüzeyindeki enzimatik reaksiyon sonucu hidrojen peroksitin yükseltgenmesine göre yapılmıştır. Bu çalışmada biyosensör için lineer aralık $1 \times 10^{-5} - 1.0 \text{ mM}$, K_M değeri 2.97 mM ve V_{max} değeri $0.097 \mu\text{A}$ bulunmuştur.

Xu ve ark., (2020), camı karbon elektrot (GCE) üzerine Cu elementi, yeni bir geçiş metali sülfürü ve indirgenmiş grafen oksitinden oluşan hibrit ($\text{Cu}_x\text{S-MoS}_2\text{-rGO}$) ile enzimatik olmayan bir biyosensör hazırlamıştır. Cu'nun eklenmesi katalizi büyük ölçüde iyileştirirken, MoS_2 3D kırışık ve gözenekli yapının oluşturulmasında önemli bir rol oynamış, rGO ise açıkça elektron transferini hızlandırmıştır. Sinerji etkisinden dolayı, hibrit $\text{Cu}_x\text{S-MoS}_2\text{-rGO}$, glikozun yükseltgenmesini önemli ölçüde katalizlemiştir. Hazırladıkları biyosensör, 2 - 6330 μM 'lik geniş bir lineer aralık, 0.6 μM 'lik düşük bir teşhis sınırı, yüksek stabilite ve yeterli seçicilik göstermiştir.

Ramanavicius ve ark., (2021), grafit çubuk elektrotu (GRE) Ni nanopartiküller (Ni-NP'ler) ve polipirolden (Ppy) oluşan biyomimetik-kompozit ile modifiye ederek enzimatik olmayan elektrokatalitik amperometrik glikoz biyosensörü geliştirmişler. Glikozun amperometrik tayini 0.45 V'ta gerçekleştirilmiş ve biyosensör $0.4 \mu\text{mol L}^{-1}$ teşhis sınırı, 2873 $\mu\text{A mmol}$ hassasiyet ve 1.0 - 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ arasında geniş bir lineer glikoz belirleme aralığı göstermiştir.

Lee ve ark., (2021), Pt elektrot üzerine polipirol (PPy)/polidopamin (PDA) ve glikoz oksidaz (GOx) kullanarak elektrokimyasal glikoz algılamaya yönelik biyosensör tasarlamıştır. Elde ettikleri GOx biyosensör, $22.15 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ 'lik iyi bir hassasiyet, 5-6 s'lik kısa bir yanıt süresi, 5.0 mM ' a kadar doğrusal bir aralık ve $138 \mu\text{M}$ glikoz teşhis sınırı ($R^2 = 0.995$) sergilemiştir.

Pilo ve ark., (2022), yaptıkları çalışmada amperometrik bir biyosensör üretmek amacıyla glikoz oksidazı (GOx) Pt, camı karbon (GC) ve Au elektrot yüzeylerinde hareketsizleştirmek amacıyla, grafen okside bağlı bir politiyofen iletken filmi (2,5-di(2-tienil)tieno[3,2-b]tiyofen) kullanmışlardır. Bu şekilde oluşturulan biyosensörün $1.0 - 10.0 \text{ mM}$ lineer aralıkta, $36 \mu\text{M}$ teşhis sınırında ve $9.4 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ 'lik hassasiyette olduğu belirlenmiştir.

2.12.2. Üre tayini için yapılan çalışmalar

Das ve ark., (2015), üre analizinde kullanmak üzere sülfonatlı grafen/polianilin nanokompozit yapılı elektrokimyasal biyosensör geliştirmişlerdir. Üreaz enzimi ile hareketsizleştirilmiş sülfonatlı grafen/polianilin nanokompozit film, ürenin elektroanalitik tespitinde 0.050 mM teşhis sınırı ve $0.85 \mu\text{A cm}^{-2} \text{mM}^{-1}$ hassasiyet göstermiştir. Biyosensörün, cevap süresi yaklaşık 5 saniye olup, geniş bir doğrusal algılama aralığı ($0.12-12.3 \text{ mM}$) elde edilmiştir.

Zheng ve ark., (2015), Pt disk elektrot üzerine anilinin elektrokimyasal polimerizasyonuna dayalı nano yapılı grafen (GRA) iletken polianilin (PANI) nanokompozitine glikoz oksidazın (GOD) immobilize edilmesiyle bir biyosensör üretmişlerdir. Oluşturulan biyosensörün elektrokimyasal davranışı CV ve EIS yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. Yüzey karakterizasyonu ise taramalı elektron spektroskopisi (SEM) ile gerçekleştirilmiştir. Amperometrik yöntemle, oluşturulan biyosensörün pH ve uygulama potansiyeli parametreleri test edilmiştir. Optimum şartlarda elde edilen biyosensörün doğrusal çalışma aralığı $10.0 \mu\text{M}$ ila $1,48 \text{ mM}$ ($R^2=0,9988$) arasında olup teşhis sınırı $2.769 \mu\text{M}$ ($S/N=3$), hassasiyet, $22.1 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$, Michaelis-Menten sabiti (K_M) 3.26 mM olarak belirlenmiştir.

Dervisevic ve ark., (2017), kalem grafit elektrot (PGE) üzerine önce 4-(2,5-Di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl) anilin monomerini (SNS-Anilin) elektropolimerize etmişler,

ardından polimer kaplı elektrot yüzeyine di-amino-Ferrosen (DAFc) ve son olarak glutaraldehit çapraz bağlama yoluyla üreaz enzimini modifiye etmişlerdir. Girişim çalışmaları ve kararlılık deneylerinin yanı sıra pH, sıcaklık, polimer kalınlığı ve uygulanan potansiyelin yanıt etkisini araştırmışlardır. Elde edilen üre biyosensörünün amperometrik yanıtının, 0,54 $\mu\text{A}/\text{mM}$ hassasiyet, 12 μM teşhis sınırı ve 2 s kısa yanıt süresi ile 0.1 - 8.5 mM aralığında doğrusal olduğu tespit edilmiştir.

Dervisevic ve ark., (2017), kalem grafit elektrot (PGE) yüzeyine çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT'ler) ile birleştirilmiş ferrosen-poli(amidoamin)(Fc-PAMAM) dendrimerlerine dayalı elektrokimyasal üre biyosensörü geliştirmişlerdir. Enzim modifikasyonu ise polimer kaplı PGE'nin üreaz çözeltisine daldırılmasıyla sağlanmıştır. Elde ettikleri enzim elektrot, 0.2 - 1.8 mM'lik geniş doğrusal aralık, 0.05 mM'lik teşhis sınırı, 3 s'lik hızlı yanıt süresi ve 1.085 $\mu\text{A cm}^{-2} \text{mM}^{-1}$ lik hassasiyet ile üre tespitinde kullanılmıştır.

Badhulika ve ark., (2017), ürenin enzimatik olmayan tespiti için Grafen-Polianilin (Gr-PANi) bazlı bir elektrokimyasal biyosensör hazırlamışlardır. Gr-PANi kompoziti, PANi'nin Gr modifiye GCE yüzeyinde dönüşümlü voltametri (CV) tekniği kullanılarak elektro-biriktirme yöntemi ile sentezlenmiştir. Kompozitteki Gr ve PANi'nin varlığı, FESEM, XRD ve Raman spektroskopisinden oluşan karakterizasyon teknikleri kullanılarak doğrulanmıştır. Optimize edilmiş sensör, 10 μM - 200 μM aralığında ve 226.9 $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-2}$ ($R^2 = 0.993$) hassasiyetinde olup düşük bir teşhis sınırı (5.88 μM), mükemmel tekrarlanabilirlik, seçicilik ve kararlılık sergilemiştir.

Dervisevic ve ark., (2018), Au elektrot kullanarak, poliamidoamin eklenmiş çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT-PAMAM) dendrimerlerine (G1'den G5'e) üreaz enzimini immobilize ederek amperometrik üre biyosensör geliştirmiştir. Biyo algılayıcı elektrot için optimum pH, sıcaklık, uygulama potansiyeli gibi parametrelerle birlikte ve tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmıştır. En iyi sonuç beşinci nesil MWCNT-PAMAM ve üreaz enzimine dayalı elektrotta elde edilmiştir. MWCNT-PAMAM G-5 elektrotunun, 0.4 mM teşhis sınırına, 1 - 20 mM geniş lineer çalışma aralığına, 6.6 nA mM^{-1} hassasiyete ve 3 s kısa tepki süresine sahip olduğu belirlenmiştir.

Verma ve ark., (2020), demir oksit nanopartikülleri (Fe_3O_4), çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) ve poli-anilin (PANI) kullanarak camı karbon elektrotu, Fe_3O_4 /MWCNT/PANI-Nafion nanokompozit filmi ile elektrokimyasal olarak modifiye etmişler. Sonrasında saflaştırılmış bakteriyel üreaz enzimi, glutaraldehit çapraz bağlayıcısı yardımıyla nanokompozit film modifiye elektrot üzerine immobilize edilmiştir. Enzim modifiye elektrotun karakterizasyonu hem SEM hem de FTIR spektroskopi analizi ile yapılmıştır. Geliştirilen biyosensör, üre konsantrasyonuna bağlı olarak $67 \mu M$ teşhis sınırı ile $1.0 - 25.0 \text{ mM}$ arasında lineer çalışma aralığı göstermiştir.

Nia ve ark., (2021), perde baskılı karbon elektrotu (SPCE), anilinle birlikte grafen oksit ve nikel-mangan temelli nanoparçacıklarından oluşan nanokompozit yapıyı elektropolimerizasyon yöntemiyle modifiye ederek enzimatik olmayan biyosensör geliştirmiştir. Nanokompozit yapının morfolojik karakterizasyonu enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX), taramalı elektron mikroskopu (SEM), endüktif eşleştirilmiş plazma (ICP) ve Fourier transform kızılötesi spektroskopisi (FTIR spektroskopisi) gibi tekniklerle gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan modifiye elektrotun üreye duyarlılığı dönüşümlü voltametri yöntemiyle değerlendirilmiş ve biyosensörün doğrusal çalışma aralığı $30 \mu M - 3.3 \text{ mM}$ ($R^2 = 0.995$, $n = 3$) olarak belirlenmiştir. Ayrıca biyosensör, $5139.2 \mu A \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ lik yüksek hassasiyete ve $16.3 \mu M$ 'lik teşhis sınırına sahiptir.

Ashakirin ve ark., (2022), üreazı (Urs) immobilize edebilmek amacıyla perde baskılı karbon elektrotu (SPCE) gümüş indirgeyici grafen oksit (AgrGO) ile modifiye etmişlerdir. Elde edilen elektrotun yüzeyi FTIR, RAMAN, FESEM-EDX ve TEM yöntemleri kullanılarak ile karakterize edilmiştir. Elektrotun $0.001 - 10 \text{ mM}$ 'lik geniş bir doğrusal aralıkta, $47.598 \mu A \mu M^{-1} \text{ cm}^{-2}$ 'lik hassasiyette ve $0.1623 \mu M$ 'lik teşhis sınırında çalıştığı belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Cihazlar ve Elektrotlar

Elektrokimyasal yöntemlerden sabit gerilimde elektroliz, dönüşümlü voltametri ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi, AUTOLAB-PGSTAT 204 (Metrohm, Hollanda) cihazında NOVA 1.11 yazılım desteği ile gerçekleştirilmiştir. Bu yönteme ait çalışmalarda, çalışma elektrodu olarak kalem grafit elektrot (PGE) kullanılırken referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot (BASi, ABD) ve karşıt elektrot olarak da platin (Pt) (BASi, ABD) tel kullanılmıştır. Rotring 0.5 mm kaleme bir bakır tel sarılarak oluşturulan çalışma elektrotunda elektrot yüzeyi olarak Tombow HB 0.5 kalem ucu kullanılmıştır. Elektrot yüzeylerinin morfolojik karakterizasyonu ve elementel kompozisyonu deneyleri için, taramalı elektron mikroskopunun enerji dağılımlı X-ışını analiz modülü ile birleştirildiği Hitachi SU 1510 (Japonya) kullanıldı. X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS), Thermo Scientific K-Alpha (ABD) ile gerçekleştirilmiştir.

3.2. Kimyasallar

Tungsten disülfür (WS_2), grafen tozu, pirol (Py), potasyum ferrisiyanür ($K_3[Fe(CN)_6]$), potasyum ferrosiyanür ($K_4[Fe(CN)_6]$), sodyum klorür (NaCl) ve potasyum klorür (KCl) Sigma-Aldrich'ten satın alındı. Fosfat tamponunu hazırlamak için kullanılan disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), sodyum dihidrojen fosfat monohidrat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) Merck'ten satın alınmıştır. Glikoz oksidaz (GOx) (Aspergillus niger'den, liyofilize toz, $\geq 100,000$ birim/g katı) ve D-(+)-glikoz ($\geq 99,5$) Sigma'dan temin edildi. Üreaz (Urs) (liyofilize 5 birim/mg) ve üre ($99.0-100.5$) Sigma'dan satın alınmıştır. Deneysel süreçte kullanılan kimyasallar daha fazla saflaştırılmadan kullanıldı.

3.3. Çözeltilerin Hazırlanması

Deneylerin tamamı oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Deneyler öncesinde mevcut çözeltiler, oksijenden arındırılmak amacıyla için yüksek saflıkta (99.99) azot gazından 5 dk süreyle geçirildi.

3.3.1. Fosfat tampon çözeltisinin hazırlanması

Toplamda 50 mM sodyum hidrojenfosfat ve sodyum dihidrojenfosfat içerecek şekilde hassas terazi ile gerekli tartımlar yapıldı ve saf su içerisinde çözülerek çözelti hazırlandı. pH değerini 7.4 olacak şekilde ayarlamak için 0.1 M NaOH ve 0.1 M H₃PO₄ çözeltileri kullanıldı. Tampon çözelti +4 °C'deki buzdolabında saklandı.

3.3.2. 5 mM ferri-ferrosiyandır [Fe(CN)₆^{3-/4-}] içeren 0.1 M KCl çözeltisinin hazırlanması

Hassas terazi yardımıyla uygun miktarda potasyum ferrisiyanür ve potasyum ferrosiyandır tartılarak saf su içerisinde vorteks kullanılarak çözümleri sağlandı. Ardından belirlenen miktarda potasyum klorür ve saf su eklenerek çözelti hazırlandı. Çözelti kullanılmadığı zamanlarda alüminyum folyo ile sarılarak +4°C'deki buzdolabında saklandı. Bu çözelti taze olacak şekilde kullanılmaya dikkat edildi.

3.3.3. oPD monomer çözeltisinin hazırlanması

50 mM fosfat tamponu çözeltisi kullanılarak farklı konsantrasyonlarda orto-fenilendiamin monomer çözeltisi lityum perklorat destek elektrolit varlığında hazırlandı ve kullanıldı.

3.3.4. Pirel monomer çözeltisinin hazırlanması

50 mM fosfat tamponu çözeltisi kullanılarak farklı konsantrasyonlarda pirel monomer çözeltisi lityum perklorat destek elektrolit varlığında hazırlandı ve kullanıldı.

3.3.5. İletken polimer-grafen nanokompozit çözeltilerinin hazırlanması

Grafen konsantrasyonu 2 mg/mL olacak şekilde grafen tartılarak 50 mM fosfat tamponu çözeltisine eklendi. Elde edilen karışım 2 saat sonike edildi, vorteks yardımıyla karıştırıldı, ardından belirlenen miktarlarda monomerler eklenerek nanokompozit karışımlar oluşturuldu.

3.3.6. İletken polimer-grafen/tungsten disülfür çözeltisinin hazırlanması

Grafen konsantrasyonu 2 mg/mL, tungsten disülfür konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde maddeler tartılarak 50 mM fosfat tamponu çözeltisine eklendi. Elde edilen karışım 2 saat sonike edildi, ardından pirol ve LiClO₄ eklenerek çözelti oluşturuldu.

3.3.7. Glikoz oksidaz çözeltisinin hazırlanması

Belirli miktarda glikoz oksidaz tartılarak 50 mM fosfat tampon çözeltisi içerisinde çözülerek stok çözelti hazırlandı. Yine 50 mM fosfat tampon çözeltisi eklenerek farklı konsantrasyonlarda glikoz oksidaz çözeltileri hazırlandı. Kısa süreli kullanımlarda ve deney esnasında enzim çözeltileri +4 °C'deki buzdolabında saklandı. Uzun süre kullanılmadıklarında ise derin dondurucuda bekletildi.

3.3.8. Üreaz çözeltisinin hazırlanması

Belirli miktarda üreaz tartılarak 50 mM fosfat tampon çözeltisi içerisinde çözülerek stok çözelti hazırlandı. Yine 50 mM fosfat tampon çözeltisi eklenerek farklı konsantrasyonlarda üreaz çözeltileri hazırlandı. Kısa süreli kullanımlarda ve deney esnasında enzim çözeltileri +4 °C'deki buzdolabında saklandı. Uzun süre kullanılmadıklarında ise derin dondurucuda bekletildi.

3.3.9. Glikoz çözeltisinin hazırlanması

Belirli miktarda tartılan glikoz, 50 mM fosfat tamponu çözeltisi eklenerek 0.1 M stok çözeltisi hazırlandı. Daha sonra yine fosfat tamponu çözeltisi ile seyreltmeler yapılarak farklı konsantrasyonlarda glikoz çözeltileri hazırlandı. Çözelti kullanılmadığı zamanlarda +4 °C'deki buzdolabında saklandı.

3.3.10. Üre çözeltisinin hazırlanması

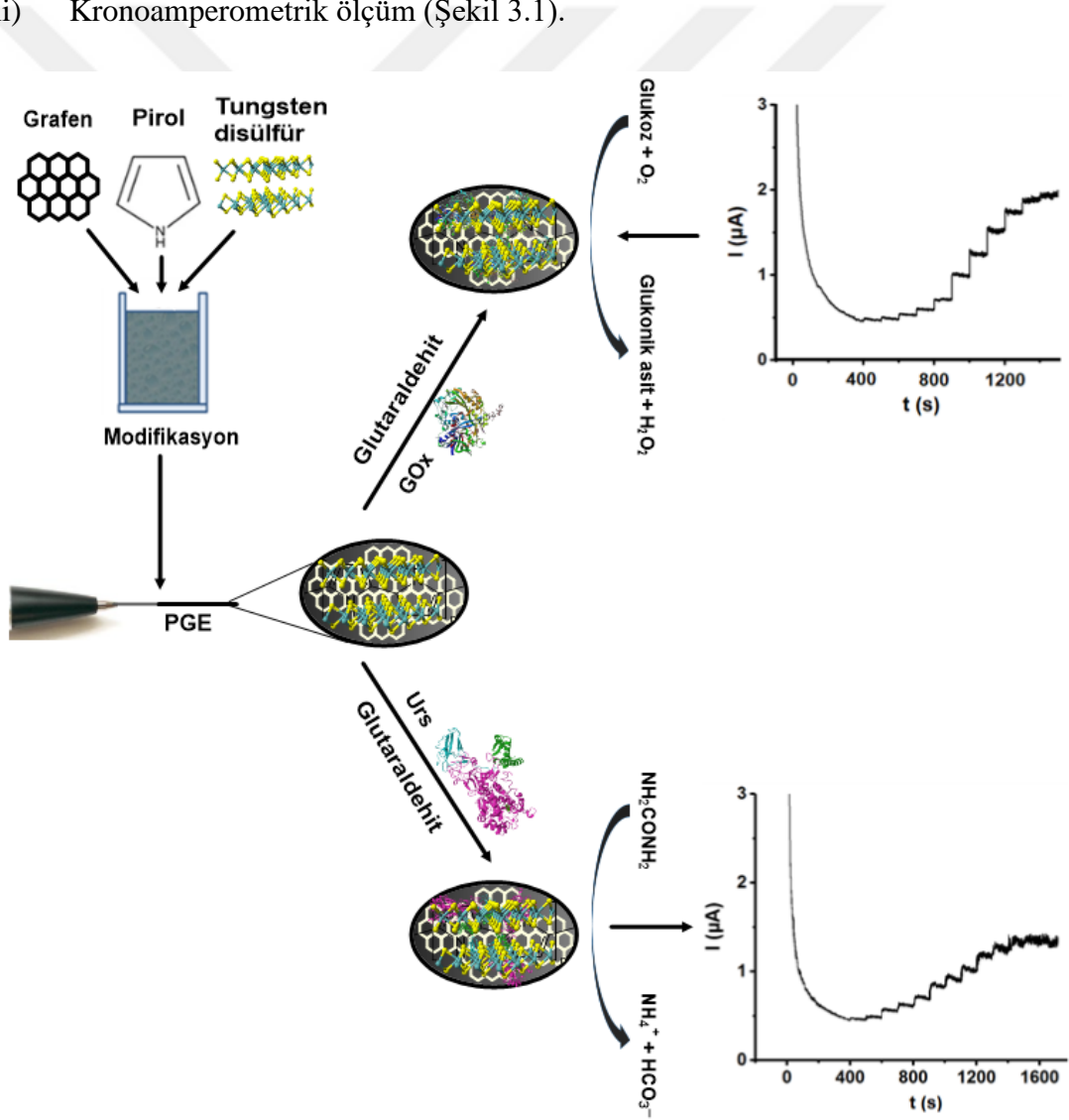
Belirli miktarda tartılan üre, 50 mM fosfat tamponu çözeltisi eklenerek 0.1 M stok çözeltisi hazırlandı. Daha sonra yine fosfat tamponu çözeltisi ile seyreltmeler yapılarak farklı konsantrasyonlarda üre çözeltileri hazırlandı. Çözelti kullanılmadığı zamanlarda +4 °C'deki buzdolabında saklandı.

3.3.11. Askorbik asit çözeltisinin hazırlanması

Belirli miktarda katı askorbik asit tartıldı ve saf su içerisinde çözünmesi sağlanarak çözelti oluşturuldu.

3.4. Yöntem

- (i) İletken polimer-grafen-WS₂ modifiye kalem grafit elektrot yüzeylerinin hazırlanması ve karakterizasyonu
- (ii) PPy-grafen/WS₂@PGE yüzeyine GOx ve Urs enzimlerinin immobilize edilmesi
- (iii) Kronoamperometrik ölçüm (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1. PPy-grafen/WS₂@PGE modifiye PGE'ler ile glikoz ve üre tayinine yönelik gerçekleştirilen deneysel prosedürün şematik gösterimi

3.4.1. Elektrotların kaplanması prosedüründe kullanılan elektropolimerizasyon koşulları

İletken polimer, iletken polimer-grafen ve iletken polimer-grafen/WS₂ ile elektrot yüzeylerini modifiye etmek için optimum koşullarda belirtilen maddeleri içeren karışımlar hazırlandı. Elektropolimerizasyon işleminden önce kalem uçları etil alkol ile yıkanarak kurutuldu ve kullanıma hazır hale getirildi. Dönüşümlü voltametri yöntemi kullanılarak 100 mV/s tarama hızında, 0.0 V ile +1.0 V potansiyelleri arasında farklı döngü sayılarında (1, 3, 5, 10 ve 20 döngü), sabit gerilimde elektroliz yöntemi kullanılarak +1.0 V potansiyelde, 100 mV/s tarama hızında, 15, 30, 60, 120 ve 180 s'de modifiye PGE'ler hazırlandı.

3.4.2. Modifiye elektrotların hazırlanması prosedürü

Polipirol modifiye elektrotun hazırlanması için 50 mM fosfat tamponu (pH 7.4) kullanılarak 1 mM pirol çözeltisi hazırlandı. PPy-grafen modifiye elektrot hazırlamak için 2 mg/mL grafen ve 1 mM pirol kullanıldı. PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun hazırlanması için 2 mg/mL grafen, 1 mM pirol ve 1 mg/mL WS₂ kullanıldı. Grafen ve grafen/WS₂ içeren ortam hazırlanırken, belirlenen miktarda grafen ve WS₂ önce 50 mM fosfat tamponuna ilave edilerek 2 saat sonikasyon yapıldı. Ayrıca her bir solüsyona destek elektrolit olarak 0.1 mM olacak şekilde lityum perklorat (LiClO₄) eklendi. Daha sonra ortama Py eklendi.

PoPD modifiye elektrotun hazırlanması için 50 mM fosfat tamponu (pH 7.4) kullanılarak 0.1 mM oPD çözeltisi hazırlandı. PoPD-grafen modifiye elektrot hazırlamak için 2 mg/mL grafen ve 0.1 mM oPD kullanıldı. Grafen içeren ortam hazırlanırken, belirlenen miktarda grafen önce 50 mM fosfat tamponuna ilave edilerek 2 saat sonikasyon yapıldı. Daha sonra ortama oPD eklendi. Ayrıca her bir karışıma destek elektrolit olarak 0.1 mM olacak şekilde lityum perklorat (LiClO₄) eklendi.

3.4.3. Modifiye elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonu

Modifiye PGE'lerin elektrokimyasal karakterizasyonu, 0.1 M KCl içeren 5 mM Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks probunda -0.3 V ile +0.6 V arasında 100 mV/s tarama hızında CV yöntemi kullanılarak yapıldı. Elektrotların elektrokimyasal davranışlarını karşılaştırabilmek amacıyla Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks probundaki pik akımlarındaki ve pik potansiyellerindeki

değişimlerden yararlanıldı. EIS yöntemi ile gerçekleştirilen karakterizasyonlar ise 0.1 M KCl içeren 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks probu içerisinde 10^5 Hz ile 10^{-2} Hz frekans aralığında 10 AC genlikte yapıldı.

3.5. Glikoz oksidaz ve üreaz immobilize elektrotlar için en uygun çalışma koşullarının belirlenmesi

1 mM Py, 1 mM LiClO_4 , 2 mg/mL grafen, 1 mg/mL WS_2 konsantrasyonlarına sahip karışım hazırlandı. Dönüşümlü voltametri metodu kullanılarak 100 mV/s tarama hızında 0.0 V ile +1.0 V potansiyelleri arasında 10 döngüde PPy-grafen/ WS_2 modifiye elektrotlar hazırlandı. Ardından GOx ve Urs enzimlerini elektrot yüzeyine immobilize edebilmek için elektrotlar %2.5'lik glutaraldehit (GA) çözeltisine daldırıldı ve 30 dk bekletildi. Daha sonra fosfat tamponu yardımıyla yıkama işlemi yapıldı ve elektrot oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

3.5.1. Enzim konsantrasyonunun etkisi

Bölüm 3.5'te anlatıldığı gibi hazırlanan elektrotlar konsantrasyonu 1, 5, 10, 15 mg/mL olan GOx veya Urs çözeltileri bulunduran eppendorflara daldırıldı ve 30 dk beklendi. Yüzeğe bağlanamayan enzim moleküllerini uzaklaştırmak için tampon çözelti ile yıkama aşamasının ardından elektrotlar buzdolabında kurutuldu. Sonrasında enzim elektrot, sabit karıştırma altında substrat içermeyen tampon çözeltisine daldırıldı ve bir denge akımı oluşana kadar +0.8 V'de beklendi. Daha sonra belirli konsantrasyonda substrat eklenerek akımdaki (Δi) farklılıklar değerlendirildi ve akım-zaman grafikleri çizildi (Kuralay ve ark. 2006; Bal ve Kuralay, 2021).

3.5.2. Enzim immobilizasyon süresinin etkisi

Bölüm 3.5'te anlatıldığı gibi hazırlanan elektrotlar içerisinde 10 mg/mL GOx veya Urs çözeltisi bulunan eppendorflara daldırılarak 15, 30, 60 ve 90 dk bekletildi ve ardından tampon çözelti ile yıkanarak kuruması için buzdolabına kondu. Sonrasında farklı konsantrasyonlarda enzim immobilize edilen elektrotlar, sabit karıştırma altında substrat içermeyen tampon çözeltisine daldırıldı ve bir denge akımı oluşana kadar +0.8 V'de beklendi. Daha sonra belirli konsantrasyonda substrat eklenerek akımdaki (Δi) farklılıklar değerlendirildi ve akım-zaman grafikleri çizildi.

3.5.3. Enzim elektrot için tampon çözeltinin pH'sinin etkisi

Bölüm 3.5'te anlatıldığı gibi hazırlanan elektrotlar içerisinde 10 mg/mL GOx veya Urs çözeltisi bulunan eppendorfta 30 dk bekletildi. Tampon çözelti ile yıkanan elektrotlar kuruması için buzdolabında bekletildi. pH=5, pH=6, pH=7.4, pH=8 ve pH=9 olan fosfat tamponları hazırlandı. Enzim immobilize edilen elektrotlar, sabit karıştırma altında substrat içermeyen pH değeri farklı her bir tampon çözeltiye ayrı ayrı daldırıldı ve bir denge akımı oluşana kadar +0.8 V'de beklendi. Daha sonra belirli konsantrasyonda substrat eklenerek akımdaki (Δi) farklılıklar değerlendirildi ve akım-zaman grafikleri çizildi.

3.5.4. Enzim elektrot için çalışma potansiyelinin belirlenmesi

Bölüm 3.5'te anlatıldığı gibi hazırlanan elektrotlar içerisinde 10 mg/mL GOx veya Urs çözeltisi bulunan eppendorfta 30 dk bekletildi. Tampon çözelti ile yıkanan elektrotlar kuruması için buzdolabında bekletildi. Sonrasında enzim elektrotlar, sabit karıştırma altında substrat içermeyen tampon çözeltisine daldırıldı ve bir denge akımı oluşana kadar +0.6 V, +0.7 V, +0.8 V ve +0.9 V'de beklendi. Daha sonra belirli konsantrasyonda substrat eklenerek akımdaki (Δi) farklılıklar değerlendirildi ve akım-zaman grafikleri çizildi.

3.6. Glikoz ve Ürenin Enzim İmmobilize Elektrotlarla Tayini

Bölüm 3.5'te anlatıldığı gibi hazırlanan elektrotlara optimum koşullarda GOx ve Urs enzimleri immobilize edildi. Ardından enzim elektrotlar, sabit karıştırma altında substrat içermeyen tampon çözeltisine daldırıldı ve bir denge akımı oluşana kadar beklendi. Daha sonra 100'er saniye ara ile hücre içi konsantrasyonu artacak şekilde glikoz veya üre ilavesi yapılarak akımdaki (Δi) farklılıklar değerlendirildi ve akım-zaman grafikleri çizildi.

3.7. Enzim Modifiye Elektrotların Seçiciliği

Bölüm 3.5'te anlatıldığı gibi hazırlanan elektrotlara optimum koşullarda GOx ve Urs enzimleri immobilize edildi. Ardından enzim elektrotlar, sabit karıştırma altında substrat içermeyen tampon çözeltisine daldırılıp denge akımı oluşana kadar beklendi. 100'er saniye ara ile GOx modifiye biyosensör için sırasıyla glikoz, askorbik asit ve üre ilavesi

yapılırken, Urs modifiye biyosensör için sırasıyla üre, glikoz ve askorbik asit ilavesi yapılarak akımdaki (Δi) farklılıklar değerlendirildi ve akım-zaman grafikleri çizildi.

3.8. Enzim Modifiye Elektrotların Tekrar Üretilirliği

Bölüm 3.5'te anlatıldığı gibi hazırlanan 10'ar tane elektrotlara optimum koşullarda GOx ve Urs enzimleri immobilize edildi. Ardından enzim elektrotlar, sabit karıştırma altında substrat içermeyen tampon çözeltisine daldırılıp denge akımı oluşana kadar beklendi. 100'er saniye ara ile hücre içi konsantrasyonu artacak şekilde glikoz veya üre ilavesi yapılarak akımdaki (Δi) farklılıklar değerlendirildi ve akım-zaman grafikleri çizildi.

3.9. Enzim Modifiye Elektrotların Kararlılığı

Bölüm 3.5'te anlatıldığı gibi hazırlanan elektrotlara optimum koşullarda GOx ve Urs enzimleri immobilize edildi. Ardından farklı günlerde enzim elektrotlar, sabit karıştırma altında substrat içermeyen tampon çözeltisine daldırılıp denge akımı oluşana kadar beklendi. 100'er saniye ara ile hücre içi konsantrasyonu artacak şekilde glikoz veya üre ilavesi yapılarak akımdaki (Δi) farklılıklar değerlendirildi ve akım-zaman grafikleri çizildi.

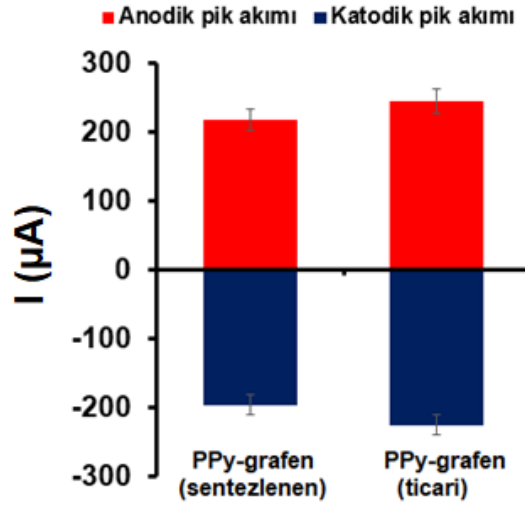
3.10. Enzim Modifiye Elektrotlarla Yapılan Gerçek Numune Çalışmaları

Bölüm 3.5'te anlatıldığı gibi hazırlanan elektrotlara optimum koşullarda GOx ve Urs enzimleri immobilize edildi. Glikoz ve üre tayinleri için fosfat tamponu ile seyreltilmiş serum ve idrar örnekleri kullanıldı. Bu aşamada farklı seyreltme oranları (4 kez, 10 kez 100 kez) denenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Grafen sentezi ve karakterizasyonu

Grafen sentezi, ekonomik olması, kolay olması ve veriminin iyi olması nedeniyle en çok kullanılan yöntemlerden biri olan modifiye Hummers metodu ile gerçekleştirildi (Hummers ve Offeman 1958; Zhou ve ark., 2009). Önce grafitten yola çıkılarak grafen oksit hazırlandı. Hazırlanan grafen oksidin grafene indirgenmesi ise hidrazin kullanılarak kimyasal indirgenme yapılarak gerçekleştirildi. Ardından sentezlenen grafen ve ticari grafen kullanılarak karşılaştırma amaçlı, polipirol-grafen modifiye elektrotlar CV metodu kullanılarak 10 döngüde hazırlandı. Devamında hazırlanan elektrotların elektrokimyasal davranışları 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks türlerini içeren elektrolit içerisinde incelendi. Şekil 4.1'de görüldüğü üzere ticari grafen ile hazırlanan elektrotta elektrokimyasal davranışın daha iyi olduğu belirlendi. Bu nedenle deneysel çalışmalara ticari grafen ile devam edildi.

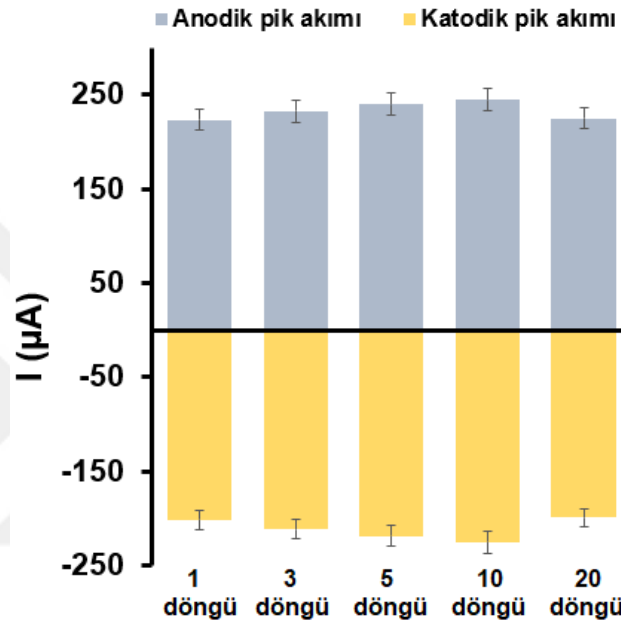


Şekil 4. 1. Sentezlenen grafen ve ticari satın alınan grafen ile hazırlanan PGE'lere ait elektrokimyasal davranışların 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks türlerini içeren elektrolit içerisinde karşılaştırılması (n=3)

4.2. PPy-grafen Modifiye Elektrotların Polimerizasyon Koşullarının Optimizasyonu ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu

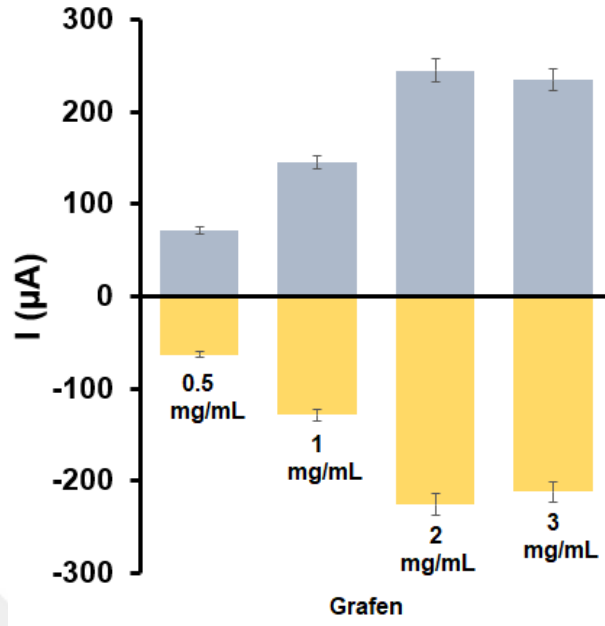
PPy-grafen modifiye elektrotlar için çalışmanın ilk aşamasında çevrim sayısının etkisini araştırmak amacıyla, 0.0 V ile 1.0 V potansiyel aralığında 1-3-5-10-20 döngüde PPy-grafen modifiye elektrotlar hazırlandı. Hazırlanan PPy-grafen modifiye elektrotların

elektrokimyasal davranışları 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks türlerini içeren elektrolit içerisinde dönüşümlü voltametri metodu ile anodik ve katodik tepe akımları karşılaştırılarak yapıldı (Şekil 4.2). Anodik ve katodik pik akımlarında 1 döngüden 10 döngüye kadar artış olduğu sonrasında ise büyük olasılıkla elektrot yüzeyinde film kalınlığının artmasına bağlı olarak elektron transferinde meydana gelen difüzyon sınırlamaları sebebiyle hafif bir azalma görüldü (Babkina ve ark., 2006; Zaitseva ve ark., 2017).



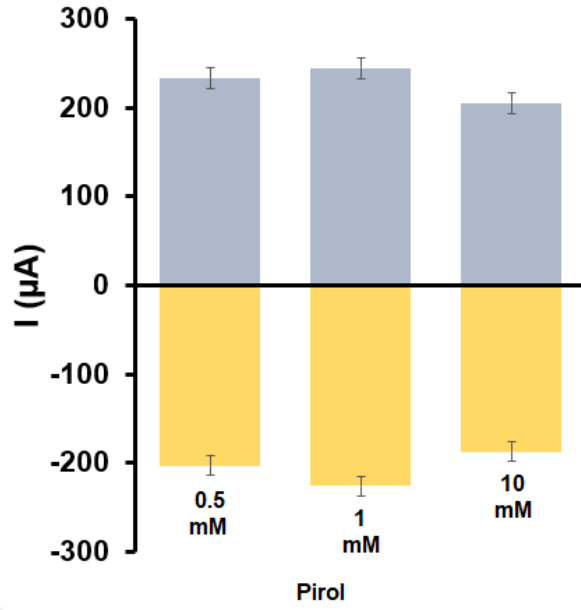
Şekil 4. 2. Dönüşümlü voltametri ile hazırlanmış PPy-grafen modifiye elektrotlar için döngü sayıları değişiminin 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}]$ içeren 0.1 M KCl çözeltisi içerisinde etkisini gösteren bar diyagramları.

Daha sonra, grafen konsantrasyonunun etkisinin belirlenebilmesi için 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL ve 3 mg/mL grafen konsantrasyonuna sahip ortamda hazırlanan PPy-grafen modifiye elektrotlar (1 mM Py + 1 mM LiClO_4 içeren) CV metodu kullanılarak 10 döngüde ayrı ayrı hazırlandı. Grafen konsantrasyonu arttıkça anaodik ve katodik pik akımlarında belirgin düzeyde artış, elektron transfer hızına bağlı olarak tersinirlikte ise iyileşme olduğu gözlemlendi. En iyi sonuç ise 2 mg/mL grafen konsantrasyonunda elde edildi (Şekil 4.3).



Şekil 4. 3. Dönüşümlü voltametri ile hazırlanmış PPy-grafen modifiye elektrotlar için grafen konsantrasyonu değişiminin 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}]$ içeren 0.1 M KCl çözeltisi içerisinde etkisini gösteren bar diyagramları.

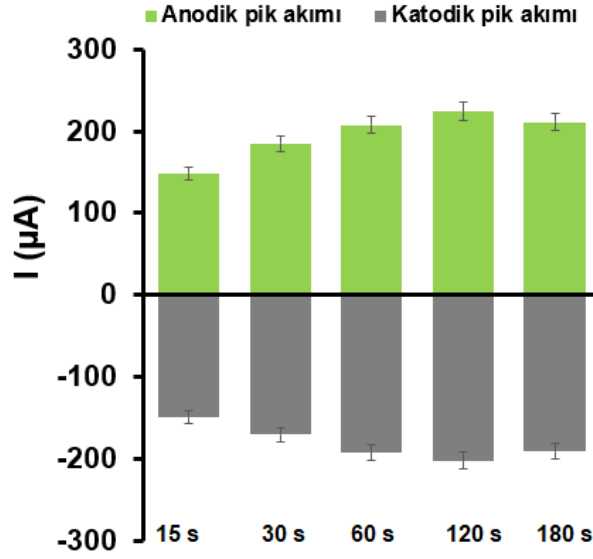
Daha sonra Py monomerinin konsantrasyonundaki değişimin pik akımlarına etkisi araştırıldı. Bunun için pirol konsantrasyonu 0.5 mM, 1 mM ve 10 mM olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda PPy-grafen modifiye elektrotlar 10 döngüde hazırlandı. Hazırlanan elektrotlara ait elektrokimyasal davranışlar incelendiğinde pirol konsantrasyonunun değişimi ile küçük akım değişiklikleri olduğu ve optimum sonucun 1 mM'de olduğu belirlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4. 4. Dönüşümlü voltametri ile hazırlanmış PPy-grafen modifiye elektrotlar için pirol konsantrasyonu değişiminin 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}]$ içeren 0.1 M KCl çözeltisi içerisinde etkisini gösteren bar diyagramları.

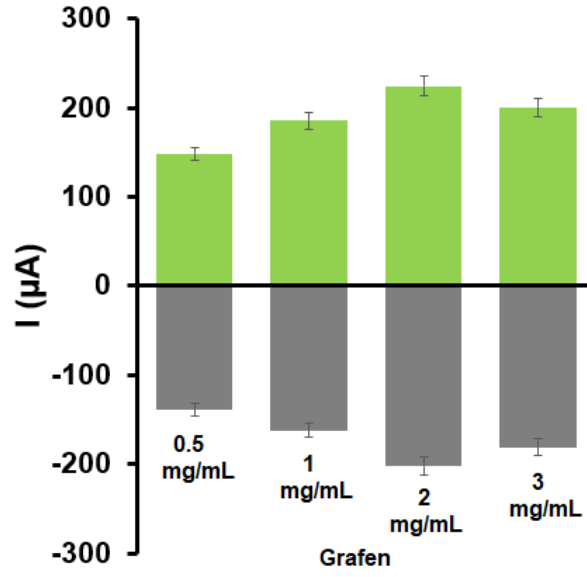
4.3. PoPD-grafen Modifiye Elektrotların Polimerizasyon Koşullarının Optimizasyonu ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu

PoPD-grafen modifiye elektrotların optimizasyonunda ilk olarak +1.0 V potansiyelde 30-60-90-120 ve 180 s elektropolimerizasyon ile PoPD-grafen modifiye elektrotlar hazırlanarak elektropolimerizasyon süresinin etkisi sonucu elektrokimyasal cevaplardaki değişimler yine dönüşümlü voltametri metoduyla 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks türlerini içeren elektrolit içerisinde anodik ve katodik tepe akımları kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 4.5). Pik akımlarında 120 saniyeye kadar artış gözlenirken sonrasında büyük olasılıkla elektrot yüzeyinde film kalınlığının artmasına bağlı olarak elektron transferinde meydana gelen difüzyon sınırlamaları sebebiyle azalma görüldü.



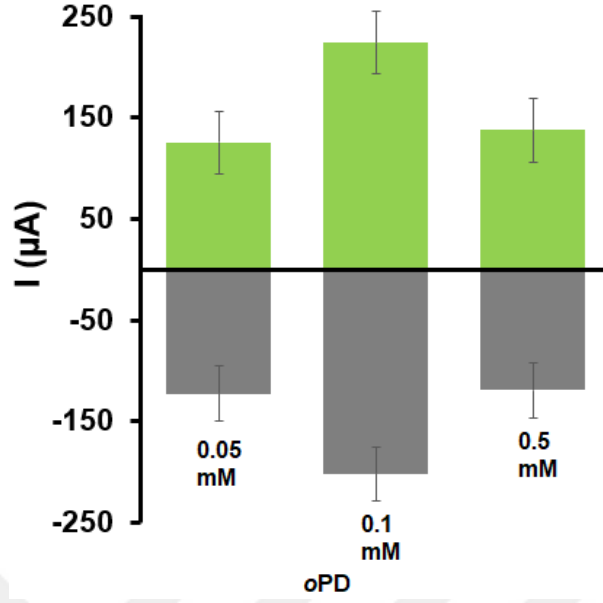
Şekil 4. 5. Sabit gerilimde elektroliz ile hazırlanmış PoPD-grafen modifiye elektrot için elektropolimerizasyon süresi değişiminin 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ içeren 0.1 M KCl çözeltisi içerisinde etkisini gösteren bar diyagramları.

Daha sonra, grafen konsantrasyonunun etkisinin belirlenebilmesi için 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL ve 3 mg/mL grafen konsantrasyonuna sahip PoPD-grafen modifiye elektrotlar (0.1 mM oPD + 0.1 mM LiClO_4 içeren) sabit gerilimde elektroliz yöntemiyle 120 s polimerizasyonla elektrotlar hazırlandı. 2 mg/mL grafen konsantrasyonuna kadar elektrotların davranışında iyileşme olduğu sonrasında ise düşüş olduğu gözlemlendi (Şekil 4.6).



Şekil 4. 6. Sabit gerilimde elektroliz ile hazırlanmış PoPD-grafen modifiye elektrot için grafen konsantrasyonu değişiminin 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}]$ içeren 0.1 M KCl çözeltisi içerisinde etkisini gösteren bar diyagramları.

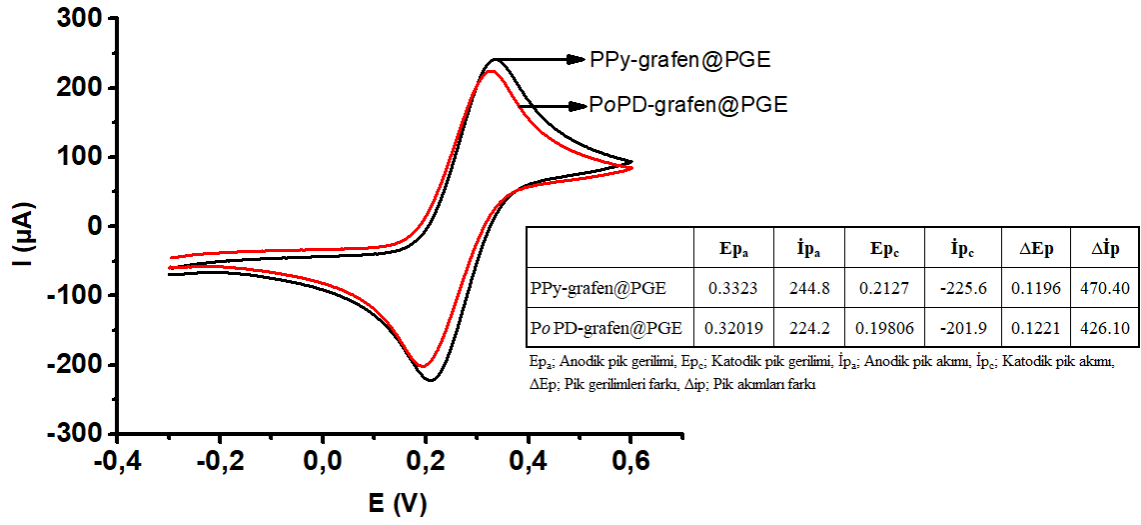
Sonraki aşamada monomer konsantrasyonunun etkisini belirlemek amacıyla oPD konsantrasyonu 0.05 mM, 0.1 mM ve 0.5 mM olarak değiştirildi. 0.05 mM ve 0.5 mM oPD konsantrasyonlarında anodik ve katodik pik akımlarının birbiriyle yaklaşık olarak yakın değerde oldukları (sırasıyla 248.40 μA ve 256.74 μA), fakat optimum koşul olarak belirlenen 0.1 mM konsantrasyonda ise bu değer 426.10 μA olduğu belirlendi (Şekil 4.7).



Şekil 4. 7. Sabit gerilimde elektroliz ile hazırlanmış PoPD-grafen modifiye elektrot için oPD konsantrasyonu değişiminin 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}]$ içeren 0.1 M KCl çözeltisi içerisinde etkisini gösteren bar diyagramları.

4.4. Optimum Koşullarda Hazırlanan PPy-grafen ve PoPD-grafen Modifiye Elektrotların Elektrokimyasal Davranışlarının Karşılaştırılması

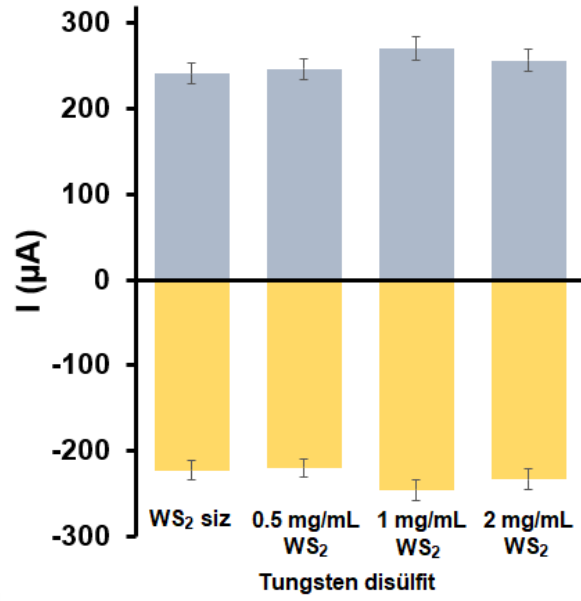
Şekil 4.8’de her iki monomer (Py ve oPD) ile ayrı ayrı optimum koşullarda hazırlanan monomer-grafen modifiye elektrotların 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks türlerini içeren elektrolit içerisindeki elektrokimyasal davranışları karşılaştırılmaktadır. Grafik incelendiğinde, PPy-grafen modifiye elektrota ait anodik ve katodik pik akım farkı 470.40 μA iken PoPD -grafen modifiye elektrota ait anodik ve katodik pik akım farkı 426.10 μA olarak ölçüldü. Ayrıca PPy-grafen modifiye elektrotta elektron transfer hızına bağlı olarak tersinirliğin daha iyi olduğu görüldü. Bu nedenle çalışmanın bundan sonraki bölümüne PPy-grafen modifiye elektrot ile devam edildi.



Şekil 4. 8. Optimum koşullarda hazırlanmış PPy-grafen modifiye PGE (siyah) ile PoPD-grafen modifiye PGE'nin 5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks türlerini içeren elektrolit içerisindeki elektrokimyasal davranışlarının karşılaştırılması (İç çizelge: Modifiye elektrotlara ait en büyük ve en küçük pik akım değerleri (μA) ve indirgenme-yükseltgenme potansiyelleri (V))

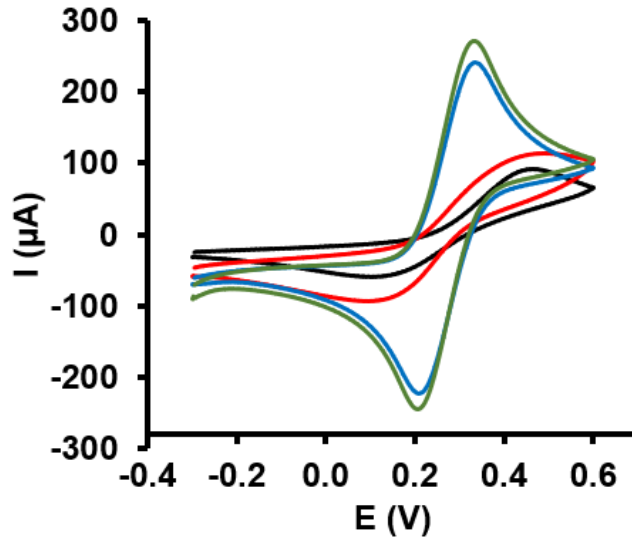
4.5. WS_2 'nin PPy-grafen Yüzeğe Eklenmesi

MoS_2 ve WS_2 gibi grafen benzeri 2D yapıli geçiş metali dikalkojenitlerinin son yıllardaki sensör teknolojisinde kullanım sıklığı da göz önünde bulundurularak, elektrot performansında sinerjik etki oluşturmak ve elektrotların özelliklerinde iyileşme sağlamak amacıyla pirol-grafen modifikasyonuna ilave olarak WS_2 'nin etkisi araştırıldı (Rahman ve ark. 2018; Sun ve ark. 2017). Bu amaçla önce 0.5 mg/mL, 1 mg/mL ve 2 mg/mL WS_2 kullanılarak PPy-grafen/ WS_2 modifiye elektrotlar ayrı ayrı hazırlandı ve WS_2 içermeyen PPy-grafen modifiye elektrot ile davranışları karşılaştırıldı. WS_2 'nin katkısıyla birlikte indirgenme ve yükseltgenme pik akımlarında iyileşme olduğu, en iyi iyileşmenin ise 1 mg/mL WS_2 konsantrasyonunda olduğu belirlendi (Şekil 4.9).



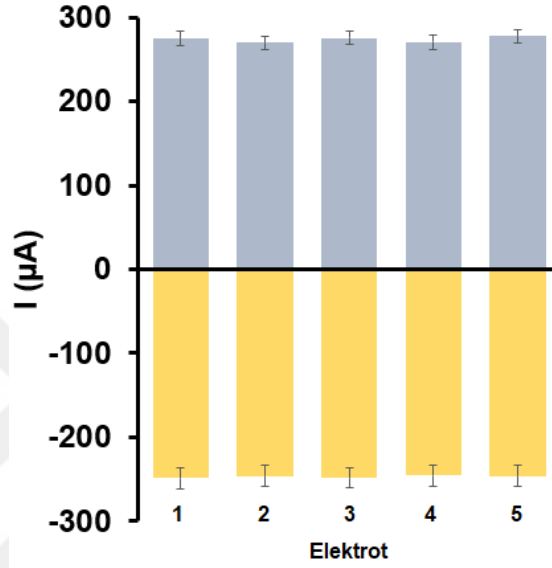
Şekil 4. 9. Dönüşümlü voltametri ile hazırlanmış PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotlar için WS₂ konsantrasyonu değişiminin 5 mM [Fe(CN)₆^{3-/4-}] içeren 0.1 M KCl çözeltisi içerisinde etkisini gösteren bar diyagramları

Daha sonra çıplak PGE, PPy ile modifiye edilmiş PGE, PPy-grafen ile modifiye edilmiş PGE ve PPy-grafen/WS₂ ile modifiye edilmiş PGE'nin elektrokimyasal özellikleri karşılaştırıldı. Şekil 4.10'da görüldüğü gibi WS₂ ilavesi sonrasında PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrota ait indirgenme-yükseltgenme pik akımlarının PPy-grafen modifiye elektrota göre daha iyi olduğu görüldü.



Şekil 4. 10. PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun (yeşil), PPy-grafen modifiye elektrotun (mavi), PPy modifiye elektrotun (kırmızı) ve çıplak elektrotun (siyah) CV'lerinin 5 mM [Fe(CN)₆^{3-/4-}] içeren 0.1 M KCl çözeltisi içerisindeki elektrokimyasal davranışlarının karşılaştırılması

Ardından PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun tekrar üretilebilirliğini belirlemek amacıyla 5 farklı elektrot hazırlanarak 5 mM [Fe(CN)₆^{3-/4-}] içeren 0.1 M KCl çözeltisi içerisinde elektrokimyasal davranışlarına bakıldı (n=3). Elde edilen sonuçlar Şekil 4.11’de görülmektedir. Elektrotlara ait bağıl standart sapma değerlerinin (%RSD) %2.5 - %3.0 arasında olduğu bulundu.

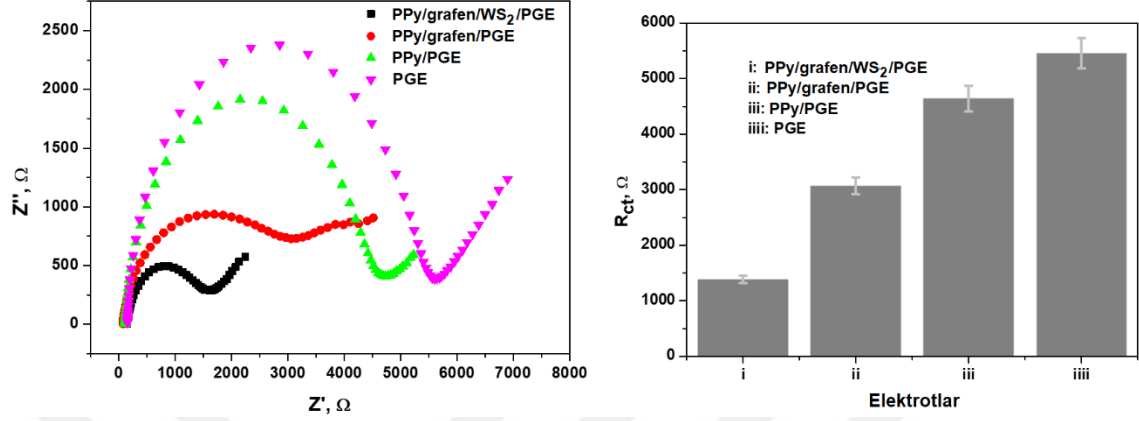


Şekil 4. 11. PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotta ait tekrarlanabilirliği gösteren bar grafikleri

4.6. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) Metodu ile Elektrotların Karakterizasyonu

Elektrokimyasal davranışların karşılaştırılmasında CV metoduna tamamlayıcı özellik gösteren diğer bir yöntem de elektrokimyasal empedans spektroskopisi metodudur. Bu yöntemde elektrotların yük transfer direnci (R_{ct}) değerleri karşılaştırılarak elektrot ve elektrolit arasındaki elektron transferine direnci belirlenmektedir (Emir ve ark., 2021; Ashakirin ve ark., 2022). Şekil 4.12-A'da, modifiye edilmemiş elektrot ile birlikte PPy modifiye, PPy-grafen modifiye ve PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotların EIS spektrumları görülürken, Şekil 4.12-B'de ise belirtilen elektrotlara ait aktarım hızları R_{ct} değerleri ile gösterilmektedir (n=3). 0.1 M KCl + 5 mM Fe(CN)₆^{3-/4-} de kaydedilen değerler incelendiğinde elektron transferine direncin modifiye edilmemiş elektrotta en

yüksek seviyede olduğu, buna karşılık PPy-grafen/WS₂ ile modifiye edilmiş elektrotta ise en düşük değere sahip olduğu görülmektedir.



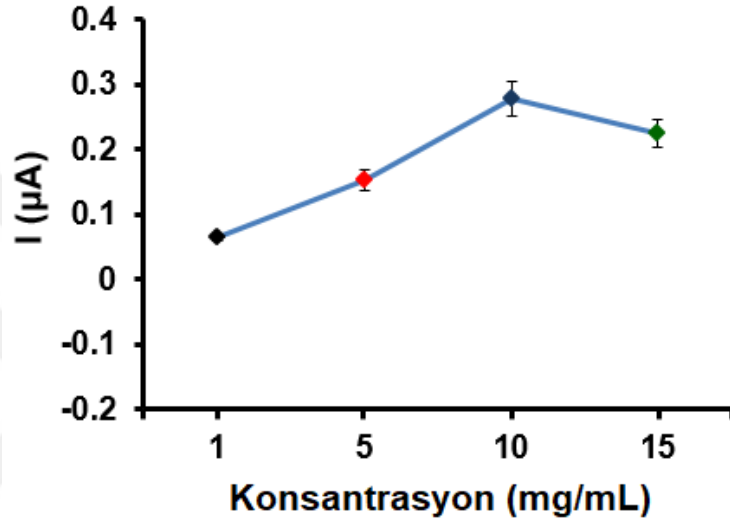
Şekil 4. 12. (A) Elektrotların EIS spektrumlarının ve (B) R_{ct} değerlerinin 5 mM [Fe(CN)₆^{3-/4-}] içeren 0.1 M KCl çözeltisi içerisindeki karşılaştırılması (n=3)

4.7. PPy-grafen/WS₂ Modifiye Elektrotta GOx Enzim İmmobilizasyonu ve Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

4.7.1. GOx enzim konsantrasyonunun etkisi

Bir analite yönelik biyosensör tasarlanırken uygun bir destek materyaline çözünebilir özellikteki bir enzimin immobilize edilmesi enzime özgü katalitik aktivite ve stabilite gibi özellikleri etkilemektedir. Bu nedenle enzim konsantrasyonu, enzim immobilizasyon süresi, ortamın pH'ı ve potansiyelin etkisi gibi enzimin çalışma performansını etkileyen çeşitli parametreler optimize edilmiştir (Sahu ve ark., 2019). Bu amaçla önce optimum koşullarda (1 mM Py, 1 mM LiClO₄, 2 mg/mL grafen ve 1 mg/mL WS₂) PPy-grafen/WS₂ elektrotlardan yeterli sayıda hazırlandı. Hazırlanan elektrotlar %2.5'lik (v/v) glutaraldehit çapraz bağlayıcısında 30 dk süresince bekletilip açık havada kurumaya bırakıldı (Anakok ve Cete, 2021; Aini ve ark. 2015; He ve ark. 2016). Kurutma sonrası PPy-grafen/WS₂ modifiye 4 tane kalem grafit elektrot konsantrasyonu 1, 5, 10, 15 mg/mL olan GOx çözeltisine ayrı ayrı daldırılarak 30 dk süresince bekletildi (Bal ve Kuralay, 2021). Fosfat tamponu ile elektrotta bağlanmayan enzimlerin uzaklaştırılması yapıldıktan sonra elektrotlar +4 °C'lik buzdolabında deneyler gerçekleştirilene kadar bekletildi. Bu şekilde hazırlanan enzim elektrotlar glukoz içermeyen boş 0.1 M fosfat tamponu (pH 7.4) çözeltisine daldırıldı ve denge akımı oluşuncaya kadar beklendi. Ardından hücre içi

glikoz konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde sabit karıştırma altında glikoz ilavesi yapılarak farklı konsantrasyonlarda GOx immobilize edilmiş her bir elektrot için akım değerlerindeki artış incelendi (n=3). Şekil 4.13'te görüldüğü üzere 10 mg/mL GOx konsantrasyonuna kadar akım değerinin arttığı ve sonrasında elektron transferinin baskılanmasına bağlı olarak akımın düştüğü gözlemlenmiştir (Lee ve ark. 2019; Kaya ve ark. 2018).

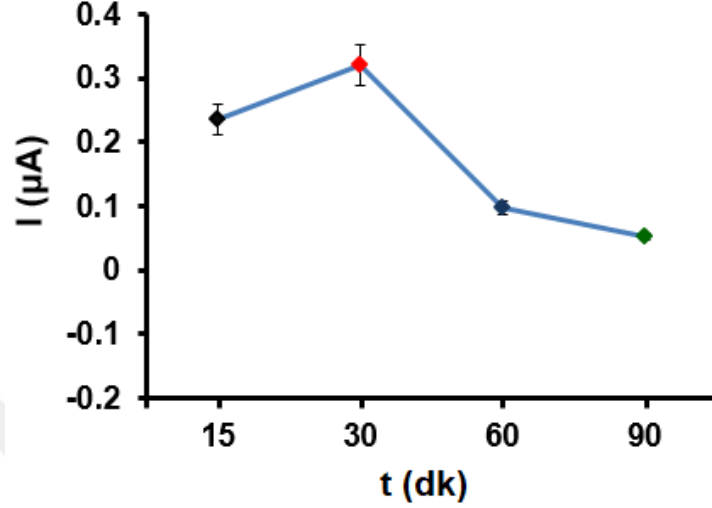


Şekil 4. 13. GOx enzim konsantrasyonunun PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun analitik performansına olan etkisi (0.1 M fosfat tamponu içerisinde)

4.7.2. GOx enzim immobilizasyon süresinin etkisi

GOx enziminin immobilizasyon süresinin etkisini belirlemek amacıyla önce optimum koşullarda PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotlar hazırlandı. Ardından elektrotlar %2.5'lik (v/v) glutaraldehit çapraz bağlayıcısında 30 dk süresince bekletilip açık havada kurumaya bırakıldı. Daha sonra elektrotlar içerisinde 10 mg/mL konsantrasyonda GOx enzimi bulunduran eppendorfa daldırılarak 15, 30, 60 ve 90 dk bekletildi ve +4 °C'lik buzdolabında kurumaya bırakıldı. Sonrasında hücre içi glikoz konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde sabit karıştırma altında glikoz ilavesi yapılarak farklı sürelerde GOx immobilize edilmiş her bir elektrot için akım değerlerindeki artış incelendi (n=3). Şekil 4.14'de görüldüğü üzere en yüksek akım değerleri 30 dk'lık immobilizasyonda elde edildi. Süre uzadıkça akım değerlerinde de belirgin düzeyde azalmalar görüldü. Bunun

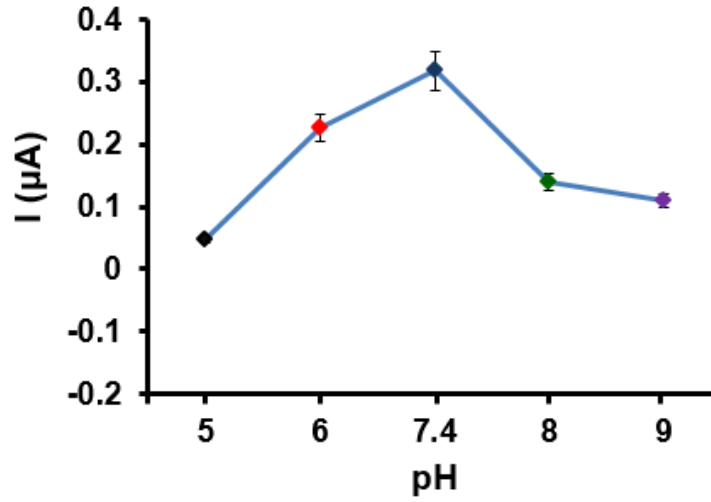
sebebi ise 30 dk içerisinde elektrot yüzeyinin yeterli substratla etkileşip enzim doygunluğuna ulaşması olabilir (Kadian ve ark. 2018).



Şekil 4. 14. GOx enzim immobilizasyon süresinin PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun analitik performansına olan etkisi (0.1 M fosfat tamponu içerisinde)

4.7.3. GOx immobilize elektrota tampon çözeltinin pH'sinin etkisi

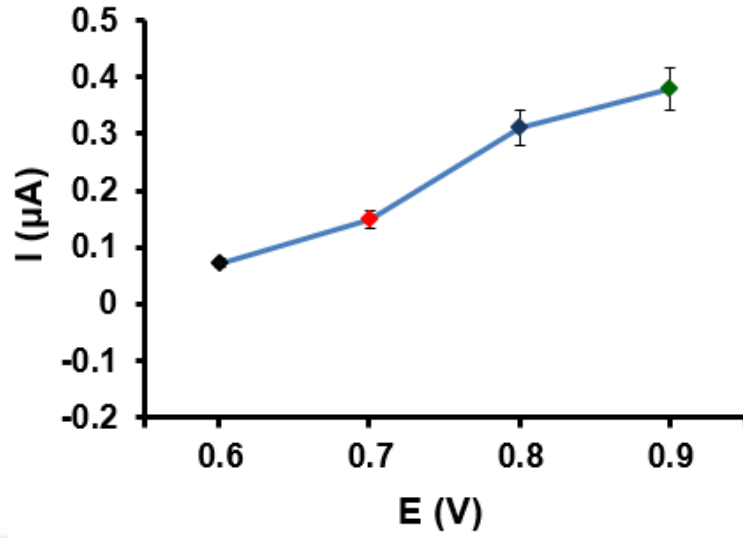
Enzim aktivitesini etkileyen bir diğer parametre olan tampon çözeltisine ait pH değerini optimize etmek amacıyla pH değeri 5, 6, 7.4, 8 ve 9 olan tampon çözeltileri hazırlandı (Özbek ve ark., 2021). Optimum koşullarda hazırlanan PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotlar %2.5'lik (v/v) glutaraldehit çapraz bağlayıcısında 30 dk süresince bekletilip açık havada kurumaya bırakıldı. Ardından elektrotlar, içerisinde 10 mg/mL konsantrasyonda GOx enzimi bulunduran eppendorfa daldırılarak 30 dk bekletildi ve +4 °C'lik buzdolabında kurumaya bırakıldı. Sonrasında hücre içi glikoz konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde sabit karıştırma altında glikoz ilavesi yapılarak her bir elektrot için akım değerlerindeki artış incelendi (n=3). Şekil 4.15'de görüldüğü gibi aynı glikoz konsantrasyonuna karşılık biyosensörlerden elde edilen en yüksek akım değerinin pH 7.4'te olduğu, bu değere kadar akımın arttığı, bu değerden akımda azalma olduğu görüldü. Bu sonuçlar aynı zamanda daha önce yapılan çalışmalar ile de uyumludur (Mehdizadeh ve ark., 2020; Tian ve ark., 2017).



Şekil 4. 15. Farklı pH'taki tampon çözeltilerin GOx/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun analitik performansına olan etkisi

4.7.4. GOx immobilize elektrota potansiyelin etkisi

Çalışma potansiyelinin elektrot performansına olan etkisinin araştırılması amacıyla optimum koşullarda PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotlar hazırlandı ve %2.5'lik (v/v) glutaraldehit çapraz bağlayıcısında 30 dk süresince bekletilip açık havada kurumaya bırakıldı. Ardından içinde 10 mg/mL konsantrasyonda GOx enzimi bulunduran eppendorfa elektrotlar daldırılarak 30 dk bekletildi, tampon çözeltisiyle yıkandı ve +4 °C'lik buzdolabında kurumaya bırakıldı. Daha sonra glikoz içermeyen boş 0.1 M PBS (pH 7.4) çözeltisine elektrotlar daldırılıp denge akımı oluşuncaya kadar beklendi. Sonrasında 0.6 V, 0.7 V, 0.8 V, 0.9 V gerilim uygulanarak elde edilen akım değerleri karşılaştırıldı. Sonuçlar incelendiğinde en yüksek akım değerinin 0.9 V'ta elde edildiği görüldü (Şekil 4.16). Fakat yüksek potansiyelde glikoz ile birlikte ortamda bulunabilecek çeşitli türlerin girişim yapıcı etkileri nedeniyle optimum koşul 0.8 V olarak belirlendi. Bu sonuç daha önceki çalışmalarla da paraleldir (Çoğal, 2017; Settu ve ark., 2021).

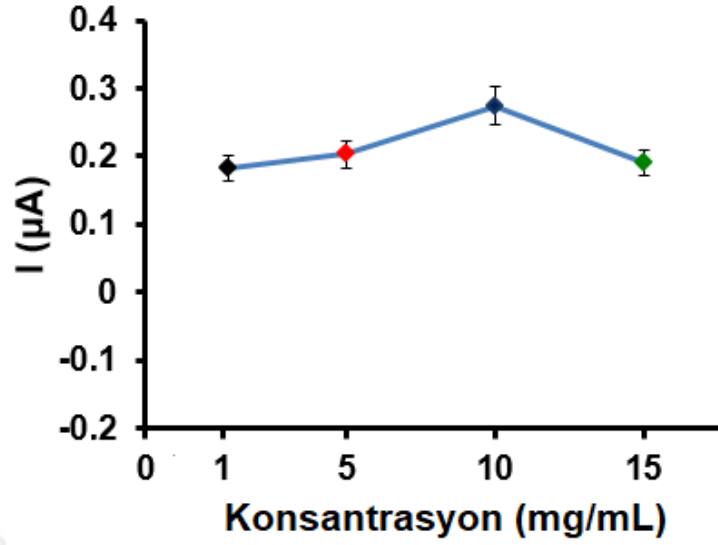


Şekil 4. 16. Uygulanan potansiyelin GOx immobilize edilmiş PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun analitik performansına olan etkisi (0.1 M fosfat tamponu içerisinde)

4.8. PPy-grafen/WS₂ Modifiye Elektrotta Urs Enzim İmmobilizasyonu ve Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

4.8.1. Urs enzim konsantrasyonunun etkisi

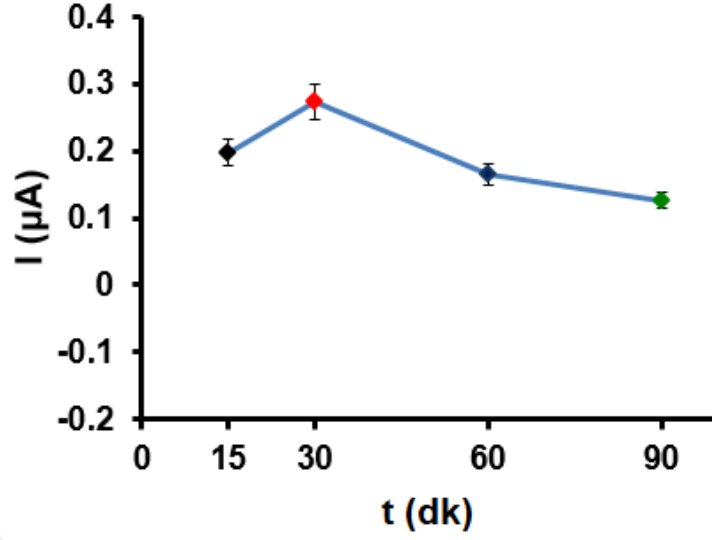
Optimum koşullarda PPy-grafen/WS₂ elektrotlardan yeterli sayıda hazırlandı ve %2.5'lik (v/v) glutaraldehit çapraz bağlayıcısında 30 dk süresince bekletilip açık havada kurumaya bırakıldı (Dervisevic ve ark., 2017). Kurutma sonrası PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotlar konsantrasyonu 1, 5, 10, 15 mg/mL olan Urs çözeltilerine ayrı ayrı daldırılarak 30 dk süresince bekletildi. Daha sonra elektrotlar fosfat tamponu ile yıkanarak elektrotta bağlanamayan enzimler uzaklaştırıldı ve elektrotlar deneyler gerçekleştirilene kadar +4 °C'lik buzdolabında bekletildi. Hazırlanan enzim elektrotlar üre içermeyen boş 0.1 M fosfat tamponu (pH 7.4) çözeltisine daldırıldı ve denge akımı oluşuncaya kadar beklendi. Ardından hücre içi üre konsantrasyonu 4 mM olacak şekilde sabit karıştırma altında üre eklenerek her bir elektrot için akım değerlerindeki artış incelendi (n=3). Şekil 4.17'de görüldüğü üzere akım değerlerinde 10 mg/mL Urs konsantrasyonuna kadar artış olduğu ve sonrasında elektron transferinde muhtemel bir baskılanmaya bağlı olarak akımın düştüğü gözlemlenmiştir.



Şekil 4. 17. Urs enzim konsantrasyonunun PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun analitik performansına olan etkisi (0.1 M fosfat tamponu içerisinde)

4.8.2. Urs enzim immobilizasyon süresinin etkisi

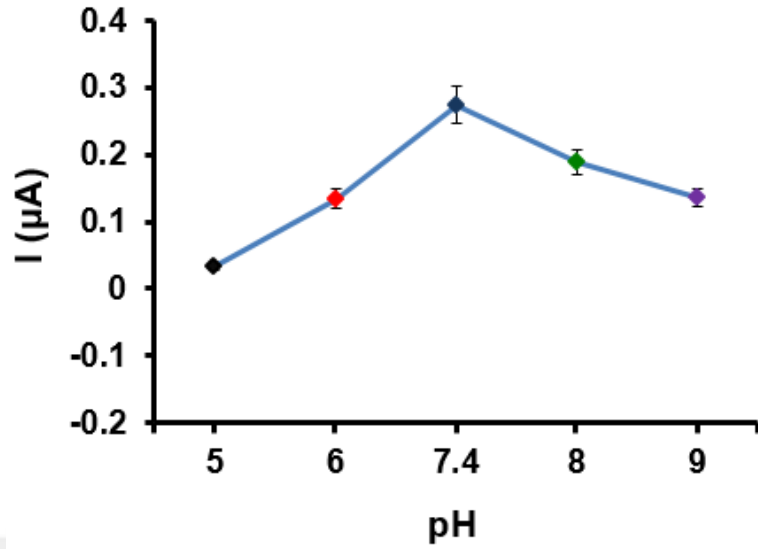
Optimum koşullarda hazırlanan PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotlar önce %2.5'lik (v/v) glutaraldehit çapraz bağlayıcısında 30 dk süresince bekletilip açık havada kurumaya bırakıldı. Daha sonra içerisinde 10 mg/mL konsantrasyonda Urs enzimi bulunduran eppendorfa daldırılan elektrotlar 15, 30, 60 ve 90 dk bekletildi. Her bir elektrot tampon çözeltisiyle yıkandı ve +4 °C'lik buzdolabında kurumaya bırakıldı. Ardından hücre içi üre konsantrasyonu 4 mM olacak şekilde sabit karıştırma altında üre ilavesi yapılarak farklı sürelerde GOx immobilize edilmiş her bir elektrot için akım değerlerindeki artış incelendi (n=3). Şekil 4.18'de görüldüğü üzere 30 dk Urs immobilize edilen elektrottaki akım değeri farkı en yüksek olarak ölçüldü. 60 dk ve 90 dk'lık immobilizasyon sürelerinde muhtemelen elektrot yüzeyinin yeterli substratla etkileşim enzim doygunluğuna ulaşması sebebiyle akım değerlerinde azalmalar görüldü.



Şekil 4. 18. Urs enzim immobilizasyon süresinin PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun analitik performansına olan etkisi (0.1 M fosfat tamponu içerisinde)

4.8.3. Urs immobilize elektrota tampon çözeltinin pH'sinin etkisi

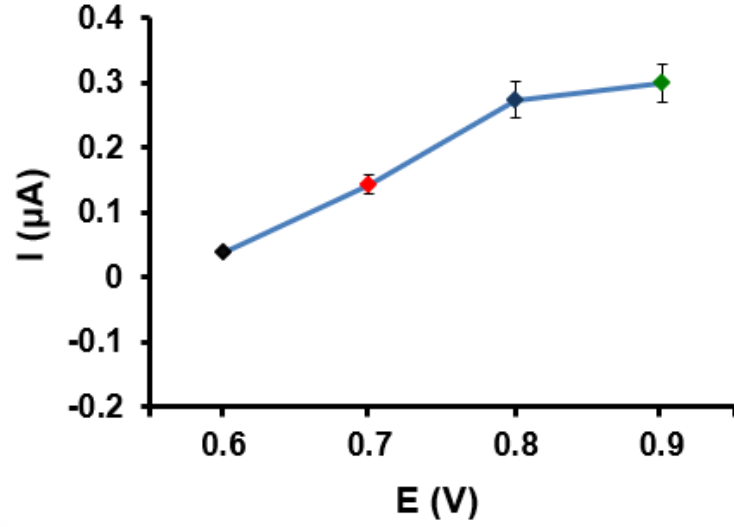
Optimum koşullarda hazırlanan PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotlar önce %2.5'lik (v/v) glutaraldehit çapraz bağlayıcısında 30 dk süresince bekletilip açık havada kurumaya bırakıldı. Ardından elektrotlar, içerisinde 10 mg/mL konsantrasyonda Urs enzimi bulunduran eppendorfa daldırılarak 30 dk bekletildi, tampon çözeltisiyle yıkandı ve +4 °C'lik buzdolabında kurumaya bırakıldı. Sonrasında hücre içi üre konsantrasyonu 4 mM olacak şekilde sabit karıştırma altında üre ilavesi yapılarak her bir elektrot için akım değerlerindeki artış incelendi (n=3). Şekil 4.19'da görüldüğü üzere pH 7.4'te en yüksek tepe akımı elde edilirken pH 8 ve pH 9 değerlerinde denatürasyona ve enzim aktivitesindeki kayba bağlı olarak akım değerlerinde düşüş görüldü (Schranck ve ark., 2018; Ashakirin ve ark., 2022).



Şekil 4. 19. Farklı pH'teki tampon çözeltilerin Urs/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun analitik performansına olan etkisi

4.8.4. Urs immobilize elektrota potansiyelin etkisi

Enzim immobilize edilmiş elektrot performansına uygulama potansiyelinin etkisinin araştırılması amacıyla optimum koşullarda PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotlar hazırlandı ve %2.5'lik (v/v) glutaraldehit çapraz bağlayıcısında 30 dk süresince bekletilip açık havada kurumaya bırakıldı. Ardından içinde 10 mg/mL konsantrasyonda Urs enzimi bulunduran eppendorfa elektrotlar daldırılarak 30 dk bekletildi, tampon çözeltisiyle yıkama yapıldı ve +4 °C'lik buzdolabında kurumaya bırakıldı. Daha sonra içerisinde üre bulundurmeyen boş 0.1 M tampon (pH 7.4) çözeltisine elektrotlar daldırılıp denge akımı oluşuncaya kadar beklendi. Sonrasında 0.6 V, 0.7 V, 0.8 V, 0.9 V gerilim uygulanarak yapılan taramalar sonrasında elde edilen akım değerleri karşılaştırıldı. Şekil 4.20'deki sonuçlar incelendiğinde en yüksek akım değerinin 0.6 V'tan 0.9 V'a kadar akım değerlerinde artış olduğu görüldü. Literatüre baktığımızda benzer bir sonucun Hassan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda da elde edildiği görülmektedir (Hassan ve ark., 2018). Bu nedenle optimum çalışma potansiyeli olarak 0.8 V değeri belirlendi.

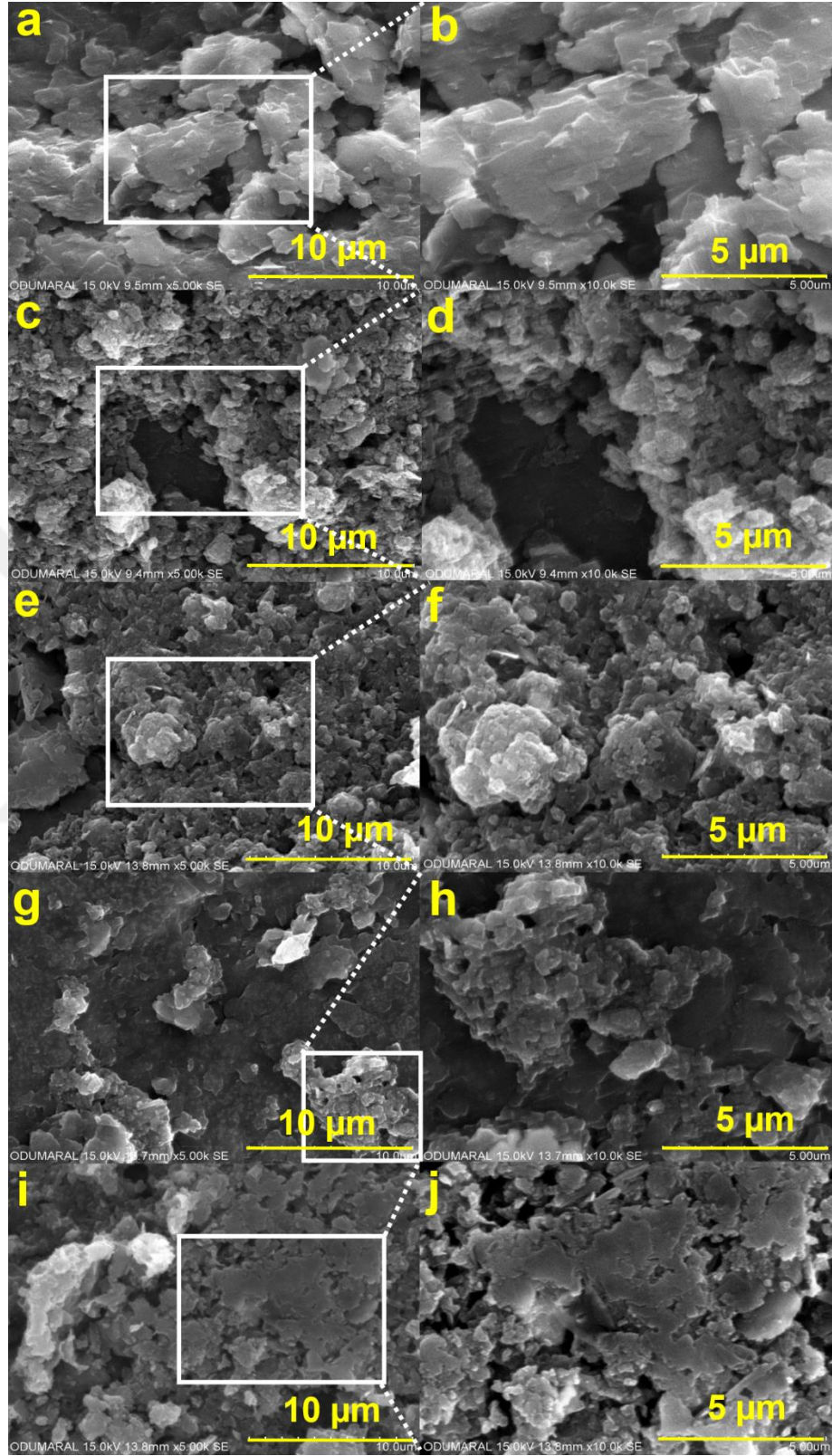


Şekil 4. 20. Uygulanan potansiyelin Urs immobilize edilmiş PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun analitik performansına olan etkisi (0.1 M fosfat tamponu içerisinde)

4.9. Modifiye Elektrotların Yüzey Karakterizasyonu

4.9.1. Modifiye elektrot yüzeylerinin taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile karakterizasyonu

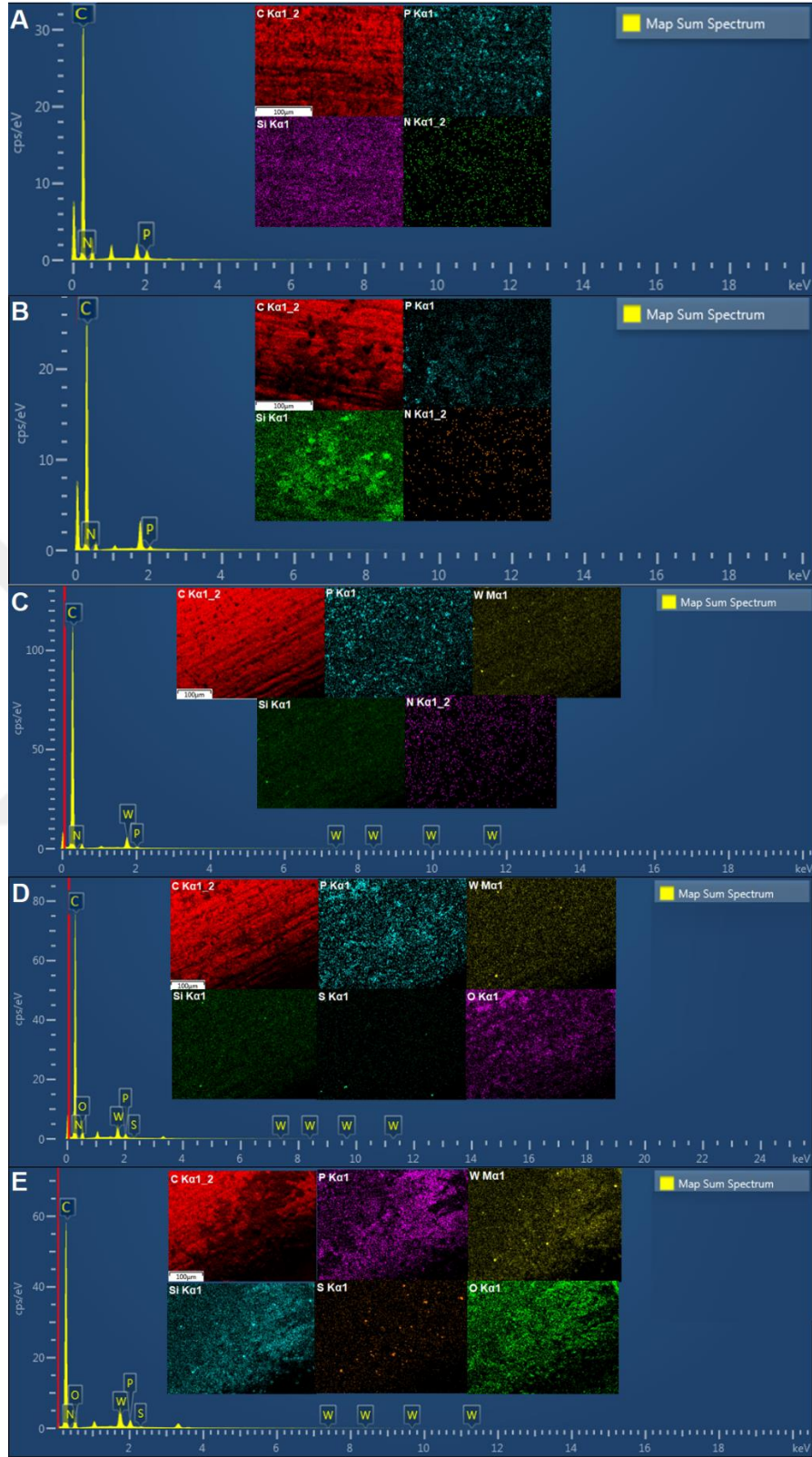
Optimum koşullarda hazırlanan PPy modifiye, PPy-grafen modifiye, PPy-grafen/WS₂ modifiye, GOx/PPy-grafen/WS₂ modifiye ve Urs/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotlar için 5.00 k ve 10.0 k olmak üzere iki farklı büyütmeye SEM görüntüleri alındı. Şekil 4.21-c,d,'de PPy-grafen modifiye elektrota ait yüzeyde daha homojen bir oluşumun olduğu ve morfolojik yapının Şekil 4.21-a,b'deki PPy modifiye elektrota göre farklı olduğu görülmektedir. Yüzeye WS₂'nin ilavesi sonrasında ise artan yüzey alanı ile birlikte enzim immobilizasyonun da daha kolay olacağı söylenebilir (Şekil 4.21-e,f). Şekil 4.21-g,h'deki GOx/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrota ait SEM görüntülerindeki ve Şekil 4.21-i,j'deki Urs/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrota ait SEM görüntülerindeki yüzey farklılıkları ise GOx ve Urs enzimlerinin immobilizasyonlarının başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir (Kaya ve ark. 2018).



Şekil 4. 21. (a,b) PPy modifiye, (c,d) PPy-grafen modifiye, (e,f) PPy-grafen/WS₂ modifiye, (g,h) GOx/PPy-grafen/WS₂ modifiye, (i,j) Urs/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotlara ait SEM görüntüleri

4.9.2. Modifiye elektrot yüzeylerinin enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) ile karakterizasyonu

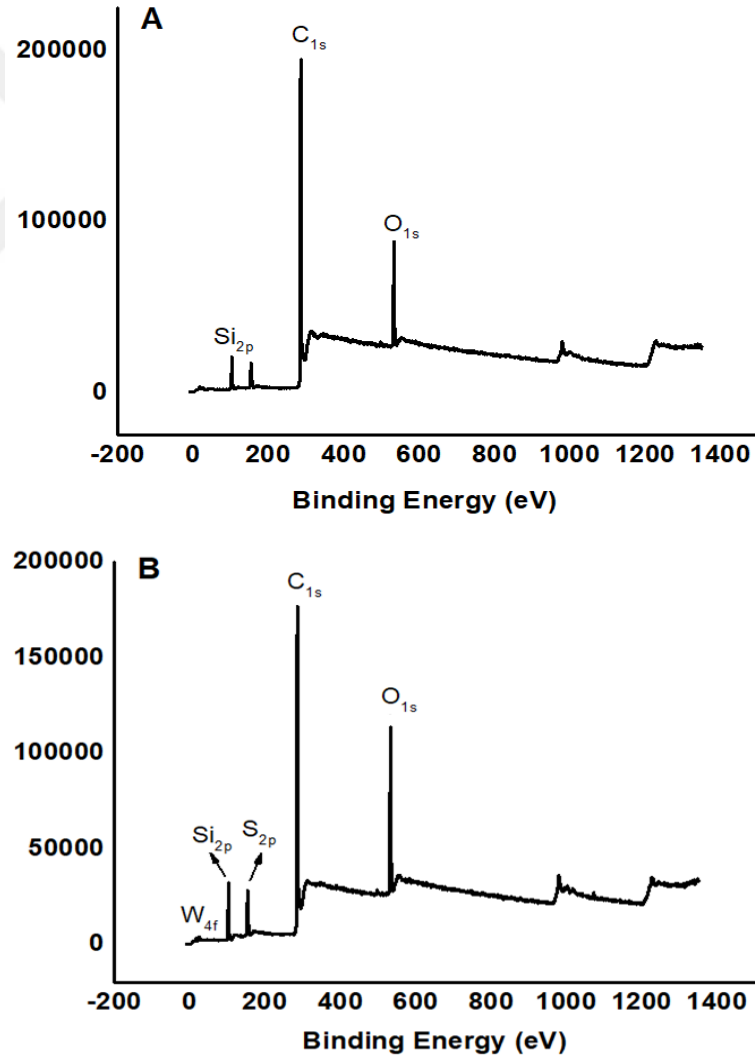
Optimum koşullarda hazırlanan PPy modifiye (Şekil 4.22-A), PPy-grafen modifiye (Şekil 4.22-B), PPy-grafen/WS₂ modifiye (Şekil 4.22-C), GOx/PPy-grafen/WS₂ modifiye (Şekil 4.22-D) ve Urs/PPy-grafen/WS₂ modifiye (Şekil 4.22-E) elektrotlara ait EDX spektrumu ve yüzey haritalaması görülmektedir. PPy modifiye ve PPy-grafen modifiye elektrotlara ait spektrumlarda görülen karbon (C) ve nitrojen (N) pikleri elektrot yüzeyine modifiye edilen pirol ve grafenden gelirken, spektrumda görülen diğer iki pikten fosforun (P) tampon çözeltiden, silisyumun (Si) ise çalışma elektrotundan geldiği düşünülmektedir (Kuralay ve Gürsoy 2020). PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotlara ait EDX spektrumu ve yüzey haritalamasında ise ilave olarak görülen tungsten (W) piki elektrot yüzeyine modifikasyonda kullanılan tungsten disülfürden (WS₂) kaynaklanmaktadır. Nanokompozit yüzeye GOx ve Urs enzimlerinin ilavesi sonrasında ise spektrumda oksijen (O) ve kükürt (S) piklerinin oluştuğu da görülmüştür.



Şekil 4. 22. PPy modifiye (A), PPy-grafen modifiye (B), PPy-grafen/WS₂ modifiye (C), GOx/PPy-grafen/WS₂ modifiye (D) ve Urs/PPy-grafen/WS₂ modifiye (E) elektrotlara ait EDX spektrumu ve temel haritalama

4.9.3. Elektrot yüzeylerinin X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) ile karakterizasyonu

PPy-grafen modifiye ve PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotlardaki elementleri ve yükseltgenme durumlarını belirlemek amacıyla X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) yöntemi kullanıldı. Şekil 4.23-A'da PPy-grafen modifiye elektrota ait XPS spektrumunda yer alan C 1s (284.95 eV), O 1s (532.19 eV) ve Si 2p (102.14 eV) piklerine ilave olarak Şekil 4.23-B'de W 4f (33.54 eV) ve S 2p (163.64 eV) pikleri de görülmektedir. Bu da PPy-grafen modifiye elektrota WS₂'nin katkısını göstermektedir (Dong ve ark. 2022). Ayrıca elde edilen XPS sonuçlarının EDX ile elde edilen spektrumdaki sonuçları da desteklediği görüldü.

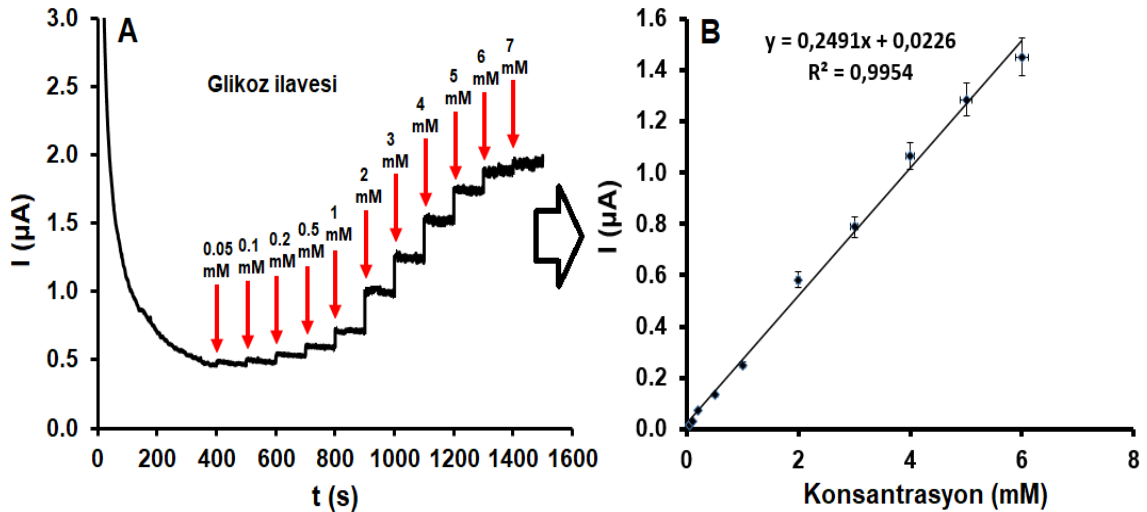


Şekil 4. 23. A) PPy-grafen@PGE ve B) PPy-grafen/WS₂@PGE'nin XPS spektrumları

4.10. Glikoz Tayini İçin Yapılan Amperometrik Çalışmalar

4.10.1. Glukoz konsantrasyonunun biyosensör yanıtına etkisi

Optimizasyonu tamamlanan GOx ve Urs modifiye enzim elektrotlar yardımıyla kronoamperometri yöntemi kullanılarak glikoz ve üre tayini çalışmaları yapıldı. Şekil 4.24-A ve Şekil 4.24-B'de glikozun amperometrik yanıt eğrileri ve kalibrasyon eğrisi verilmiştir. Glikoz tayini yapılırken önce GOx/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotlar glukoz içermeyen boş fosfat tamponuna daldırıldı ve denge akımı oluşuncaya kadar beklendi. Daha sonra hücre içi glikoz konsantrasyonu artacak şekilde sabit karıştırma altında glikoz ilaveleri yapıldı. Her bir ilaveden sonra 100 sn beklenerek akım değerleri okundu. Bu şekilde lineer glikoz konsantrasyon aralığı 0.05 mM ile 7 mM arasında belirlendi ve teşhis sınırı (LOD) 12.3 µM (n=3) olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar enzim immobilizasyonunun kararlı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Çizelge 4.1'de GOx/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun literatürdeki bazı GOx tabanlı elektrotlarla analitik performansı karşılaştırılmıştır. Sonuçlar geliştirilen GOx/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun literatürdeki çoğu GOx modifiye elektrota göre geniş bir lineer konsantrasyon aralığına ve düşük teşhis sınırına sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 24. A) Ardışık glikoz ilavesi sonrası GOx/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun fosfat tamponundaki (pH 7.4) amperometrik yanıt eğrisi, B) Glikoz biyosensörünün kalibrasyon grafiği (Hata çubukları, 3 sıralı deneyden elde edilen standart sapmaları göstermektedir)

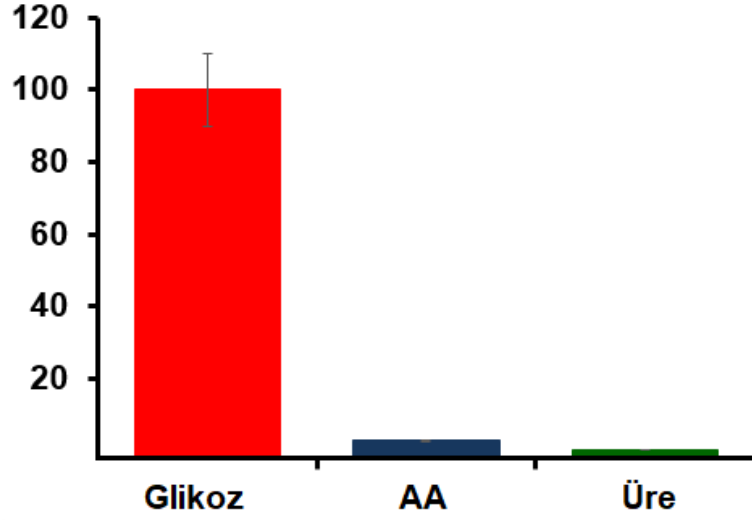
Çizelge 4.1. GOx modifiye çeşitli glikoz biyosensörlerinin analitik performanslarının karşılaştırılması

Glikoz Biyosensörü: Elektrot Modifikasyonu	Linear Aralık (mM)	LOD (μM)	Referans
GOx/GR/PANI:rGO	0.5-50.0	89	Popov ve ark., 2021
GOx/ PANI/rGO/GE	0.1-8.5	0.7	Xia ve ark., 2015
GOx/CC/PANI-NWs	1.0-8.0	50	Hornig ve ark., 2009
GOx/Au/PANI:PAA	0.1-1.3	24	Kuwahara ve ark., 2018
GOx/G	0.1-10.0	10	Wu ve ark., 2010
GOx/rGO:C60	0.1-12.5	35	Thirumalraj ve ark., 2015
GOx/Pt/rGO/P3ABA	0.25-6.0	44.3	Phetsang ve ark., 2019
GOx/PPy-graphene/WS ₂	0.05-7.0	12.3	Bu çalışma

GOx: glikoz oksidaz, GR: grafit çubuk, PANI: polianilin, rGO: indirgenmiş grafen oksit, PANI-NWs: polianilin nanoteller, CC: karbon bezi, Au: altın, PAA: poli(akrilik asit); G, grafen; C60, fulleren-C60, P3ABA: poli(3-aminobenzoik asit).

4.10.2. GOx/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun seçiciliği

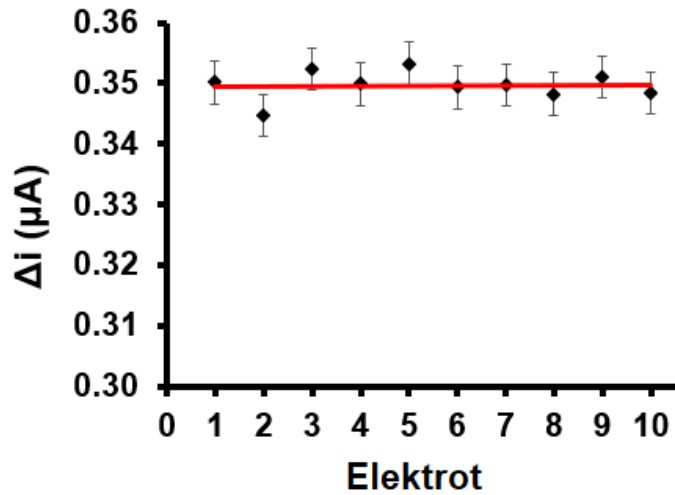
Amperometrik biyosensörlerin tasarımındaki sorunlardan biri, girişim yapabilecek maddelerin varlığında analitin tespitini yapabilmektir. Bu amaçla glikoz için girişim oluşturabilecek askorbik asit (AA) ve üre gibi maddelerin varlığında GOx/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun glikoza karşı seçiciliği araştırıldı. Bunun için boş fosfat tamponu içerisine denge akımı oluşuncaya kadar beklendikten sonra belirli aralıklarla önce glikoz eklendi ardından 0.1 mM AA ve 0.1 mM üre eklenerek akımdaki değişim takip edildi. Askorbik asit ilavesi sonrasında akımda %2.8'lik bir artış olurken, üre ilavesinden sonra akımın %0.2 gibi düşük bir artış gösterdiği belirlendi (Şekil 4.25).



Şekil 4. 25. Girişim yapan türlerin glikoz tespiti için amperometrik akımlarını gösteren çubuk diyagramlar (n=3)

4.10.3. GOx/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun tekrar üretilebilirliği

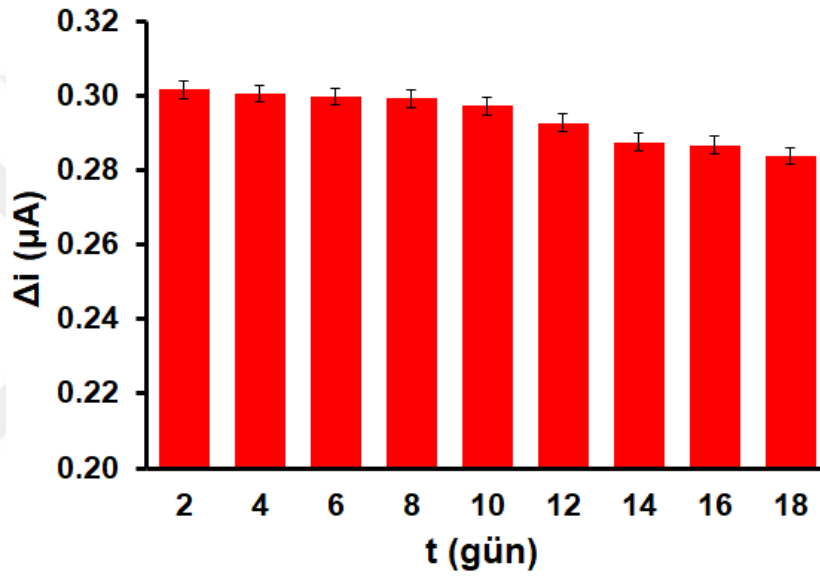
Hazırlanan glikoz biyosensörünün tekrar üretilebilirliğinin belirlenmesi amacıyla optimum koşullarda GOx/PPy-grafen/WS₂ modifiye 10 tane elektrot hazırlandı. Daha sonra boş fosfat tamponu içerisinde denge akımı oluşuncaya kadar beklendikten sonra glikoz eklenerek akım değerlerindeki değişimler belirlendi. Şekil 4.26' da görüldüğü gibi GOx/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotların glikoz tayinine karşı tekrarlanabilirliğinin olduğu görülmektedir.



Şekil 4. 26. Glikoz ilavesi (1 mM) için GOx/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun tekrarlanabilirliği (n=3)

4.10.4. GOx/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun kararlılığı

GOx/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun raf ömrünün tespit edilmesi amacıyla optimum koşullarda elektrotlar hazırlandı. Glikoz içermeyen boş fosfat tamponu içerisinde denge akımı oluşuncaya kadar beklendikten sonra glikoz eklenerek toplam 18 gün boyunca farklı günlerde akım değerlerindeki değişim gözlemlendi (Şekil 4.27). 18. günün sonunda glikoz biyosensörünün akım değerinde %5.8'lik bir düşüş olduğu belirlendi.



Şekil 4. 27. GOx/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun kararlılığı (n=3)

4.10.5. GOx/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotla gerçek numune analizi

Hazırlanan glikoz biyosensörünün güvenilirliği ve uygulanabilirliği, seyreltilmiş ticari serum örneğinde gerçekleştirildi. Bunun için seyreltilmiş serum örneklerinde son glikoz konsantrasyonu 1 mM ve 4 mM olacak şekilde glikoz eklenerek geri kazanım yapıldı. 1 mM glikoz için %98.9 ve 4 mM glikoz için %98.8'lik geri kazanımlar elde edildi (Çizelge 4.2). Elde edilen sonuçlar GOx modifiye elektrotun glikozun tespitine yönelik pratik bir uygulamaya sahip olduğunu göstermektedir.

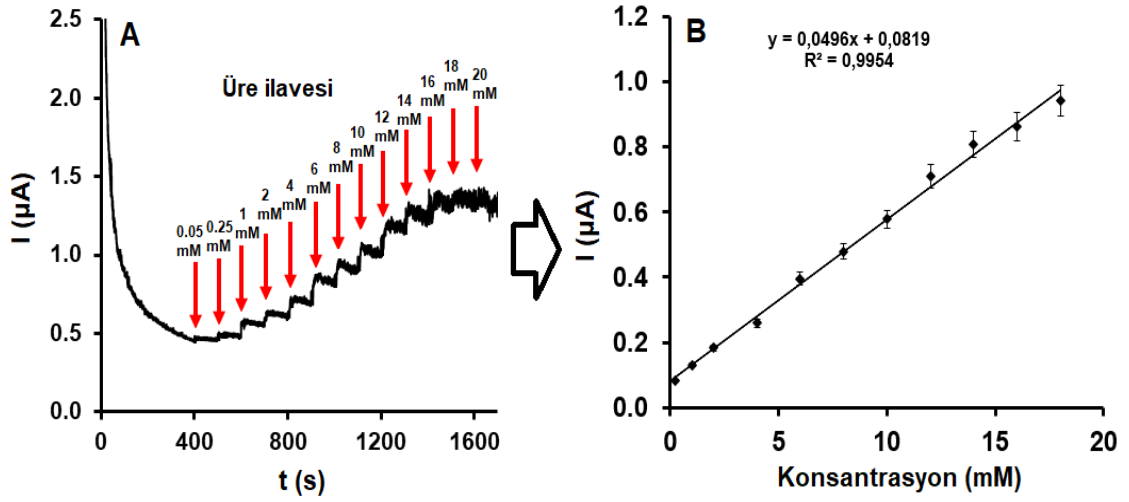
Çizelge 4.2. GOx/PPy-grafen/WS₂ bazlı biyosensör kullanılarak seyreltilmiş serum örneklerinde glikoz tayini (n=3)

Örnek	Eklenen (mM)	Bulunan (mM)	Geri Kazanım (%)
1	1	0.989	98.9
2	4	3.952	98.8

4.11. Üre Tayini İçin Yapılan Amperometrik Çalışmalar

4.11.1. Üre konsantrasyonunun biyosensör yanıtına etkisi

Üre konsantrasyonundaki değişimin ürenin amperometrik yanıtına etkisini belirlemek amacıyla önce optimum koşullarda Urs/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotlar hazırlandı. Ardından elektrotlar üre içermeyen boş fosfat tamponuna daldırıldı ve denge akımı oluşuncaya kadar beklendi. Daha sonra hücre içi üre konsantrasyonu artacak şekilde sabit karıştırma altında üre ilaveleri yapıldı. Her bir ilaveden sonra 100 sn beklenerek akım değerleri okundu. Şekil 4.28-A ve Şekil 4.28-B’de ürenin amperometrik yanıt eğrileri ve kalibrasyon eğrisi verilmiştir. Üre için lineer çalışma aralığı 0.25 mM ile 18 mM olarak belirlendi ve LOD değeri 30.1 µM (n=3) olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar enzim immobilizasyonunun kararlı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Çizelge 4.3’de ise Urs/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun literatürdeki bazı Urs tabanlı elektrotlarla analitik performansı karşılaştırıldı. Sonuçlar geliştirilen Urs/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun literatürdeki çoğu Urs modifiye elektrota göre geniş bir lineer konsantrasyon aralığına ve düşük tayin limitine sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 28. Ardışık üre ilavesi sonrası Urs/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun fosfat tamponundaki (pH 7.4) amperometrik yanıt eğrisi, B) Üre biyosensörünün kalibrasyon grafiği (Hata çubukları, 3 sıralı deneyden elde edilen standart sapmaları göstermektedir)

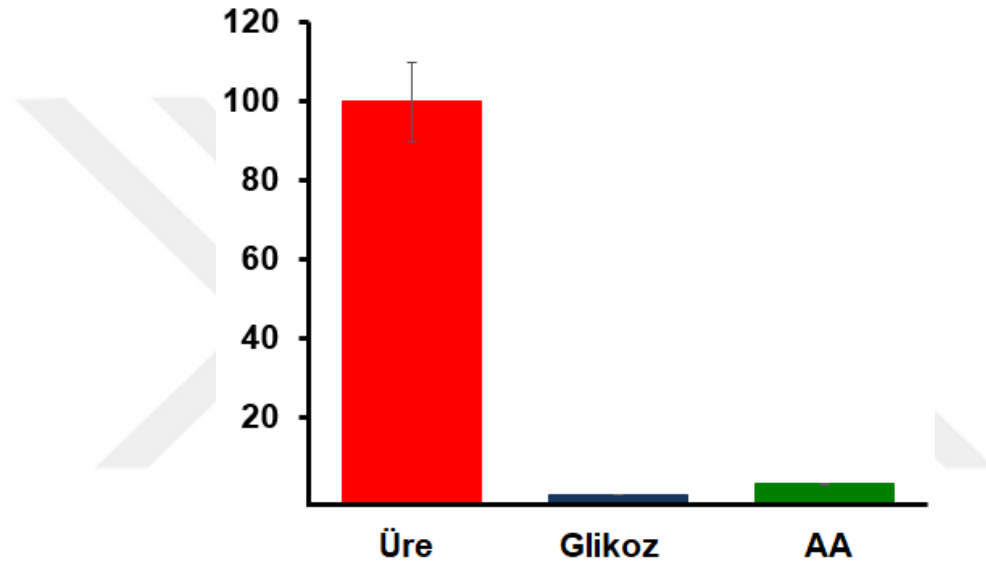
Çizelge 4.3. Urs modifiye çeşitli üre biyosensörlerinin analitik performanslarının karşılaştırılması

Üre Biyosensörü: Elektrot Modifikasyonu	Linear Aralık (mM)	LOD (µM)	Referans
Urs/PANI/MWCNTs/Nf	1.0-4.0	-	Singh ve ark., 2017
Urease/PANI/MWCNTs	0.01-10.0	40	Meibodi ve ark., 2014
Urease/MWCNT-PAMAM	1.0-20.0	400	Maity ve ark., 2019
Urs/SG/PANI	0.12-12.3	50	Das ve ark, 2015
Urease/Fe ₃ O ₄ /MWCNT/PANI-Nafion	1.0-25.0	67	Singh ve ark., 2020
Urease ₄ /Fc-PAMAM(G3)/MWCNT	0.2-1.8	50	Dervisevic ve ark., 2017
Urease /MWCNT/PoT	0.1-11.0	30	Hassan ve ark., 2018
Urs/PPy-graphene/WS ₂	0.25-18.0	30.1	Bu çalışma

PANI: polianilin, MWCNTs: çok duvarlı karbon nanotüpler, Nf: nafyon, PAMAM: poliamidoamin; SG: sülfolanmış grafen, Fc-PAMAM: ferrosen-poli(amidoamin), PoT: poli(*o*-toluidin).

4.11.2. Urs/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun seçiciliği

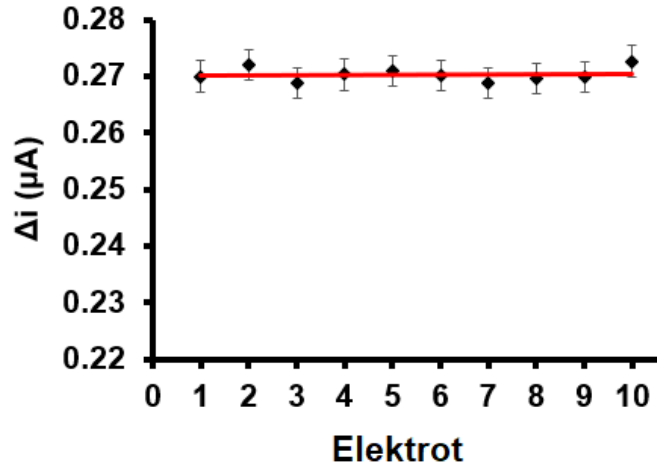
Girişim yapabilecek türlerin varlığında ürenin tespitini yapabilmek amacıyla optimum koşullarda Urs/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrot hazırlanarak üre içermeyen boş fosfat tamponu içerisine daldırılıp denge akımı oluşuncaya kadar beklendikten sonra belirli aralıklarla önce üre eklendi ardından 0.1 mM glikoz sonra 0.1 mM AA eklenerek akımdaki değişim takip edildi. Glikoz ilavesi sonrasında akımdaki değişim %0.5 iken, AA ilavesi sonrasında akımın %3.1 arttığı belirlendi (Şekil 4.29).



Şekil 4. 29. Girişim yapan türlerin üre tespiti için amperometrik akımlarını gösteren çubuk diyagramlar (n=3)

4.11.3. Urs/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun tekrar üretilebilirliği

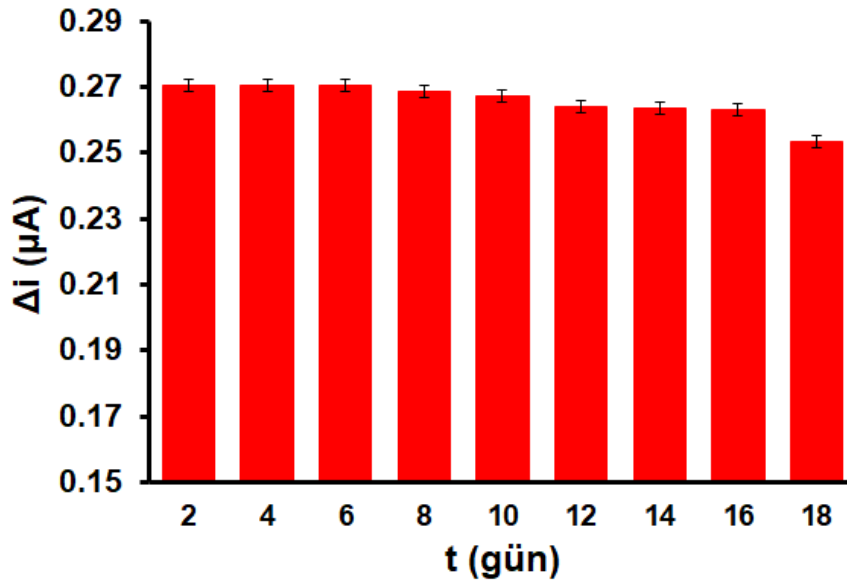
Hazırlanan üre biyosensörünün tekrar üretilebilirliğinin belirlenmesi amacıyla optimum koşullarda Urs/PPy-grafen/WS₂ modifiye 10 tane elektrot hazırlandı. Daha sonra üre içermeyen boş fosfat tamponu içerisine denge akımı oluşuncaya kadar beklendikten sonra üre eklenerek akım değerlerindeki değişimler belirlendi. Şekil 4.30' da görüldüğü gibi Urs/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotların üre tayinine karşı tekrarlanabilirliğinin olduğu görülmektedir.



Şekil 4. 30. Üre ilavesi (4 mM) için Urs/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun tekrarlanabilirliği (n=3)

4.11.4. Urs/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun kararlılığı

Urs/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun raf ömrünün tespit edilmesi amacıyla optimum koşullarda elektrotlar hazırlandı. Üre içermeyen boş fosfat tamponu içerisinde denge akımı oluşuncaya kadar beklendikten sonra üre eklenerek toplam 18 gün boyunca farklı günlerde akım değerlerindeki değişim gözlemlendi (Şekil 4.31). 18. günün sonunda üre biyosensörünün akım değerinde %6.4'lük bir düşüş belirlendi.



Şekil 4. 31. Urs/PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotun kararlılığı (n=3)

4.11.5. Urs/PPy-grafen/WS₂ Modifiye Elektrotla Gerçek Numune Analizi

Üre biyosensörünün güvenilirliği ve uygulanabilirliğinin belirlenmesi amacıyla ilk aşamada idrar örneği önce süzülüp ardından tampon ile seyreltildi. Bu şekilde elde edilen idrar örneklerine son konsantrasyonu 1 mM ve 4 mM olacak şekilde üre eklendi ve amperometrik yanıtlar ölçüldü. Çizelge 4.4'te görüldüğü üzere geri kazanımlar 1 mM üre için %95.1 ve 4 mM üre için %101.1 olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Urs modifiye elektrotun ürenin tespitine yönelik pratik bir uygulamaya sahip olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.4. Urs/PPy-grafen/WS₂ bazlı biyosensör kullanılarak seyreltilmiş idrar örneklerinde üre tayini (n=3)

Örnek	Eklenen (mM)	Bulunan (mM)	Geri Kazanım (%)
1	1	0.951	95.1
2	4	4.04	101.1

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında glikoz ve üre gibi çeşitli analitlerin tayinini yapabilmek için kalem grafit elektrotlar üzerine önce PPy-grafen/WS₂ nanokompozit yapısı oluşturulup ardından glikoz oksidaz ve üreaz enzimlerinin de immobilize edilmesiyle üretimi basit, maliyeti düşük, kararlı yapılı enzim elektrotlar geliştirildi. Bu kapsamda ilk olarak girişim azaltıcı etkisi bulunduğu bilinen polipirol ve poli(*o*-fenilendiamin) polimerlerinin grafen içeren kompozitleri oluşturularak CV metodu kullanılarak elektrokimyasal davranışları karşılaştırıldı. Ardından elektrokimyasal davranışı daha iyi olan PPy-grafen modifiye kalem grafit elektrotun geliştirilmesi amacıyla grafen ile oluşturduğu sinerjik etki nedeniyle WS₂'nin de yapıya eklenmesiyle PPy-grafen/WS₂ nanokompozit elektrot elde edildi. Hazırlanan elektrotun elektrokimyasal davranışı CV ve EIS metotları kullanılarak modifiye edilmemiş PGE, PPy modifiye PGE ve PPy-grafen modifiye PGE'ler ile karşılaştırıldı. PPy-grafen/WS₂ modifiye elektrotlara GOx ve Urs enzimleri glutaraldehit çapraz bağlayıcısı kullanılarak immobilize edildi. Hazırlanan elektrotların yüzey morfolojileri ve elementel bileşimleri SEM, EDX ve XPS metotları kullanılarak belirlendi. Enzim modifiye elektrotlar oluşturulurken enzimin çalışma performansını etkileyen önemli faktörler arasında yer alan enzim konsantrasyonu, enzim immobilizasyon süresi ve ortamın pH'ı gibi parametreler araştırılarak optimum çalışma koşulları belirlendi. Geliştirilen elektrotlar ile glikoz ve ürenin amperometrik tayini gerçekleştirildi. Her iki enzim elektrotun da geniş bir lineer konsantrasyon aralığında düşük teşhis sınırına sahip olduğu (glikoz biyosensörü için çalışma aralığı 0.05 mM ile 7 mM ve teşhis sınırı 12.3 µM; üre biyosensörü için çalışma aralığı 0.25 mM'den 18 mM ve teşhis sınırı 30.1 µM), girişim yapan türlerin akıma etkilerinin düşük olduğu ve kararlılıklarının uzun süreli olduğu belirlendi. Ayrıca geri kazanım deneyleri başarı ile yapıldı.

6. KAYNAKLAR

- Ahuja, T., Mir, I. A., & Kumar, D. (2007). Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. *Biomaterials*, 28(5), 791-805.
- Aini, B. N., Siddiquee, S., Ampon, K., Rodrigues, K. F., & Suryani, S. (2015). Development of glucose biosensor based on ZnO nanoparticles film and glucose oxidase-immobilized eggshell membrane. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 4, 46-56.
- Akyılmaz, E. (2002). Alkol tayinine yönelik biyosensör geliştirilmesi (Doctoral dissertation, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova-İzmir).
- Altuntaş, D. B., & Kuralay, F. (2021). MoS₂/Chitosan/GOx-Gelatin modified graphite surface: Preparation, characterization and its use for glucose determination. *Materials Science and Engineering: B*, 270, 115215.
- Alwarappan, S., Boyapalle, S., Kumar, A., Li, C. Z., & Mohapatra, S. (2012). Comparative study of single-, few-, and multilayered graphene toward enzyme conjugation and electrochemical response. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116(11), 6556-6559.
- Alwarappan, S., Erdem, A., Liu, C., & Li, C. Z. (2009). Probing the electrochemical properties of graphene nanosheets for biosensing applications. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(20), 8853-8857.
- Anakok, D. A., & Cete, S. (2021). A New Surface Based on Graphene Modified with Nanoparticles and Nafion for the Detection of Glucose. *Russian Journal of Electrochemistry*, 57(12), 1186-1195.
- Anbazzhagan, R., Su, Y. A., Tsai, H. C., & Jeng, R. J. (2016). MoS₂-Gd chelate magnetic nanomaterials with core-shell structure used as contrast agents in in vivo magnetic resonance imaging. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(3), 1827-1835.
- Appel, G., Schmeißer, D., Bauer, J., Bauer, M., Egelhaaf, H. J., & Oelkrug, D. (1999). The formation of oligomers in the electrolyte upon polymerization of pyrrole. *Synthetic Metals*, 99(1), 69-77.
- Ashakirin, S. N., Haniff, M. A. S. M., Zaid, M. H. M., Razipwee, M. F. M., & Mahmoudi, E. (2022). Urease immobilized electrodeposited silver reduce graphene oxide modified screen-printed carbon electrode for highly urea detection. *Measurement*, 196, 111058.
- Atan, Ç. (2013). ZnO nanorod temelli glukoz biyosensörü hazırlanması ve kan serumunda glukoz tayininde kullanılması.
- Babkina, E., Chigrinova, E., Ponamoreva, O. G., Alferov, V., & Reshetilov, A. (2006). Bioelectrocatalytic oxidation of glucose by immobilized bacteria *Gluconobacter oxydans*. Evaluation of water-insoluble mediator efficiency. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 18(19-20), 2023-2029.
- Bae, S., Kim, H., Lee, Y., Xu, X., Park, J., Zheng, Y., Balakrishnan, J., Lei, T., Kim, H. R., Song, Y., Kim, Y., Kim, K., Özyılmaz, B., Ahn, J. H., Hong, B. H., Lijima, S. (2010). Roll-to-roll production of 30-inch graphene films for transparent electrodes. *Nature Nanotechnology*, 5: 574-578.

- Baghayeri, M., Veisi, H., & Ghanei-Motlagh, M. (2017). Amperometric glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase on a magnetic glassy carbon electrode modified with a novel magnetic nanocomposite. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 249, 321-330.
- Bahadır, E. B., & Sezgintürk, M. K. (2016). Applications of graphene in electrochemical sensing and biosensing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 76, 1-14.
- Bal, Ö. (2012). Biyolojik sıvılardaki glikozun tayini için polipirol filme glikoz oksidaz enziminin immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Balcı, M. (2020). Nanoselüloz ve Bor Nitrit Katkılı Polimer Kompozitlerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Eskişehir, 136.
- Bard, A. J., & Faulkner, L. R. (2001). Fundamentals and applications. *Electrochemical Methods*, 2(482), 580-632.
- Berghian-Grosan, C., Biris, A. R., Coros, M., Pogacean, F., & Pruneanu, S. (2015). Electrochemical and spectroscopic studies of ssDNA damage induced by hydrogen peroxide using graphene based nanomaterials. *Talanta*, 138, 209-217.
- Bozgeyik, İ., Şenel, M., Çevik, E., & Abasıyanık, M. F. (2011). A novel thin film amperometric urea biosensor based on urease-immobilized on poly(N-glycidylpyrrole-co-pyrrole). *Current Applied Physics*, 11(4), 1083-1088.
- Can, F. (2010). Glukoz oksidaz enziminin iletken polimerlere immobilizasyonu ve karakterizasyonu (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Cete, S., Ozyurt, M., Yildirim, E., & Akin, D. (2020). A novel biosensor with the use of polypyrrole-poly (sodium-4-styrenesulphonate) as a dopant in the determination of glucose. *Chemical Papers*, 74, 799-808.
- Cha, C., Shin, S. R., Annabi, N., Dokmeci, M. R., & Khademhosseini, A. (2013). Carbon-based nanomaterials: multifunctional materials for biomedical engineering. *ACS Nano*, 7(4), 2891-2897.
- Chen, C., Jiang, Y., & Kan, J. (2006). A noninterference polypyrrole glucose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(5), 639-643.
- Chen, C., Xie, Q., Yang, D., Xiao, H., Fu, Y., Tan, Y., & Yao, S. (2013). Recent advances in electrochemical glucose biosensors: a review. *RSC Advances*, 3(14), 4473-4491.
- Cheng, L., Liu, J., Gu, X., Gong, H., Shi, X., Liu, T., ... & Liu, Z. (2014). PEGylated WS₂ nanosheets as a multifunctional theranostic agent for in vivo dual-modal CT/photoacoustic imaging guided photothermal therapy. *Advanced Materials*, 26(12), 1886-1893.
- Clark Jr, L. C., & Clark, E. W. (1973). Differential anodic enzyme polarography for the measurement of glucose. In *Oxygen Transport to Tissue: Instrumentation, Methods, and Physiology* (pp. 127-133). Boston, MA: Springer US.
- Clark, L. C. (1956). Monitor and control of tissue O₂ tensions. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, 2, 41-48.
- Clark, L.C. and Lyons, C. (1962). Electrode Systems for Continuous Monitoring Cardiovascular Surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102, 29-45.
- Comba, F. N., Rubianes, M. D., Herrasti, P., & Rivas, G. A. (2010). Glucose biosensing at carbon paste electrodes containing iron nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 149(1), 306-309.

- Cornell, B. A., Braach-Maksvytis, V. L. B., King, L. G., Osman, P. D. J., Raguse, B., Wieczorek, L., & Pace, R. J. (1997). A biosensor that uses ion-channel switches. *Nature*, 387(6633), 580-583.
- Çabuk, S. N. (2020). Atık kumaştan üretilen heteroatom katkılı aktif karbonun süperkapasitör performansı (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Çankaya, N., & Sökmen, Ö. (2021). Polimerler-kil nanokompozitlerinde kullanılan bazı yüzey analiz yöntemleri. *Teknik Bilimler Dergisi*, 11(1), 20-32.
- Çoğal, S. (2017). Grafen oksit-polianilin nanokompozit temelli amperometrik glikoz biyosensörü geliştirilmesi. *Akademik Gıda*, 15(2), 124-129.
- Dall'Olio, A., Dascola, G., Varacca, V., Bocchi, V. (1968). Resonance paramagnetique electronique et conductivite d'un noir d'oxypyrrrol electrolytique. *Comptes Rendus Chimie (Sciences Chimiques)* 267: 433-435.
- Das, G., & Yoon, H. H. (2015). Amperometric urea biosensors based on sulfonated graphene/polyaniline nanocomposite. *International Journal of Nanomedicine*, 10(sup1), 55-66.
- D'costa, E. J., Higgins, I. J., & Turner, A. P. F. (1986). Quinoprotein glucose dehydrogenase and its application in an amperometric glucose sensor. *Biosensors*, 2(2), 71-87.
- Dervisevic, E., Dervisevic, M., Nyangwebah, J. N., & Şenel, M. (2017). Development of novel amperometric urea biosensor based on Fc-PAMAM and MWCNT bio-nanocomposite film. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 246, 920-926.
- Dervisevic, M., Dervisevic, E., & Şenel, M. (2018). Design of amperometric urea biosensor based on self-assembled monolayer of cystamine/PAMAM-grafted MWCNT/Urease. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 254, 93-101.
- Dervisevic, M., Dervisevic, E., Senel, M., Cevik, E., Yildiz, H. B., & Camurlu, P. (2017). Construction of ferrocene modified conducting polymer based amperometric urea biosensor. *Enzyme and microbial technology*, 102, 53-59.
- Dhillon, S., & Kant, R. (2017). Theory for electrochemical impedance spectroscopy of heterogeneous electrode with distributed capacitance and charge transfer resistance. *Journal of Chemical Sciences*, 129, 1277-1292.
- Dong, S., Niu, H., Sun, L., Zhang, S., Wu, D., Yang, Z., & Xiang, M. (2022). Highly dense Ni-MOF nanoflake arrays supported on conductive graphene/carbon fiber substrate as flexible microelectrode for electrochemical sensing of glucose. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 911, 116219.
- D'souza, S. F. (2001). Microbial biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(6), 337-353.
- Echlin, P. (2011). Handbook of sample preparation for scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. Springer Science & Business Media.
- Emir, G., Dilgin, Y., Ramanaviciene, A., & Ramanavicius, A. (2021). Amperometric nonenzymatic glucose biosensor based on graphite rod electrode modified by Ni-nanoparticle/polypyrrole composite. *Microchemical Journal*, 161, 105751.
- Erdem, A., Muti, M., Papakonstantinou, P., Canavar, E., Karadeniz, H., Congur, G., & Sharma, S. (2012). Graphene oxide integrated sensor for electrochemical monitoring of mitomycin C–DNA interaction. *Analyst*, 137(9), 2129-2135.
- Feng, X., Cheng, H., Pan, Y., & Zheng, H. (2015). Development of glucose biosensors based on nanostructured graphene-conducting polyaniline composite. *Biosensors and Bioelectronics*, 70, 411-417.

- Ferri, S., Kojima, K., & Sode, K. (2011). Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: a bird's eye view of glucose sensing enzymes. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 5(5), 1068-1076.
- Gade, V. K., Shirale, D. J., Gaikwad, P. D., Savale, P. A., Kakde, K. P., Kharat, H. J., & Shirsat, M. D. (2006). Immobilization of GOD on electrochemically synthesized Ppy-PVS composite film by cross-linking via glutaraldehyde for determination of glucose. *Reactive and Functional Polymers*, 66(12), 1420-1426.
- Gao, Z., Xie, F., Shariff, M., Arshad, M., & Ying, J. Y. (2005). A disposable glucose biosensor based on diffusional mediator dispersed in nanoparticulate membrane on screen-printed carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 111, 339-346.
- Gerard, M., Chaubey, A., & Malhotra, B. D. (2002). Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 17(5), 345-359.
- Gerhartz, W. (1990). *Enzymes in industry: production and applications*. Vch Verlagsgesellschaft mbH.
- Gerrard, M., Gibbons, F. X., Reis-Bergan, M., Trudeau, L., Vande Lune, L. S., & Buunk, B. (2002). Inhibitory effects of drinker and nondrinker prototypes on adolescent alcohol consumption. *Health Psychology*, 21(6), 601.
- Gokoglan, T. C., Soylemez, S., Kesik, M., Dogru, I. B., Turel, O., Yuksel, R., ... & Toppare, L. (2017). A novel approach for the fabrication of a flexible glucose biosensor: the combination of vertically aligned CNTs and a conjugated polymer. *Food Chemistry*, 220, 299-305.
- Gülce, A., & Gülce, H. (2005). Polyvinylferrocenium modified Pt electrode for anaerobic glucose monitoring. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 62(1), 81-92.
- Güngör, M. A., Kaya, H. K., & Kuralay, F. (2022). WS₂ integrated PEDOT: PSS interface as a sensitive and selective voltammetric epirubicin detection platform and a functional actuator. *Surfaces and Interfaces*, 30, 101839.
- Habermüller, K., Mosbach, M., & Schuhmann, W. (2000). Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366, 560-568.
- Hassan, R. Y., Kamel, A. M., Hashem, M. S., Hassan, H. N., & Abd El-Ghaffar, M. A. (2018). A new disposable biosensor platform: carbon nanotube/poly(o-toluidine) nanocomposite for direct biosensing of urea. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 22, 1817-1823.
- He, C., Xie, M., Hong, F., Chai, X., Mi, H., Zhou, X., ... & Liu, J. (2016). A highly sensitive glucose biosensor based on gold nanoparticles/bovine serum albumin/Fe₃O₄ biocomposite nanoparticles. *Electrochimica Acta*, 222, 1709-1715.
- Heinze, J. (1984). Cyclic voltammetry—"electrochemical spectroscopy". *New analytical methods (25)*. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 23(11), 831-847.
- Hornig, Y. Y., Hsu, Y. K., Ganguly, A., Chen, C. C., Chen, L. C., & Chen, K. H. (2009). Direct-growth of polyaniline nanowires for enzyme-immobilization and glucose detection. *Electrochemistry Communications*, 11(4), 850-853.
- Hosseinian, M., Najafpour, G., & Rahimpour, A. (2019). Amperometric urea biosensor based on immobilized urease on polypyrrole and macroporous polypyrrole modified Pt electrode. *Turkish Journal of Chemistry*, 43(4), 1063-1074.

- Hsiao, P. F., Anbazhagan, R., Tsai, H. C., Lin, S. J., Lin, S. Y., Lee, K. Y., ... & Lai, J. Y. (2020). Fabrication of electroactive polypyrrole-tungsten disulfide nanocomposite for enhanced in vivo drug release in mice skin. *Materials Science and Engineering: C*, 107, 110330.
- Huang, K. J., Wang, L., Li, J., Gan, T., & Liu, Y. M. (2013). Glassy carbon electrode modified with glucose oxidase–graphene–nano-copper composite film for glucose sensing. *Measurement*, 46(1), 378-383.
- Hummers Jr, W. S., & Offeman, R. E. (1958). Preparation of graphitic oxide. *Journal of the American Chemical Society*, 80(6), 1339-1339.
- Imanishi, K., Satoh, M., Yasuda, Y., Tsushima, R., & Aoki, S. (1988). Solvent effect on electrochemical polymerization of aromatic compounds. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 242(1-2), 203-208.
- Izadyar, A., Van, M. N., Rodriguez, K. A., Seok, I., & Hood, E. E. (2021). A bienzymatic amperometric glucose biosensor based on using a novel recombinant Mn peroxidase from corn and glucose oxidase with a Nafion membrane. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 895, 115387.
- Jadoun, S., Riaz, U., Yanez, J., & Chauhan, N. P. S. (2021). Synthesis, characterization and potential applications of poly(*o*-phenylenediamine) based copolymers and Nanocomposites: A comprehensive review. *European Polymer Journal*, 156, 110600.
- Kadian, S., Arya, B. D., Kumar, S., Sharma, S. N., Chauhan, R. P., Srivastava, A., ... & Singh, S. P. (2018). Synthesis and application of PHT-TiO₂ nanohybrid for amperometric glucose detection in human saliva sample. *Electroanalysis*, 30(11), 2793-2802.
- Kausaite-Minkstiniene, A., Glumbokaite, L., Ramanaviciene, A., & Ramanavicius, A. (2020). Reagent-less amperometric glucose biosensor based on nanobiocomposite consisting of poly(1,10-phenanthroline-5,6-dione), poly(pyrrole-2-carboxylic acid), gold nanoparticles and glucose oxidase. *Microchemical Journal*, 154, 104665.
- Kausaite-Minkstiniene, A., Glumbokaite, L., Ramanaviciene, A., Dauksaite, E., & Ramanavicius, A. (2018). An amperometric glucose biosensor based on poly(pyrrole-2-carboxylic acid)/glucose oxidase biocomposite. *Electroanalysis*, 30(8), 1642-1652.
- Kaya, H. Z., Söylemez, S., Udum, Y. A., & Toppare, L. (2018). Application of an efficient amperometric glucose sensing electrode based on a bilayer polymer film platform. *Journal of The Electrochemical Society*, 165(16), B939.
- Khan, R., & Dhayal, M. (2009). Chitosan/polyaniline hybrid conducting biopolymer base impedimetric immunosensor to detect Ochratoxin-A. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(6), 1700-1705.
- Kumar, V., Chopra, A., Arora, S., Yadav, S., Kumar, S., & Kaur, I. (2015). Amperometric sensing of urea using edge activated graphene nanoplatelets. *RSC Advances*, 5(18), 13278-13284.
- Kuralay, F., & Gürsoy, T. (2020). Direct electrochemistry and sensitive detection of guanosine on nanopolymeric surfaces bearing boronic acid groups. *ChemistrySelect*, 5(29), 9134-9142.
- Kuralay, F., Erdem Gürsan, K. A., Abacı, S., Ozyoruk, H., & Yildiz, A., (2009). Poly(vinylferrocenium) coated disposable pencil graphite electrode for DNA hybridization. *Electrochemistry Communications*, 11(6), 1242-1246.

- Kuralay, F., Erdem, A., Abacı, S., Özyörük, H., Yıldız, A. (2009). Characterization of redox polymer based electrode and electrochemical behavior for DNA detection. *Analytica Chimica Acta*, 643: 83-89.
- Kuralay, F., Özyörük, H., & Yıldız, A. (2005). Potentiometric enzyme electrode for urea determination using immobilized urease in poly (vinylferrocenium) film. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 109(2), 194-199.
- Kuralay, F., Özyörük, H., & Yıldız, A. (2006). Amperometric enzyme electrode for urea determination using immobilized urease in poly (vinylferrocenium) film. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114(1), 500-506.
- Kuralay, F., Tunç, S., Bozduman, F., Oksuz, L., & Oksuz, A. U. (2016). Biosensing applications of titanium dioxide coated graphene modified disposable electrodes. *Talanta*, 160, 325–331.
- Kuralay, F., Demirci, S. (2016). *Elektrokimyasal Biyosensörler. Afinite Temelli Biyosensörler* (Ed. A. Denizli), Ankara, ISBN: 978-605-88783-1-0, s. 85-95.
- Kuwahara, T., Ogawa, K., Sumita, D., Kondo, M., & Shimomura, M. (2018). Amperometric glucose sensing with polyaniline/poly(acrylic acid) composite film bearing glucose oxidase and catalase based on competitive oxygen consumption reactions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 811, 62-67.
- Lee, M., Kim, S., Jang, M., Park, H. S., & Lee, J. Y. (2021). One-Pot electrochemical fabrication of high performance amperometric enzymatic biosensors using polypyrrole and polydopamine. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 97, 316-325.
- Lee, W. C., Kim, K. B., Gurudatt, N. G., Hussain, K. K., Choi, C. S., Park, D. S., & Shim, Y. B. (2019). Comparison of enzymatic and non-enzymatic glucose sensors based on hierarchical Au-Ni alloy with conductive polymer. *Biosensors and Bioelectronics*, 130, 48-54.
- Lee, Y. H., Lee, J. Y., & Lee, D. S. (2000). A novel conducting soluble polypyrrole composite with a polymeric co-dopant. *Synthetic Metals*, 114(3), 347-353.
- Lehninger, A. L. (1982). Proton and electric charge translocation in mitochondrial energy transduction. In *Structure and Function Relationships in Biochemical Systems* (pp. 171-186). Boston, MA: Springer US.
- Lehninger, A. L. (1993). "Principles of Biochemistry 2th Edition", Worth Publishers Inc., New York, 198-239.
- Luo, X., Killard, A. J., Morrin, A., & Smyth, M. R. (2006). Enhancement of a conducting polymer-based biosensor using carbon nanotube-doped polyaniline. *Analytica Chimica Acta*, 575(1), 39-44.
- Luppa, P. B., Sokoll, L. J., & Chan, D. W. (2001). Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 314(1-2), 1-26.
- Lv, R., Terrones, H., Elias, A. L., Perea-Lopez, N., Gutierrez, H. R., Cruz-Silva, E., ... & Terrones, M. (2015). Two-dimensional transition metal dichalcogenides: Clusters, ribbons, sheets and more. *Nano Today*, 10(5), 559-592.
- Maity, D., & Kumar, R. R. (2019). Highly sensitive amperometric detection of glutamate by glutamic oxidase immobilized Pt nanoparticle decorated multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs)/polypyrrole composite. *Biosensors and Bioelectronics*, 130, 307-314.
- Maity, D., Minitha, C. R., & RT, R. K. (2019). Glucose oxidase immobilized amine terminated multiwall carbon nanotubes/reduced graphene oxide/polyaniline/gold nanoparticles modified screen-printed carbon electrode for highly sensitive

- amperometric glucose detection. *Materials Science and Engineering: C*, 105, 110075.
- Masuda, T., Yoshikawa, H., Noguchi, H., Kawasaki, T., Kobata, M., Kobayashi, K., & Uosaki, K. (2013). In situ x-ray photoelectron spectroscopy for electrochemical reactions in ordinary solvents. *Applied Physics Letters*, 103(11), 111605.
- Mehdizadeh, B., Maleknia, L., Amirabadi, A., & Shabani, M. (2020). Glucose sensing by a glassy carbon electrode modified with glucose oxidase/chitosan/graphene oxide nanofibers. *Diamond and Related Materials*, 109, 108073.
- Meibodi, A. S. E., & Haghjoo, S. (2014). Amperometric urea biosensor based on covalently immobilized urease on an electrochemically polymerized film of polyaniline containing MWCNTs. *Synthetic Metals*, 194, 1-6.
- Mello, L. D., & Kubota, L. T. (2002). Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*, 77(2), 237-256.
- Meng L., Jing J., Yang G., Lu T., Zhang H., & Cai C. (2009). Nonenzymatic electrochemical detection of glucose based on palladium-single-walled carbon nanotube hybrid nanostructures. *Analytical Chemistry*, 81, 7271–7280.
- Mijowska, E., Onyszko, M., Urbas, K., Aleksandrak, M., Shi, X., Moszyński, D., ... & El Fray, M. (2015). Palladium nanoparticles deposited on graphene and its electrochemical performance for glucose sensing. *Applied Surface Science*, 355, 587-592.
- Mittal, S., Kaur, H., Gautam, N., & Mantha, A. K. (2017). Biosensors for breast cancer diagnosis: A review of bioreceptors, biotransducers and signal amplification strategies. *Biosensors and Bioelectronics*, 88, 217-231.
- Mobley, H. L., & Hausinger, R. P. (1989). Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiological Reviews*, 53(1), 85-108.
- Mondal, S., & Sangaranarayanan, M. V. (2013). A novel non-enzymatic sensor for urea using a polypyrrole-coated platinum electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 177, 478-486.
- Moon, I. K., Lee, J., Ruoff, R. S., & Lee, H. (2010). Reduced graphene oxide by chemical graphitization. *Nature Communications*, 1(1), 73.
- Muthirulan, P., Kannan, N., & Meenakshisundaram, M. (2013). Synthesis and corrosion protection properties of poly(*o*-phenylenediamine) nanofibers. *Journal of Advanced Research*, 4(4), 385-392.
- Nambiar, S., & Yeow, J. T. (2011). Conductive polymer-based sensors for biomedical applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5), 1825-1832.
- Namsheer, K., & Rout, C. S. (2021). Conducting polymers: A comprehensive review on recent advances in synthesis, properties and applications. *RSC Advances*, 11(10), 5659-5697.
- Nguyen, T. P., Sohn, W., Oh, J. H., Jang, H. W., & Kim, S. Y. (2016). Size-dependent properties of two-dimensional MoS₂ and WS₂. *The Journal of Physical Chemistry C*, 120(18), 10078-10085.
- Nia, S. M., Kheiri, F., Jannatdoust, E., Sirousazar, M., Chianeh, V. A., & Kheiri, G. (2021). A highly sensitive non-enzymatic urea sensor based on Ni(OH)₂/Mn₃O₄/rGO/PANi nanocomposites using screen-printed electrodes. *Journal of The Electrochemical Society*, 168(6), 067504.
- Novoselov, K. S., Geim, A. K., Morozov, S. V., Jiang, D. E., Zhang, Y., Dubonos, S. V., ... & Firsov, A. A. (2004). Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*, 306(5696), 666-669.

- Ojani, R., Hamidi, P., & Raoof, J. B. (2016). Efficient nonenzymatic hydrogen peroxide sensor in acidic media based on Prussian blue nanoparticles-modified poly(*o*-phenylenediamine)/glassy carbon electrode. *Chinese Chemical Letters*, 27(3), 481-486.
- Osuna, V., Vega-Rios, A., Zaragoza-Contreras, E. A., Estrada-Moreno, I. A., & Dominguez, R. B. (2022). Progress of polyaniline glucose sensors for diabetes mellitus management utilizing enzymatic and non-enzymatic detection. *Biosensors*, 12(3), 137.
- Ozdemir, N., Zengin, H., & Yavuz, A. (2020). Electropolymerization of pyrrole from a deep eutectic solvent for supercapacitor applications. *Materials Chemistry and Physics*, 256, 123645.
- Özbek, M. A., Yaşar, A., Çete, S., Er, E., & Erk, N. (2021). A novel biosensor based on graphene/platinum nanoparticles/Nafion composites for determination of glucose. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 25, 1601-1610.
- Özbek, O., & Isildak, Ö. (2021). Polymer-based cadmium (II)-selective potentiometric sensors for the analysis of Cd²⁺ in different environmental samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1-14.
- Özel, H. (2018). Electrochemical sensing of glucose using conjugated polymer/chitosan/MWCNT architecture [M.S. - Master of Science]. Middle East Technical University.
- Paleček, E., Fojta, M., Tomschik, M., & Wang, J. (1998). Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage. *Biosensors and Bioelectronics*, 13(6), 621-628.
- Pan, D., Chen, J., Yao, S., Tao, W., & Nie, L. (2005). An amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized in electropolymerized poly(*o*-aminophenol) and carbon nanotubes composite film on a gold electrode. *Analytical Sciences*, 21(4), 367-371.
- Pérez-López, B., & Merkoçi, A. (2012). Carbon nanotubes and graphene in analytical sciences. *Microchimica Acta*, 179, 1-16.
- Phetsang, S., Jakmunee, J., Mungkornasawakul, P., Laocharoensuk, R., & Ounnunkad, K. (2019). Sensitive amperometric biosensors for detection of glucose and cholesterol using a platinum/reduced graphene oxide/poly(3-aminobenzoic acid) film-modified screen-printed carbon electrode. *Bioelectrochemistry*, 127, 125-135.
- Pilo, M. I., Baluta, S., Loria, A. C., Sanna, G., & Spano, N. (2022). Poly(thiophene)/graphene oxide-modified electrodes for amperometric glucose biosensing. *Nanomaterials*, 12(16), 2840.
- Popov, A., Aukstakojyte, R., Gaidukevic, J., Lisyte, V., Kausaite-Minkstimiene, A., Barkauskas, J., & Ramanaviciene, A. (2021). Reduced graphene oxide and polyaniline nanofibers nanocomposite for the development of an amperometric glucose biosensor. *Sensors*, 21(3), 948.
- Rahman, M. A., Kumar, P., Park, D. S., & Shim, Y. B. (2008). Electrochemical sensors based on organic conjugated polymers. *Sensors*, 8(1), 118-141.
- Rahman, M. S., Hasan, M. R., Rikta, K. A., & Anower, M. S. (2018). A novel graphene coated surface plasmon resonance biosensor with tungsten disulfide (WS₂) for sensing DNA hybridization. *Optical Materials*, 75, 567-573.
- Ramanathan, K., & Danielsson, B. (2001). Principles and applications of thermal biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(6), 417-423.

- Ramanavičius, A., Ramanavičienė, A., & Malinauskas, A. (2006). Electrochemical sensors based on conducting polymer—polypyrrole. *Electrochimica Acta*, 51(27), 6025-6037.
- Robinson, P. K. (2015). *Enzymes: principles and biotechnological applications. Essays in Biochemistry*, 59, 1.
- Rohaizad, N., Mayorga-Martinez, C. C., Sofer, Z., & Pumera, M. (2017). 1T-phase transition metal dichalcogenides (MoS₂, MoSe₂, WS₂, and WSe₂) with fast heterogeneous electron transfer: application on second-generation enzyme-based biosensor. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(46), 40697-40706.
- Ronkainen, N. J., Halsall, H. B., & Heineman, W. R. (2010). Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 39(5), 1747-1763.
- Sabury, S., Kazemi, S. H., & Sharif, F. (2015). Graphene–gold nanoparticle composite: application as a good scaffold for construction of glucose oxidase biosensor. *Materials Science and Engineering: C*, 49, 297-304.
- Sahu, S., Shera, S. S., & Banik, R. M. (2019). Enhanced reusability of horseradish peroxidase immobilized onto graphene oxide/magnetic chitosan beads for cost effective cholesterol oxidase assay. *The Open Biotechnology Journal*, 13(1).
- Schranck, A., Marks, R., Yates, E., & Doudrick, K. (2018). Effect of urine compounds on the electrochemical oxidation of urea using a nickel cobaltite catalyst: an electroanalytical and spectroscopic investigation. *Environmental Science & Technology*, 52(15), 8638-8648.
- Schwartz, W.M., & Shain, I. (1963). Generalized Circuits for Electroanalytical Instrumentation, *Analytical Chemistry*, 35, 1770-1778.
- Settu, K., Chiu, P. T., & Huang, Y. M. (2021). Laser-induced graphene-based enzymatic biosensor for glucose detection. *Polymers*, 13(16), 2795.
- Sha, R., Komori, K., & Badhulika, S. (2017). Graphene–polyaniline composite based ultra-sensitive electrochemical sensor for non-enzymatic detection of urea. *Electrochimica Acta*, 233, 44-51.
- Shan, C., Yang, H., Han, D., Zhang, Q., Ivaska, A., & Niu, L. (2010). Graphene/AuNPs/chitosan nanocomposites film for glucose biosensing. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(5), 1070-1074.
- Singh, A. K., Singh, M., & Verma, N. (2017). Extraction, purification, kinetic characterization and immobilization of urease from *Bacillus sphaericus* MTCC 5100. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12, 341-347.
- Singh, A. K., Singh, M., & Verma, N. (2020). Electrochemical preparation of Fe₃O₄/MWCNT-polyaniline nanocomposite film for development of urea biosensor and its application in milk sample. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 163-175.
- Skoog, D. A., Holler, F.J., Nieman, & T. A. (1998). *Elektroanalitik kimyaya giriş: enstrümantal analiz*. Editörler : Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., Bilim Kitap Kirtasiye, Ankara, s: 639-673.
- Skoog, I., Nilsson, L., Persson, G., Lernfelt, B., Landahl, S., Palmertz, B., ... & Svanborg, A. (1996). 15-year longitudinal study of blood pressure and dementia. *The Lancet*, 347(9009), 1141-1145.
- Skotheim, T. A., Okamoto, Y., & Hale, P. D. (1992). Electrochemical biosensor based on immobilized enzymes and redox polymers (No. US 5089112; A).

- Song, Y., Luo, Y., Zhu, C., Li, H., Du, D., & Lin, Y. (2016). Recent advances in electrochemical biosensors based on graphene two-dimensional nanomaterials. *Biosensors and Bioelectronics*, 76, 195-212.
- Söyler, M. (2006). Van kedisi eritrositlerinden karbonik anhidraz enziminin (EC 4.2. 1.1.) saflaştırılması ve karakterizasyonu (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Srivastava, R. K., Srivastava, S., Narayanan, T. N., Mahlotra, B. D., Vajtai, R., Ajayan, P. M., & Srivastava, A. (2012). Functionalized multilayered graphene platform for urea sensor. *ACS Nano*, 6(1), 168-175.
- Stryer, L. (1981). "Introduction to enzymes", Biochemistry, W.H. Freeman and Company, San Fransisco, 103-131.
- Sun, X., Fan, J., Fu, C., Yao, L., Zhao, S., Wang, J., & Xiao, J. (2017). WS₂ and MoS₂ biosensing platforms using peptides as probe biomolecules. *Scientific Reports*, 7(1), 10290.
- Sung, W. J., & Bae, Y. H. (2003). A glucose oxidase electrode based on polypyrrole with polyanion/PEG/enzyme conjugate dopant. *Biosensors and Bioelectronics*, 18(10), 1231-1239.
- Şahin, Y., Aydın, A., Udum, Y. A., Pekmez, K., & Yıldız, A. (2004). Electrochemical synthesis of sulfonated polypyrrole in FSO₃H/acetonitrile solution. *Journal of Applied Polymer Science*, 93(2), 526-533.
- Tan, C., & Zhang, H. (2015). Two-dimensional transition metal dichalcogenide nanosheet-based composites. *Chemical Society Reviews*, 44(9), 2713-2731.
- Tekman, Ş., & Öner, N. (1986). Genel Kimya, I. cilt. Fatih Yayınevi Matbaası, 335-367.
- Telefoncu, A., Dinçkaya, E. (1997). "Enzimoloji 2. baskı", Telefoncu, A., Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir, 3-12, 193-231.
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Analytical Letters*, 34(5), 635-659.
- Thirumalraj, B., Palanisamy, S., Chen, S. M., Yang, C. Y., Periakaruppan, P., & Lou, B. S. (2015). Direct electrochemistry of glucose oxidase and sensing of glucose at a glassy carbon electrode modified with a reduced graphene oxide/fullerene-C60 composite. *RSC Advances*, 5(95), 77651-77657.
- Thunyakontirakun, W., Sriwichai, S., Phanichphant, S., & Janmanee, R. (2019). Fabrication of poly(pyrrole-3-carboxylic acid)/graphene oxide composite thin film for glucose biosensor. *Materials Today: Proceedings*, 17, 2070-2077.
- Tian, K., Nie, F., Luo, K., Zheng, X., & Zheng, J. (2017). A sensitive electrochemiluminescence glucose biosensor based on graphene quantum dot prepared from graphene oxide sheets and hydrogen peroxide. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 801, 162-170.
- Toghill, K. E., & Compton, R. G. (2010). Electrochemical non-enzymatic glucose sensors: a perspective and an evaluation. *International Journal of Electrochemical Science*, 5(9), 1246-1301.
- Topcu, C. (2009). Yeni Sentezlenen Schiff Bazlarının Kimyasal Sensörlerde Aktif Bileşenler Olarak Kullanımının Araştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Tothill, I. E. (2009). Biosensors for cancer markers diagnosis. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 20, No. 1, pp. 55-62). Academic Press.
- Turner, A. P. (2013). Biosensors: sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*, 42(8), 3184-3196.

- Turner, A., Karube, I., & Wilson, G. S. (1987). *Biosensors: fundamentals and applications*. Oxford University Press.
- Wang J. (2006). *Analytical electrochemistry*. Third edition, John Wiley, 250 p., New Jersey.
- Wang, J. (2001). Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 13(12), 983-988.
- Wang, J. (2005). Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 17(1), 7-14.
- Wang, J. (2005). Nanomaterial-based electrochemical biosensors. *Analyst*, 130(4), 421-426.
- Wang, J. (2008). Electrochemical glucose biosensors. *Chemical Reviews*, 108(2), 814-825.
- Wang, X. D., Zhou, T. Y., Chen, X., Wong, K. Y., & Wang, X. R. (2008). An optical biosensor for the rapid determination of glucose in human serum. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 129(2), 866-873.
- Wu, H., Wang, J., Kang, X., Wang, C., Wang, D., Liu, J., ... & Lin, Y. (2009). Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in platinum nanoparticles/graphene/chitosan nanocomposite film. *Talanta*, 80(1), 403-406.
- Wu, P., Shao, Q., Hu, Y., Jin, J., Yin, Y., Zhang, H., & Cai, C. (2010). Direct electrochemistry of glucose oxidase assembled on graphene and application to glucose detection. *Electrochimica Acta*, 55(28), 8606-8614.
- Xia, L., Wei, Z., & Wan, M. (2010). Conducting polymer nanostructures and their application in biosensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, 341(1), 1-11.
- Xia, L., Xia, J., & Wang, Z. (2015). Direct electrochemical deposition of polyaniline nanowire array on reduced graphene oxide modified graphite electrode for direct electron transfer biocatalysis. *RSC Advances*, 5(113), 93209-93214.
- Xian, Y., Hu, Y., Liu, F., Xian, Y., Wang, H., & Jin, L. (2006). Glucose biosensor based on Au nanoparticles–conductive polyaniline nanocomposite. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(10), 1996-2000.
- Xu, F., Wu, M., Ma, G., Xu, H., & Shang, W. (2020). Copper-molybdenum sulfide/reduced graphene oxide hybrid with three-dimensional wrinkles and pores for enhanced amperometric detection of glucose. *Microchemical Journal*, 159, 105432.
- Xu, Q., Gu, S. X., Jin, L., Zhou, Y. E., Yang, Z., Wang, W., & Hu, X. (2014). Graphene/polyaniline/gold nanoparticles nanocomposite for the direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 190, 562-569.
- Xu, W., He, J., Gao, L., Zhang, J., Hui, J., Guo, Y., ... & Yu, C. (2015). A sensitive glucose biosensor based on the abundant immobilization of glucose oxidase on hollow Pt nanospheres assembled on graphene oxide–Prussian Blue–PTC-NH₂ nanocomposite film. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 741, 8-13.
- Zaitseva, A. S., Arlyapov, V. A., Yudina, N. Y., Alferov, S. V., & Reshetilov, A. N. (2017). Use of one-and two-mediator systems for developing a BOD biosensor based on the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Enzyme and Microbial Technology*, 98, 43-51.

- Zarei, M., Samimi, A., Khorram, M., Abdi, M. M., & Golestaneh, S. I. (2021). Fabrication and characterization of conductive polypyrrole/chitosan/collagen electrospun nanofiber scaffold for tissue engineering application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 168, 175-186.
- Zeng, Q., Cheng, J. S., Liu, X. F., Bai, H. T., & Jiang, J. H. (2011). Palladium nanoparticle/chitosan-grafted graphene nanocomposites for construction of a glucose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(8), 3456-3463.
- Zhang, H., & Yang, F. Q. (2021). Equipment-free quantitative determination of urea based on paper-based sensor via urease-mediated chitosan viscosity change. *Enzyme and Microbial Technology*, 148, 109830.
- Zhou, X., Huang, X., Qi, X., Wu, S., Xue, C., Boey, F. Y., ... & Zhang, H. (2009). In situ synthesis of metal nanoparticles on single-layer graphene oxide and reduced graphene oxide surfaces. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(25), 10842-10846.
- Zhu, Y., Murali, S., Stoller, M. Ganesh, K., Cai, W., Ferreira, P., Pirkle, A., Wall, R. (2011). Carbon-based supercapacitors produced by activation of graphene. *Science*, 332: 1537-1541.