

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

**ROSMARİNİK ASİTİN NADH SENSÖRLERİNDE VE ALKOL
DEHİDROJENAZ TEMELLİ BİYOSENSÖRLERDE MEDYATÖR OLARAK
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Elif Merve ŞAHİN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

2017

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

**ROSMARİNİK ASİTİN NADH SENSÖRLERİNDE VE ALKOL
DEHİDROJENAZ TEMELLİ BİYOSENSÖRLERDE MEDYATÖR OLARAK
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Elif Merve ŞAHİN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**(Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FYL-2016-1492 nolu proje ile desteklenmiştir.)**

2017

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ROSMARİNİK ASİTİN NADH SENSÖRLERİNDE VE ALKOL
DEHİDROJENAZ TEMELLİ BİYOSENSÖRLERDE MEDYATÖR OLARAK
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Elif Merve ŞAHİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez 03/07/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ: Prof. Dr. Erol AYRANCI

Prof. Dr. Pinar ÇAMURLU

Prof. Dr. Songül ŞEN GÜR SOY

ÖZET

ROSMARİNİK ASİTİN NADH SENSÖRLERİNDE VE ALKOL DEHİDROJENAZ TEMELLİ BİYOSENSÖRLERDE MEDYATÖR OLARAK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Elif Merve ŞAHİN

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Erol AYRANCI
Temmuz 2017, 69 sayfa

Çalışma temel olarak, doğal bir antioksidant olan rosmarinik asit (RA)'in NADH sensörlerinde ve etanol tayini için geliştirilen dehidrojenaz (ADH) temelli amperometrik biyosensörlerde medyatör olarak etkisinin incelenmesini amaçlamaktadır.

Çalışmanın ilk kısmında yüzey baskılı karbon elektrotlar (YBCE) RA ile modifiye edilmiştir. Böylece elde edilen elektrotlar döngüsel voltametri ile elektrokimyasal olarak karakterize edildikten sonra, NADH'ye duyarlılığı test edilerek, bir NADH sensörü olarak kullanımı incelenmiştir. Bu incelemede, NADH tayini için optimum çalışma şartları (pH, çalışma potansiyeli) belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında, önceden geliştirilmiş olan RA modifiyeli YBCE'nin yapısına ADH enzimi de ilave edilerek etanole duyarlı olabilecek bir biyosensör geliştirilmiştir. Bu biyosensörün elektrokimyasal karakterizasyonu ve optimizasyon çalışmaları (koenzim NAD⁺'nin miktarı, pH, çalışma potansiyeli) yapılmıştır. Geliştirilen bu alkol dehidrojenaz temelli biyosensörün analitiksel karakterizasyonu da yapılmıştır. Bu kapsamda, depolama ve uygulama kararlılığı ile tekrarlanabilirlik gibi performans kriterleri belirlenmiştir. NADH sensörü ve ADH temelli biyosensörün yapısında antioksidant bir madde olan RA'nın medyatör olarak yer almasının en önemli etkilerinden birinin, NADH ve alkol tayinlerindeki çalışma potansiyelini düşürmesi olduğu saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Antioksidant, rosmarinik asit, yüzey baskılı karbon elektrot, nikotinamidadenin dinükleotit, alkol dehidrojenaz, alkol biyosensörü

JÜRİ: Prof. Dr. Erol AYRANCI (Danışman)
Prof. Dr. Pınar ÇAMURLU
Prof. Dr. Songül ŞEN GÜR SOY

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ROSMARINIC ACID AS A MEDIATOR IN NADH SENSORS AND ALCOHOL DEHYDROGENASE-BASED BIOSENSORS

Elif Merve ŞAHİN

MSc in Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Erol AYRANCI

July 2017, 69 Pages

The main aim of this study is to investigate the effect of rosmarinic acid (RA), a natural antioxidant, as a mediator on NADH sensors and dehydrogenase based amperometric biosensors developed for ethanol determination.

In the first part of the work, screen-printed carbon electrodes (SPCE) were modified with RA. Then these electrodes were characterized electrochemically using cyclic voltammetry. Their use as an NADH sensor was examined. The parameters such as pH and working potential were optimized for NADH determination.

In the second part of the work, a biosensor was developed, to be sensitive to ethanol, by adding alcohol dehydrogenase (ADH) enzyme to the structure of the RA modified SPCE. The electrochemical characterization and optimization studies for amount of coenzyme NAD⁺, pH and working potential were performed for the developed biosensor. Its analytical characterization was also performed. Within this scope, performance criteria such as storage and application stability as well as reproducibility of the biosensor were determined.

One of the most important effects of the antioxidant substance RA as a mediator in the structure of the NADH sensor and ADH-based biosensor is found to be the lowering of the working potential in NADH and alcohol determinations. This effect helps eliminating interferences in NADH and alcohol analyses.

KEYWORDS: antioxidant, rosmarinic acid, screen-printed carbon electrode, nicotinamide adenine dinucleotide, alcohol dehydrogenase, alcohol biosensor

COMMITTEE: Prof. Dr. Erol AYRANCI (Supervisor)
Prof. Dr. Pınar ÇAMURLU
Prof. Dr. Songül ŞEN GÜRSOY

ÖNSÖZ

NADH koenziminin yükseltgenmiş formu (NAD^+), organizmaların metabolizmasına katılan bir koenzim olarak kullanıldığı için, enzim deneylerinde NADH'nin analizi oldukça önemlidir. NADH'nin yüksek potansiyeldeki elektroyükseltgenmesi, NAD^+ 'nın enzimatik olarak inaktif tersinmez formlarının oluşmasına ve bu ürünlerin adsorpsiyonu nedeniyle elektrot yüzeyinin kontaminasyonuna (fouling) ve gerçek örneklerde girişim yapan zemin akımına neden olmaktadır. Bu ise düşük duyarlığa, düşükseçiciliğe ve kararsız analitiksel sinyale neden olmaktadır. Bu nedenle karbon bazlı elektrotlarda NADH'nin amperometrik tayini için gerekli olan yükseltgenme potansiyelinin düşürülmesi gerekmektedir. Çalışmamızda YBCE/RA elektroduyla NADH'nin yükseltgenme potansiyelinin 0,15 V'a kadar düşmesi sağlanmıştır.

Sensör ve biyosensör konusunda çalışma fırsatı yaratan, tez konumun belirlenmesinden yazımına kadar destek olan, bilgisi ve tecrübesi ile bana yol gösteren değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Erol AYRANCI'ya çok teşekkür eder sonsuz saygılarımı sunarım. Laboratuvar çalışmalarında bilgisi ve tecrübesi ile bana her zaman destek olan, görüş ve önerileri ile yol gösteren hocam Sayın Yrd. Doc. Dr. Melike ŞAHİN'e çok teşekkür ederim. Son olarak varlıkları ve destekleri ile her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Biyosensörler.....	1
1.1.1. Sensör ve biyosensör tanımları	1
1.1.2. Biyosensörlerin yapısı ve sınıflandırılması	1
1.1.3. Biyosensörlerin tarihi	2
1.1.4. Elektrokimyasal biyosensörler	3
1.1.4.1.Potansiyometrik biyosensörler.....	3
1.1.4.2.Amperometrik biyosensörler	3
1.1.5. Biyosensörlerin avantajları ve uygulama alanları	4
1.1.6. Biyosensörlerin performans kriterleri	5
1.1.6.1.Kalibrasyon karakteristikleri: duyarlık, çalışma ve lineer konsantrasyon aralığı, gözlenebilme ve kantitatif tayin sınırları	5
1.1.6.2.Seçicilik ve güvenilirlik.....	5
1.1.6.3.Durgun hal ve geçiş cevap zamanları	6
1.1.6.4.Tekrarlanabilirlik, kararlılık ve kullanım ömrü	7
1.2. Enzim temelli biyosensörlerde tutuklama yöntemleri.....	7
1.2.1. Adsorpsiyon	9
1.2.2. Çapraz bağlama	9
1.2.3. Hapsetme.....	10
1.2.4. Kovalent bağlama.....	10
1.3. Alkoller.....	10
1.3.1. Etanol (Etil alkol).....	11
1.4. Nikotinamid adenin dinükleotit koenzimi	12
1.5. Alkol dehidrojenaz enzimi	13
1.6. Rosmarinik asit.....	14
1.7. Yüzey baskılama tekniği ve yüzey baskılı elektrotlar.....	16

1.8. Voltametri.....	18
1.8.1. Uyarma sinyalleri	19
1.8.2. Voltametik cihazlar	20
1.8.3. Voltamogramlar	20
1.8.4. Döngüsel voltametri.....	21
1.9. Kronoamperometri	24
1.10. Çalışmanın amacı	25
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI.....	27
3. MATERYAL VE METOT	30
3.1. Materyal.....	30
3.1.1. Kullanılan kimyasallar	30
3.1.2. Kullanılan cihazlar	30
3.1.2.1. Elektrokimyasal ölçüm sistemi.....	30
3.1.3. Kullanılan elektrotlar, hücreler ve konektörler	31
3.2. Metot	32
3.2.1. Destek elektrolit tampon çözeltisinin hazırlanması	32
3.2.2. YBE üzerine RA'nın hazırlanması.....	32
3.2.3. ADH temelli biyosensörlerin hazırlanması	32
3.2.3.1. Glutaraldehit (GA) ile tutuklama.....	32
3.2.4. Elektrokimyasal ölçümler	33
3.2.5. ADH temelli biyosensörlerin ölçüm prensibi.....	33
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	34
4.1. YBCE üzerinde RA'nın elektrokimyasal davranışı	34
4.2. RA modifiyeli YBCE'nin elektrokimyasal karakterizasyonu	38
4.3. RA modifiyeli YBCE'de NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi	45
4.4. Amperometrik NADH Tayinine İlişkin Bulgular.....	49
4.4.1. pH optimizasyonu	49
4.4.2. Çalışma potansiyelinin optimizasyonu.....	50
4.4.3. Analitiksel karakterizasyon	51
4.5. ADH Temelli Biyosensörlere İlişkin Bulgular.....	53
4.5.1. ADH temelli biyosensörlerde NADH'nin yükseltgenmesinin takibi.....	53
4.5.2. ADH temelli biyosensörlerde etanolün amperometrik tayini	53

4.5.3. ADH temelli biyosensörlerde pH optimizasyonu	54
4.5.4. ADH temelli biyosensörlerde NAD ⁺ koenziminin miktar optimizasyonu	54
4.5.5. ADH temelli biyosensörlerde enzim miktarının optimizasyonu.....	55
4.5.6. ADH temelli biyosensörlerde çalışma potansiyelinin optimizasyonu	56
4.5.7. Analitiksel karakterizasyon	58
4.5.8. Gerçek numune analizi.....	61
5. SONUÇ	63
6. KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

A	Yardımcı elektrot
C	Konsantrasyon
c^0	1 M referans konsantrasyon
E _{pc}	Katodik pik potansiyeli
E _{pa}	Anodik pik potansiyeli
ΔE_p	Anodik ve katodik pik potansiyeli arasındaki fark
I _{pa}	Anodik pik akımı
I _{pc}	Katodik pik akımı
R	Referans elektrot
W	Çalışma elektrodu

Kısaltmalar

ADH	Alkol dehidrojenaz
ÇE	Çalışma elektrodu
GA	Glutaraldehit
ISFET	İyon seçimli alan etkili elektrotlar
ISE	İyon seçici elektrotlar
LOD	Tespit limiti
LOQ	Tayin limiti
NAD ⁺	β -Nikotinamid adenin dinükleotit
NADH	β -Nikotinamid adenin dinükleotitin indirgenmiş hali
RA	Rosmarinik asit
ROH	Alkollerin genel formülü
YBE	Yüzey baskılı elektrot
YBCE	Yüzey baskılı karbon elektrot

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Biyosensörlerin genel yapısı.....	1
Şekil 1.2. Biyomolekülün tutuklama yöntemleri	9
Şekil 1.3. Etanolün molekül formülü.....	11
Şekil 1.4. NADH'nin kimyasal yapısı	12
Şekil 1.5. Alkol dehidrojenaz enziminin üç boyutlu yapısı	13
Şekil 1.6. Medyator varlığında etanolün yükseltgenmesinde ADH/NAD ⁺ bazlı biyosensör mekanizması	14
Şekil 1.7. Kafeik asit, 3-4-dihidroksifenil laktik asit ve Rosmarinik asitin kimyasal yapısı.....	15
Şekil 1.8. Coleus blumei türlerinin süspansiyon kültürlerinde bulunan RA'nın biyosentez yolu.....	16
Şekil 1.9. Çeşitli markalardaki yüzey baskılı elektrotlar a) Bosens b) BVT c) DropSens d) Rusens e) Pine Instrument f) Zensor	17
Şekil 1.10.Yüzey baskılı elektrot bileşimi	17
Şekil 1.11.Üçlü bir elektrot sisteminin üretimi. Kimyasal olarak inert substrat; çalışma ve karşıt elektrodun yüzey baskılaması; referans elektrodun yüzey baskılaması; koruyucu tabakanın yüzey baskılaması; ilgili analitle çalışma elektrodun inkübasyonu	18
Şekil 1.12.Uyarma sinyalleri.....	19
Şekil 1.13.Voltametri için manuel bir potansiyostat.....	20
Şekil 1.14.Bir hipotetik A ürünün bir P türü vermek üzere indirgenmesi için doğrusal taramalı voltamogram	21
Şekil 1.15.Döngüsel voltametrik uyarma sinyali	22
Şekil 1.16.K ₃ Fe(CN) ₆ yönünden 6 mM ve KNO ₃ yönünden 1 M olan bir çözeltinin döngüsel voltamogramı	23
Şekil 1.17.Kronoamperometrik deney; a) potansiyel-zaman dalga-formu b) zaman ilerledikçe konsantrasyondaki değişim c) akım-zaman cevabı	25
Şekil 3.1. PalmSens potansiyostat.....	30

Şekil 3.2. Yüzey baskılı elektrotların genel yapısı.....	31
Şekil 3.3. Yüzey baskılı elektrotlar için sensör konektör çeşitleri A) Damlamalı analizler için kutu biçiminde B) Batch analizleri için kablo şeklinde C) Batch analizi için elektrokimyasal hücre	32
Şekil 4.1. 1 mM RA'nın 10 mVsn^{-1} tarama hızında ve -0.4 V ve $+0.5 \text{ V}$ 'daki döngüsel voltamogramı (50 mM pH 7.0 PBS, 0.1 M KCl)	34
Şekil 4.2. A) YBCE/RA elektrodunun -0.1 V and $+0.5 \text{ V}$ potansiyel aralığında farklı tarama hızlarında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 10, 25, 50, 75, 100, 125 mV.s^{-1} , 50 mM pH 7.0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızı grafiği C) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızının karekökü grafiği D) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik potansiyeli-tarama hızının doğal logaritması grafiği	34
Şekil 4.3. A) YBCE/RA elektrodunun 1 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ içerisinde farklı tarama hızlarında (10, 25, 50, 75, 100, 125 mV.s^{-1}) $-0,5 \text{ V}$ ile $+0,7 \text{ V}$ potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızının karekökü grafiği	38
Şekil 4.4. YBCE elektrodunda 5 döngü RA'nın $-0,1 \text{ V}$ ile $+0,8 \text{ V}$ potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (pH 7,0 50 mM fosfat tamponu, 0,1 M KCl, 1 mM RA çözeltisi, 20 mV.s^{-1} tarama hızı)	39
Şekil 4.5. A) 5 döngü uygulanarak RA ile modifiye edilmiş YBCE'nin $-0,1 \text{ V}$ ile $+0,8 \text{ V}$ potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (pH 7,0 50 mM fosfat tamponu, 0,1 M KCl, 1 mM RA çözeltisi, 10-125 mV.s^{-1} tarama hızı aralığında) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızı grafiği.....	40
Şekil 4.6. A) 10 döngü uygulanarak RA ile modifiye edilmiş YBCE'nin $-0,1 \text{ V}$ ile $+0,8 \text{ V}$ potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (pH 7,0 50 mM fosfat tamponu, 0,1 M KCl, 1 mM RA çözeltisi, 10-125 mV.s^{-1} tarama hızı aralığında) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızı grafiği.....	41
Şekil 4.7. A) 15 döngü uygulanarak RA ile modifiye edilmiş YBCE'nin $-0,1 \text{ V}$ ile $+0,8 \text{ V}$ potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (pH 7,0 50 mM fosfat tamponu, 0,1 M KCl, 1 mM RA çözeltisi, 10-125 mV.s^{-1} tarama hızı aralığında) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızı grafiği.....	42

Şekil 4.8. A) YBCE elektrodunda RA'nın 5 döngü elektropolimerizasyonunda 10 mV.s ⁻¹ tarama hızında ve -0.1 V and +0.4 V potansiyel aralığında farklı tarama hızlarında elde edilen döngüsel voltamogram (Tarama hızı: 10, 25, 50, 75, 100, 125 mV.s ⁻¹ , 50 mM pH 7.0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızı grafiği	44
Şekil 4.9. A) YBCE elektrodunda RA'nın 5 döngü elektropolimerizasyonunda 40 mV.s ⁻¹ tarama hızında ve -0.1 V and +0.4 V potansiyel aralığında farklı tarama hızlarında elde edilen döngüsel voltamogram (Tarama hızı: 10, 25, 50, 75, 100, 125 mV.s ⁻¹ , 50 mM pH 7.0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızı grafiği	44
Şekil 4.10.Şekil 4.5A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik potansiyeli-tarama hızının doğal logaritması grafiği	45
Şekil 4.11.YBCE/RA elektrodunun 50 mV s ⁻¹ tarama hızında 50 mM pH 7.0 fosfat tamponunda (0.1 M KCl) 1 mM NADH varlığında ve yokluğundaki döngüsel voltamogramı	46
Şekil 4.12. A) YBCE/RA elektrodunun 1 mM NADH içeren 50 mM pH 7.0 fosfat tamponu (0.1 M KCl'de)'ndaki farklı tarama hızlarındaki (10-125 mV.s ⁻¹) döngüsel voltamogramları B) A'daki verilerden yararlanılarak elde edilen akım-tarama hızının karekökü grafiği C) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik potansiyeli-tarama hızının doğal logaritması grafiği	48
Şekil 4.13. A) YBCE/RA elektrodunun değişen NADH konsantrasyonlarında (0.1 mM-5 mM) -0.1V and +0.5 V potansiyel aralığında ve 50 mV.s ⁻¹ tarama hızındaki döngüsel voltamogramları (50 mM pH 7.0 fosfat tamponu, 0.1 M KCl) B: A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen akım-NADH konsantrasyonu grafiği	49
Şekil 4.14.Farklı pH'lardaki 1 mM NADH çözeltisinin, YBCE/RA elektrodu kullanılarak elde edilen akım-pH grafiği	50
Şekil 4.15.YBCE/RA sensörünün farklı potansiyelerde NADH'nin derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,25 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)	51
Şekil 4.16.YBCE/RA sensörü ile NADH'nin amperometrik tayini için kronoamperogramlardan yararlanılarak elde edilen grafik (+0.25 V potansiyel, pH 7,25 fosfat tamponu, 0,1 M KCl).....	52

Şekil 4.17. YBCE/RA/ADH/GA biyosensörünün $-0,1$ V ile $+0,5$ V potansiyel aralığında $0,5$ mM NAD^+ içeren pH 7,75 fosfat tamponunda ($0,1$ M KCl) $0,5$ mM etanolün varlığında ve yokluğunda tarama hızında elde edilen döngüsel voltamogramlar (Tarama hızı: 50 mV. s^{-1}).....	53
Şekil 4.18. YBCE/RA/ADH/GA biyosensörünün, farklı pH'larda elde edilen akımlara karşı pH grafiği ($0,5$ mM etanol, $0,5$ mM NAD^+ , $0,25$ V, $0,1$ M KCl)	54
Şekil 4.19. YBCE/RA/ADH/GA biyosensörünün farklı NAD^+ derişimlerinde elde edilen akımlara karşı NAD^+ derişim grafiği (400 μM etanol, pH 7,75, $+0,25$ V, $0,1$ M KCl)	55
Şekil 4.20. Farklı enzim miktarlarında hazırlanmış YBCE/RA/ADH/GA biyosensörlerinin, etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,75, 7 mM NAD^+ , $0,1$ M KCl, $+0,25$ V)	56
Şekil 4.21. YBCE/RA/ADH/GA biyosensörünün farklı potansiyelerde, etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,75 fosfat tamponu, 7 mM NAD^+ , $0,1$ M KCl, 250 unit ADH)	57
Şekil 4.22. Örnek bir kronoamperogram.....	58
Şekil 4.23. YBCE/RA/ADH/GA biyosensörünün 100 μM etanolün ardışık katımı ile elde edilen akım-derişim grafiği	59
Şekil 4.24. YBCE/RA/ADH/GA biyosensörünün 400 μM etanol derişimine karşı elde edilen akım-gün sayısı grafiği	60
Şekil 4.25. YBCE/RA/ADH/GA biyosensörlerinde 100 μM etanolün ardışık ilavesiyle elde edilen akım-konsantrasyon grafiği.....	61
Şekil 4.26. YBCE/RA/ADH/GA biyosensörlerinde 100 μM etanolün ardışık ilavesiyle elde edilen akım-alkol yüzdesi grafiği.....	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	Biyosensörlerin sınıflandırılması.....	2
Çizelge 1.2	Enzim tutuklama yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları.....	8
Çizelge 4.1	Şekil 4.15’de verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayıları değerleri	51
Çizelge 4.2	YBCE/RA sensörü ile NADH’nin amperometrik tayini için elde edilen analitiksel parametreler YBCE/RA sensörü ile NADH’nin amperometrik tayini için elde edilen analitiksel parametreler.....	52
Çizelge 4.3	YBCE/RA sensörünün uygulama kararlığı verileri	52
Çizelge 4.4	Şekil 4.20’de verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri	56
Çizelge 4.5	Şekil 4.21’de verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri	57
Çizelge 4.6	YBCE/RA/ADH/GA biyosensörleri ile etanolün amperometrik tayini için elde edilen analitiksel parametreler.....	59
Çizelge 4.7	Seyreltilmiş numunelerin analizi sonucu hesaplanan alkol yüzdeleri.....	62

1. GİRİŞ

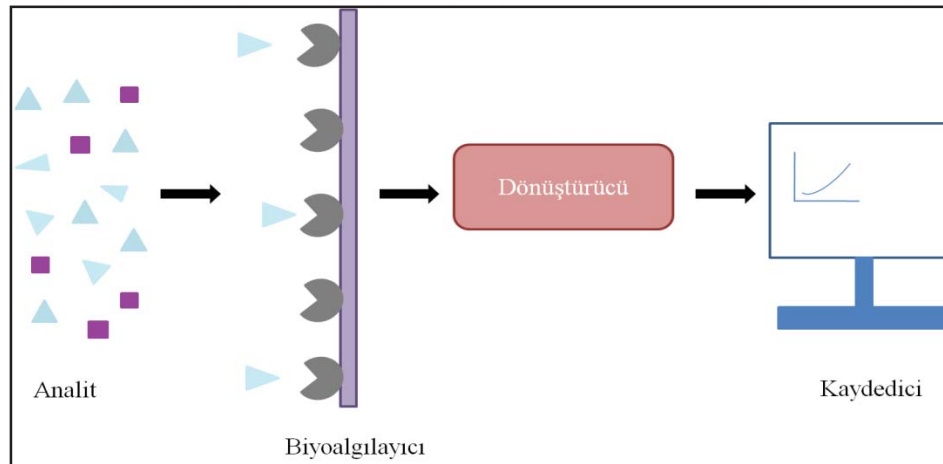
1.1. BİYOSENSÖRLER

1.1.1. Sensör ve biyosensör tanımları

Sensörler fiziksel olguları elektrik sinyallerine dönüştürebilen cihazlardır. Biyolojik analizler için kullanılan bir çeşit sensör olan biyosensörler, “International Union of Pure and Applied Chemistry” (IUPAC) tarafından, kimyasal bir bileşiğe karşı analit miktarıyla orantılı olarak verilen yanıtı, ölçülebilir ve işlenebilir bir sinyale dönüştüren biyolojik bir tanımlama elemanı ve fiziksel bir dönüştürücü içeren cihaz veya aygıt olarak tanımlanmaktadır (Arshak vd 2008, Rasooly vd 2005, Bhunia vd 2008).

1.1.2. Biyosensörlerin yapısı ve sınıflandırılması

Biyosensörler yapısal olarak biyoalgılayıcı materyal ve fiziksel dönüştürücüden oluşan entegre bir cihazdır. Analit ile seçimli bir şekilde etkileşime giren biyoalgılayıcı materyal olarak enzim, mikroorganizma, doku, organel, hücre gibi biyolojik aktif maddeler ya da antikor, antijen veya nükleik asitler kullanılır. Biyoanalitiksel etkileşim sonucu açığa çıkan biyolojik sinyali tanımlanabilir bir sinyale çeviren fiziksel dönüştürücü olarak ise, elektrokimyasal, magnetik, piezoelektrik, termometrik ya da optik esaslı dönüştürücüler kullanılmaktadır. Biyosensörlerin yapısında fiziksel dönüştürücülerin ilettiği tanımlanabilir sinyali kayıt eden bir kaydedici de yer almaktadır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Biyosensörlerin genel yapısı

Biyoalgılayıcı ve dönüştürücünün türü biyosensörün sınıfını belirlemektedir. Çizelge 1.1’de biyoalgılayıcı ve dönüştürücü türüne göre biyosensörlerin sınıflandırılması yer almaktadır (Kress-Roger 1998, Turner vd 1987).

Çizelge 1.1. Biyosensörlerin sınıflandırılması (Çoğal vd 2016)

Biyoalgılayıcı Türüne Göre Biyosensörlerin Sınıflandırılması	Dönüştürücü Türüne Göre Biyosensörlerin Sınıflandırılması
<ul style="list-style-type: none"> Enzim Temelli Biyosensörler 	<ul style="list-style-type: none"> Elektrokimyasal Biyosensörler <ul style="list-style-type: none"> ❖ Amperometrik <ul style="list-style-type: none"> ✓ Birinci Nesil ✓ İkinci Nesil ✓ Üçüncü Nesil ❖ Potansiyometrik ❖ Kondüktometrik
<ul style="list-style-type: none"> Antijen Temelli Biyosensörler 	<ul style="list-style-type: none"> Optik Biyosensörler <ul style="list-style-type: none"> ❖ Fiber optik ❖ Yüzey plazmon rezonans (SPR) ❖ Fiber optik SPR
<ul style="list-style-type: none"> Nükleik Asit Temelli Biyosensörler 	<ul style="list-style-type: none"> Kalorimetrik <ul style="list-style-type: none"> ❖ Isı iletimi ❖ İzotermal ❖ İzoperibol
<ul style="list-style-type: none"> Hücre Temelli Biyosensörler 	<ul style="list-style-type: none"> Akustik <ul style="list-style-type: none"> ❖ Yüzey akustik dalga (SAW) ❖ Piezokristal mikrobalsans

1.1.3. Biyosensörlerin tarihi

Biyosensörlerin tarihi, 1962 yılında Clark ve Lyons'un Cincinnati Hastanesinde bir oksijen elektrodunu glukoz oksidaz enzimi ile kaplayarak, ameliyat sırasında kanın glukoz düzeyini ölçmeleriyle başlar (Clark ve Lyons 1962). Bu çalışma ile kan ve idrardaki glukoz tayinini gerçekleştiren glukoz oksidaz elektrodu, ticari olarak ilk kez 1974 yılında Yellow Springs Instruments firması tarafından üretilmiştir. Biyosensörlerin sınıflandırılmasındaki bir sonraki önemli buluş Guilbault ve Montalvo tarafından geliştirilen potansiyometrik üre elektrodudur (Guilbault ve Montalvo 1969, Scheller vd 1991). Daha sonra biyosensör teknolojisi kan örneklerinin analizlerinde, bulaşıcı hastalıkların tayininde, ilaç taramalarında uygulama alanı bulmasının yanı sıra biyoteknoloji ve gıda endüstrisinde de kullanılmaya başlanmıştır. Son 10 yılda yapılan çalışmalarla gıdalarda yabancı maddelerin tespitinde (pestisitler, toksinler ve yabancı

hormonlar gibi), üre ve alkol tayinlerinde ve biyospesifik etkileşimleri izlemede, biyosensörler daha güçlü cihazlar ve enstrümanlar haline gelmiştir. (Telefoncu 2012).

1.1.4. Elektrokimyasal biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler, biyosensörler sınıfı içerisinde en çok kullanılan biyosensörlerdir. IUPAC tanımına göre bir elektrokimyasal biyosensör, biyolojik bir tanımlama elemanı (biyokimyasal algılayıcı) kullanarak seçici, kantitatif veya yarı-kantitatif analitiksel bilgi sağlayabilen, algılayıcı-dönüştürücüyle entegre edilmiş bir cihazdır (Mello ve Kubota 2002). Bu biyosensörlerin, çok sayıda numunenin analizine olanak sağlaması, hızlı cevap sunması ve ekonomik olması gibi birçok avantajları vardır (Luonget vd 1988). Elektrokimyasal biyosensörler; potansiyometrik, kondüktometrik ve amperometrik olmak üzere sınıflandırılabilirler (Mello ve Kubota 2002).

1.1.4.1. Potansiyometrik biyosensörler

Potansiyometrik ölçümler, ya bir indikatör ve bir referans elektrot veya permselektif bir membran tarafından ayrılmış iki referans elektrot arasındaki potansiyel farkının çok düşük bir akım altında belirlenmesini içerir. Bu indikatör ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkı, iyon aktivitesi ya da konsantrasyonun logaritmasıyla orantılı olarak değişir (Thevenot vd 2001). Potansiyometrik biyosensörlerde en yaygın kullanılan elektrotlar pH elektrotlarıdır. Potansiyometrik sensörler pH ve iyon konsantrasyonundaki değişimi ölçebilir. Bu biyosensörlerde iyon seçici elektrota (ISE'ye) bağlanmış bir elektrik sinyali yükselticiden oluşan iyon seçici alan etkili elektrotlar (ISFET) dönüştürücü olarak kullanılabilir. Genel olarak bu biyosensörler enzim, antijen ya da antikor gibi biyolojik aktif bir materyalin, dönüştürücünün yüzeyindeki bir membran üzerinde tutuklanmasını temel alır (Mello ve Kubota 2002).

1.1.4.2. Amperometrik biyosensörler

Amperometrik biyosensörler, bir biyokimyasal reaksiyonun ürünlerinin çalışma elektrodunda doğrudan yükseltgenmesinden dolayı meydana gelen akımdaki değişikliği ölçer. Ölçülen bu akımlar doğrudan analit konsantrasyonuna bağlıdır. Amperometrik biyosensörler, klinik, çevre ve endüstriyel amaçlar için güvenilir, ucuz ve oldukça hassas ölçüm sistemleri olarak bilinir (Chaubey ve Malhotro 2002). Ancak amperometrik aygıtların seçiciliği, sadece mevcut elektroaktif türlerin redoks potansiyeli tarafından kontrol edilir (Mello ve Kubota 2002).

Bir amperometrik biyosensör için en basit yaklaşım, ya enzimatik olarak üretilen bir ürünün miktarındaki artışın ya da enzimin substratındaki azalmanın direk olarak algılanmasını içerir. Her iki durumda da izlenen bileşiğin elektrokimyasal olarak aktif olması gereklidir. Bir biyolojik tanıma elemanı olarak glukoz oksidaz (GOx) *birinci nesil biyosensörler* tasarımında birçok kez kullanılmıştır. Burada, enzimatik tepkime sonucu H_2O_2 ürününün konsantrasyonundaki artış veya doğal O_2 kosubstratının konsantrasyonundaki azalış elektrokimyasal olarak takip edilir. Bu da glukoz konsantrasyonunun izlenmesini sağlar (Borgmann vd 2012).

Medyatörlerle modifiye edilmiş amperometrik biyosensörler ise *ikinci nesil biyosensörler* olarak sınıflandırılır. Medyatörler, enzim ve elektrot arasındaki elektron transferini kolaylaştıran redoks maddeleridir. İdeal bir medyatörün özellikleri şöyledir (Chaubey ve Malhatra 2002):

- 1) İndirgenmiş enzim ile hızlı bir şekilde reaksiyona girebilmelidir
- 2) Tersinir heterojen kinetikleri sergilemelidir
- 3) Yükseltgenmiş medyatörün yeniden oluşması ile ilgili aşırı potansiyel düşük ve pH'dan bağımsız olmalıdır
- 4) Yükseltgenmiş ve indirgenmiş şekilleri kararlı olmalıdır

Bir medyatörün, uygun çalışma koşulları altında kararlı olması ve elektron transferi ile reaksiyonlara katılmaması beklenir. Medyatörler, numunede elektrokimyasal olarak aktif olan diğer girişimcilerden daha düşük bir redoks potansiyeline sahiptirler. Metilen mavisi, fenazinler, alizarin sarısı, tiyonin, azure A ve C, tolüidin mavisi ve Prusya mavisi gibi organik boyalar ve ferrisiyanür gibi anorganik iyonlar biyosensörlerde en yaygın olarak kullanılan medyatörlerdir. Biyosensörlerde medyatör kullanımının avantajları şöyle sıralanabilir (Chaubey ve Malhatra 2002):

- a. Medyatör varlığında biyosensörlerle ölçümler oksijen konsantrasyonuna daha az bağlıdır
- b. Enzim elektrodunun çalışma potansiyeli medyatörün yükseltgenme potansiyeli ile belirlenir
- c. Medyatör kullanımıyla düşürülen yükseltgenme potansiyelinde istenmeyen türlerin girişi önlenir

Enzim ve elektrodun doğrudan birleşmesi ile oluşan veya doğrudan elektron transfer mekanizma temelli medyatörsüz biyosensörler *üçüncü nesil biyosensörler* olarak tanımlanır. Bu durumda elektron, doğrudan elektrottan enzime veya substrat molekülüne transfer edilir. Bu mekanizmada elektron, enzimatik reaksiyon için ikinci bir substrat gibi davranır ve bu durum katalitik bir akım üretimi ile sonuçlanır (Mello ve Kubota 2012).

1.1.5. Biyosensörlerin avantajları ve uygulama alanları

Biyosensörlerin kullanıldığı metotların diğer ölçüm metotlarına göre uygulama kolaylığı, ekonomik ve hızlı olması gibi birçok avantajı vardır. Ayrıca, biyosensörlerin basit yapılı olması, biyokimyasal seçiciliğinin olması, kısa cevap zamanına ve yüksek duyarlılığa sahip olması da diğer avantajlarıdır (Telefoncu 1999).

Biyosensörler, tıbbi teşhis, çevresel izleme, genetik, biyomedikal sektör, savunma sanayi, gıda endüstrisi, madencilik ve tarım gibi alanlarda kullanılabilir (Telefoncu 2012). Pekmez, bira ve şarap gibi gıdalarda glukoz, laktoz, etanol, nişasta ve askorbik asit gibi bileşenlerin tespiti amacıyla biyosensörlerin kullanımı oldukça yaygındır (Bahadır ve Sezgintürk 2015).

1.1.6. Biyosensörlerin performans kriterleri

Buck ve Lindner 1994 yılında, moleküler tanımlama esaslı bütün biyosensörler için, biyosensör cevabının karakterizasyonunun önemini vurgulamışlardır. Ayrıca, bu uygulama parametreleri, hız sınırlayıcı adımların doğası ve bir matris içinde biyosensör optimizasyonuna olanak sağlaması bakımından da önemlidir. IUPAC tanımlamalarında önerilen ve kimyasal sensörler veya analitiksel metotların çoğu için ortak olan duyarlık, doğruluk, laboratuvarlar ve farklı kullanıcılar arasındaki tekrarlanabilirlik gibi performans kriterleri, biyosensörler için de geçerlidir (Thevenot vd 2001).

1.1.6.1. Kalibrasyon karakteristikleri: duyarlık, çalışma ve lineer konsantrasyon aralığı, gözlenebilme ve kantitatif tayin sınırları

Sensör kalibrasyonu genel olarak, analitin farklı konsantrasyonlardaki standart çözeltilerinin durgun hal cevaplarının (R_{ss}), analit konsantrasyonuna (c) veya onun logaritmasına ($\log c$) karşı grafiğinin çizilmesiyle elde edilmektedir. R_{ss} , bir tanığa (blank) karşı alınmış cevap (R_{bl}) ile düzeltilmiş sinyaldir (Thevenot vd 2001).

Duyarlık ve durgun hal kalibrasyon eğrilerinin lineer konsantrasyon aralığı, $(R_{ss}-R_{bl}) / c$ oranının $\log c$ 'ye karşı grafiğinin çizilmesiyle tespit edilebilir. Bu metot, $(R_{ss}-R_{bl})$ farkının c veya $\log c$ 'ye karşı çizilerek elde edilen geleneksel kalibrasyon eğrilerine göre daha kullanışlıdır (Thevenot vd 2001).

Elektrokimyasal biyosensörler daima geniş bir lineer konsantrasyon aralığına sahiptirler. Bu durum, biyokimyasal veya biyolojik alıcının biyokatalitik yada biyokompleksleşme özellikleriyle doğrudan ilişkilidir. Enzim temelli biyosensörlerde bu aralık substrat için bir dış tabaka difüzyon bariyeri kullanımıyla önemli oranda genişletilebilmektedir. Enzim temelli biyosensörler Michaelis-Menten kinetiği (bir başka deyişle K_m ve V_{maks}) ile ilişkilendirilirken genellikle görünür K_m ve $(R_{ss}-R_{bl})_{maks}$ parametreleriyle değerlendirilir. Burada K_m , maksimum değer yarısındaki analit konsantrasyonunu, $(R_{ss}-R_{bl})_{maks}$ değeri ise, sonsuz substrat konsantrasyonunu ifade etmektedir. Görünür K_m değeri, çözünür enziminkinden daha büyük olduğunda, örnek ve reaksiyon tabakası arasında önemli bir substrat difüzyon bariyerinin olduğu veya enzimle ko-substrat (S')'ın reaksiyon hızının arttığı söylenilebilir. Enzim çözeltilisinin kinetiğine gelince, görünür K_m değeri genellikle Lineweaver-Burk eğrileri yani $1/(R_{ss}-R_{bl})$ 'ye karşı $1/c$ oranının grafikleri kullanılarak belirlenmektedir (Thevenot vd 2001).

Duyarlık, $(R_{ss}-R_{bl})$ farkının c veya $\log c$ 'ye karşı çizilen kalibrasyon grafiğinin eğimidir. Tayin limiti (LOD) ve gözlemlenebilme sınırı (LOQ) için blank ve sinyal dalgalanmaları (gürültü) dikkate alınmalıdır. Çalışma konsantrasyon aralığı, lineer konsantrasyon aralığının genişletilmiş hali olarak düşünülebilir. Bu çalışma konsantrasyon aralığı da gözlemlenebilme sınırı (LOQ)'nun düşük ve yüksek değerleri kullanılarak belirlenebilir (Thevenot vd 2001).

1.1.6.2. Seçicilik ve güvenilirlik

Biyosensör seçiciliği, hem biyolojik algılayıcının hem de dönüştürücünün seçimine bağlıdır. Çoğu enzimler özgündür. Ancak, alkol, şeker grubu yada aminoasit

oksidazlar, peroksidazlar, laktaz, tirozinaz, alkol veya glukoz NAD-dehidrojenazlar gibi seçici olmayan enzim grubu da, biyosensörlerin geliştirilmesi için kullanılmaktadır. Bakteri, maya veya doku kültürleri de özgün olmayan biyoalgılayıcılardır. Oksijen elektrotları, pH elektrotları ve ISFET'ler yeterli seviyede seçicilik gösterirken, metal elektrotlar pek çok girişim yapan maddeye karşı duyarlılık göstermektedir. Bu doğrudan seçicilik, algılayıcılar dönüştürücülere eşlik ettiği zaman modifiye edilebilir. Örneğin, pH duyarlı elektron alan etkili elektrotlar (ENFET'ler) dönüştürücü olarak kullanıldıkları zaman, cevaplar numunenin tampon kapasitesinden etkilenmektedir (Thevenot vd 2001).

Biyosensörlerin seçiciliğinin belirlenmesi için var olan çeşitli metotlar içerisinde iki tanesi ölçümün amacına bağlı olarak öne çıkmaktadır. Bunlardan ilki, biyosensörün eklenen girişimci maddeye karşı olan cevabının ölçümünü içerir. Her bir girişimci madde için kalibrasyon eğrileri çizilir ve bu kalibrasyon eğrileri aynı çalışma koşullarındaki analitin kalibrasyon eğrileriyle karşılaştırılır. Buradaki seçicilik, aynı konsantrasyonda analit için elde edilen sinyalin, girişimci madde için elde edilen sinyale oranı olarak ifade edilebilir. İkinci metotta ise ölçümün yapıldığı hücreye analit eklenir ve tahmin edilen sürenin yarısına geldiği zaman girişimci maddeler eklenir. Daha sonra seçicilik, biyosensör cevabının % değişimi olarak ifade edilir. İkinci metottaki kalibrasyon eğrisi, birinci metotta elde edilen kalibrasyon eğrisiyle karşılaştırıldığında daha kolay olmasına rağmen, ikinci metot her bir uygulama için karakteristiktir. Bu tür bir seçicilik, analitin konsantrasyon aralığına bağlıdır (Thevenot vd 2001).

Verilen numuneler için biyosensör güvenilirliği, onların hem seçiciliğine hem de tekrarlanabilirliğine bağlıdır. Güvenilirlik, gerçek çalışma koşulları altında yani olası girişim yapan maddeler varlığında belirlenmelidir. Bir analizci açısından bir biyosensörün güvenilir olabilmesi için, biyosensör cevabı doğrudan analit konsantrasyonuyla ilişkili olmalı ve numune matrisi içinde girişim yapan maddelerin konsantrasyonundaki dalgalanmalardan etkilenmemelidir. Dolayısıyla, numune matrisi ve her bir biyosensör için öncelikle girişim yapabilecek maddeler incelenmeli ve bu maddelerin nasıl girişim yapabileceği belirlenmelidir. Bu güvenilirlik tayini, her bir uygulama açısından doğruluğun değerlendirilmesi için de gereklidir (Thevenot vd 2001).

1.1.6.3. Durgun hal ve geçiş cevap zamanları

Durgun hal cevap zamanı, ölçüm hücresine her bir analit ilavesi için kolayca belirlenir. Durgun hal cevabının %90'ına ulaşılması için gerekli süredir (Buck vd 1986).

Geçiş cevap zamanı, analit eklenmesinden sonra çıkış sinyalinin zamana göre birinci türevinin maksimum değerine, $(dR/dt)_{maks}$, ulaşılması için gerekli süreye denk gelmektedir. Her iki cevap zamanı da analit, ko-substrat ve ürünün farklı tabaka veya membran boyunca taşınma hızlarına bağlıdır. Bu nedenle, bu tabakaların kalınlıkları ve geçirgenlikleri esas parametrelerdir. Bu iki cevap zamanı ayrıca, moleküler tanıma sisteminin aktivitesine de bağlıdır. Bu aktivitenin yüksekliği bu cevap sürelerini kısaltmaktadır. Son olarak, bu cevap zamanı ölçüm hücresi içinde numunenin karıştırma koşullarına da bağlıdır (Thevenot vd 2001).

1.1.6.4. Tekrarlanabilirlik, kararlılık ve kullanım ömrü

Tekrarlanabilirlik, bir zaman periyodu boyunca elde edilen bir dizi gözlem ya da sonuçlardaki farklılıkların veya dağılımların bir ölçüsüdür. Genel olarak, kullanışlı bir doğrusal aralıktaki analit konsantrasyonu için belirlenir (Thevenot vd 2001).

Bir biyosensör cevabının uygulama kararlılığı, algılayıcı ve dönüştürücünün yanı sıra büyük ölçüde sensörün geometrisine ve hazırlanma metoduna da bağlıdır. Dahası, bu uygulama kararlılığını, cevap hızını sınırlayıcı faktörler yani substratın iç veya dış difüzyonu veya biyolojik tanıma reaksiyonu da oldukça etkilemektedir. Uygulama kararlılığını belirlemek için, analit konsantrasyonu, analit çözeltisiyle biyosensörün sürekli veya ardışık teması, sıcaklık, pH, tampon çözeltisinin bileşimi, organik çözücülerin varlığı ve numune matrisinin bileşimi gibi birçok parametrenin düşünülmesi gerekmektedir (Thevenot vd 2001).

Bazı biyosensörlerin laboratuvar şartları altında kullanım ömrünün bir yıldan daha fazla olduğu rapor edilmiş olmasına rağmen, endüstriyel veya hücre içine yerleştirilmiş glukoz biyosensörleri gibi biyolojik işlemlerle birleştirilmiş biyosensörlerin pratik kullanım ömürleri, ya bilinmez ya da günlerle veya haftalarla ifade edilir (Pickup ve Thevenot 1993). Depo kararlılığının değerlendirilmesinde, depo ortamının durumu (kuru veya nemli olması gibi), atmosfer bileşimi (hava veya azot), pH, tampon çözeltisinin bileşimi ve katkı maddelerinin varlığı önemli parametrelerdir. Depo ömrünün belirlenmesi için belirli koşullar altında farklı depolama zamanlarından sonra aynı üretimden gelen farklı biyosensörlerin duyarlılığının karşılaştırılması gerekmektedir (Thevenot vd 2001).

1.2. Enzim temelli biyosensörlerde tutuklama yöntemleri

Enzim tutuklaması, enzim temelli biyosensörlerin biyoalgılayıcı kısmının tasarlanmasında önemli bir işlemdir. Tutuklanmış biyomoleküllerin özellikleri şöyle olmalıdır (Sassolas vd 2012):

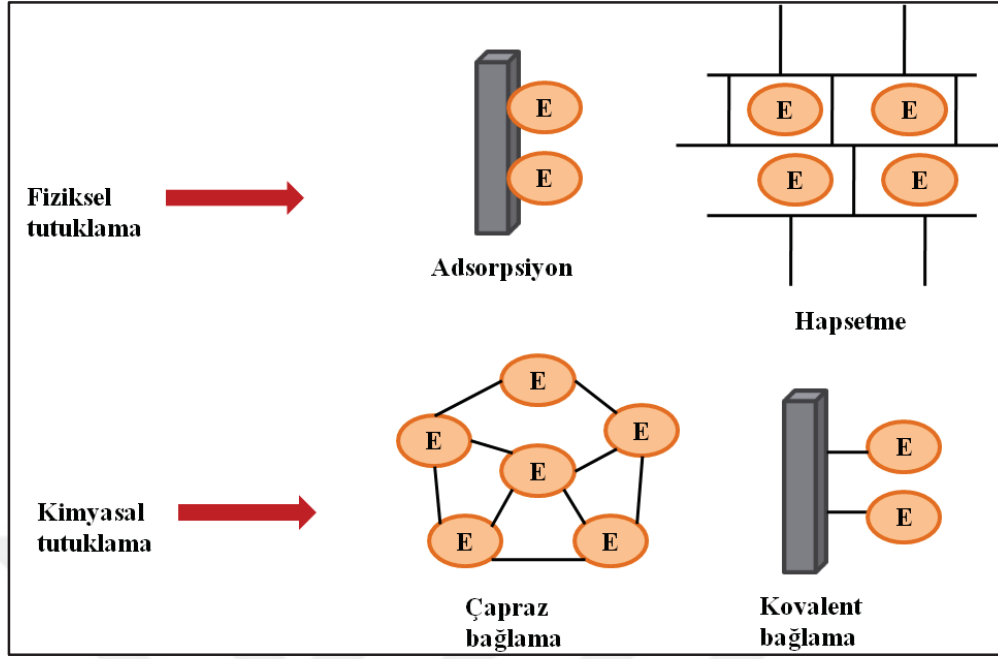
- 1) Tutuklamadan sonra yapılarını ve fonksiyonlarını kaybetmemeli
- 2) Tutuklama boyunca ve sonrasında biyolojik aktivitelerini devam ettirmeli
- 3) Yüzeye kuvvetli bir şekilde bağlanabilmeli
- 4) Biyosensörlerin kullanımı boyunca yüzeyden ayrılmamalı

Biyomolekülün tutuklanması için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler genellikle fiziksel (adsorpsiyon, hapsedme) veya kimyasal (kovalent bağlama, çapraz bağlama) tutuklama metodları olarak iki ana başlıkta toplanabilir (Şekil 1.2) (Sharma vd 2003). Fiziksel tutuklama yöntemleri, enzimin katı destek üzerine zayıf bağlarla tutunmasıyla oluşur. Kimyasal tutuklama yöntemleri ise enzimlerin fonksiyonel hale getirilmiş katı maddelere kovalent olarak bağlanmasıyla veya biyomoleküllerin moleküller arası çapraz bağlanmasıyla gerçekleştirilebilir. Genel olarak, kimyasal tutuklama yöntemleriyle hazırlanmış biyosensörler daha uzun bir raf ömrüne sahip olurken, fiziksel tutuklama ile hazırlanan biyosensörlerde enzimatik aktivite daha yüksek olmaktadır (Choi 2004, Sassolas vd 2012).

Her bir tutuklama yönteminin birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Bu avantaj ve dezavantajlar Çizelge 1.2’de yer almaktadır:

Çizelge 1.2. Enzim tutuklama yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları (Scouten vd 1995)

Tutuklama yöntemi	Bağlanmanın doğası	Avantajları	Dezavantajları
Adsorpsiyon	van-der waals kuvvetleri, iyonik bağlama veya hidrofobik kuvvetler	Basit, kolay koşullar, daha az enzim kaybı	Enzim bağlarının pH, çözücü ve sıcaklığa bağlı olması, duyarlı olmama
Hapsetme	Yarı geçirgen bir membran arasındaki bağ	Her enzim için evrensel ve kolay bir yöntem	Büyük difüzyon bariyerleri, enzim aktivite kaybı, enzim moleküllerinin denatürasyonu
Çapraz bağlama	Çok fonksiyonlu araçlar arasındaki bağ	Basit yöntem, biyomolekülün güçlü bağlanması, enzim veya proteinlerin fiziksel adsorplanmasında yaygın bir şekilde kullanılması	Reaksiyon kontrolünün zor olması, büyük miktarlarda enzim gerektirmesi, enzim aktivitesinin düşük olması, protein tabakasının jelatinimsi doğası (sertlik eksikliği)
Kovalent bağlama	Membran ve çözünmez destek arasındaki bağ	Stabil enzim-destek kompleksi, biyomolekül sızıntısının olanaksızlığı	Karmaşık ve uzun zaman gereksinimi, aktivite kaybı



Şekil 1.2. Biyomolekülün tutuklama yöntemleri (Sharma vd 2003)

1.2.1. Adsorpsiyon

Enzim adsorpsiyonu, hidrofobik etkileşimlerden ve tuz bağlantılarından kaynaklanır. Burada elektrot enzime daldırılır veya enzim elektrot yüzeyinde kurutulur. Adsorplanmış enzim, hidrofobik ara yüzeyle etkileşimlerden, proteolizden ve agregasyondan korunur (Datta vd 2013).

Selüloz, silikajel, cam, kollojen ve hidroksiapatit iyi bilinen enzim adsorplayıcılarıdır. Bağlayıcı kuvvetler ağırlıklı olarak hidrojen bağlarından, çoklu tuz bağlantılarından ve van-der Waals kuvvetlerinden kaynaklanmaktadır (Sharma vd 2003).

Adsorpsiyonla enzim tutuklama metodu, enzim aktivitesini bozucu etki göstermez. Ancak buna rağmen, bu tekniğin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bu dezavantajlar arasında, enzimin destek üzerine gevşek bir şekilde bağlanması, sıcaklık, pH ve iyonik şiddetteki değişikliklerden kaynaklanan enzim desorpsiyonu gösterilebilir (Sassolas vd 2012).

1.2.2. Çapraz bağlama

Glutaraldehit ve heksametilen diizosiyanat, 1,5-difloro-2,4-dinitrobenzen gibi bifonksiyonel ya da çok fonksiyonlu ajanlar kullanarak biyomolekülün molekül içi çapraz bağlanması gerçekleştirilmektedir. Bu metod, biyomoleküller arasında güçlü kimyasal bağlanmanın başarılabilmesi ve yöntemin basitliğinden dolayı ilgi çekicidir. Ancak bu yöntemin, çapraz bağlanma sırasında aktif enzim konformasyonunun bozulması ve enzimin aktif bölgesindeki kimyasal değişiklikler nedeniyle enzimin aktivitesinde

meydana gelen düşüş gibi dezavantajları da mevcuttur (Choi vd 2004, Sharma vd 2003, Sassolas vd 2012).

1.2.3. Hapsetme

Hapsetme, bir jel ya da ağ içine kovalent ya da kovalent olmayan (non-kovalent) bağlarla enzimlerin tutuklanmasıdır. Bu tutuklama işlemi kolaydır. Enzim, medyatörler ve katkı maddeleri aynı algılayıcı tabakada eş zamanlı olarak depolanabilir. Bu işlemde biyolojik elemanın herhangi bir modifikasyonu söz konusu olmadığından, tutuklama süresince enzim aktivitesi korunur. Fiziksel olarak hapsedilmiş enzim temelli biyosensörler uygulama ve depolama kararlılığı yüksek olarak karakterize edilirler. Ancak, olası difüzyon bariyerleri ve biyobileşenin sızması gibi sınırlamalar, sistemin performansını kısıtlayabilir (Sassolas vd 2012).

Nanoyapılı desteklerle hapsetme kimya, biyomedikal biyosensörler ve biyoyakıt uygulamalarında devrim yaratmıştır. Kitosanda lipaz hapsedilmesiyle, enzim aktivitesi ve hapsetme verimliliğinin artırıldığı rapor edilmiştir. Bu desteğin ayrıca, hidrofilik doğasından dolayı protein için yüksek affiniteye olduğu, biyoyumlu olduğu ve toksik olmadığı da bilinmektedir. Mezogözenekli silika yüksek yüzey alanına, yüksek adsorpsiyon kapasitesine ve ayarlanabilir gözenek boyutuna sahip olmasından dolayı hapsetme işleminde kullanılabilir (Datta vd 2013).

1.2.4. Kovalent bağlama

Kovalent bağlama, en yaygın kullanılan enzim tutuklama metotları arasında yer almaktadır. Enzim ve matris arasında kararlı bağların oluşumundan dolayı, kullanılan enzimin çözelti içine salınmaması bu metodun bir avantajıdır. Kovalent bağlamayı kuvvetlendirme uğruna, katalitik aktivite için gerekli olan amino asit kalıntılarının destek üzerine bağlanmaması gerekir. Bu bazı durumlarda yerine getirilmesi zor bir koşuldur. Aktivite verimini geliştirmede basit bir yöntem, substrat analogların varlığında eşleştirme reaksiyonunu gerçekleştirmektir. Tutuklama için kovalent bağlama metotları, üründe enzimin yokluğu konusunda bir koşul olduğu durumlarda kullanılır (Brena ve Batista-Vieira, Second edition). Genellikle, proteinlerin amino asit yan zincirlerinde bulunan amino, karboksilik, imidazol, tiyol ve hidroksil gibi nükleofilik fonksiyonel gruplar eşleştirme için kullanılır. Genel olarak bu eşleştirme metotları iki ana sınıfta toplanabilir (Sharma vd 2003):

- 1) Bir polimer için bir reaktif fonksiyonun eklenmesiyle matrisin aktivasyonu
- 2) Aktive edilmiş bir grup üretmek için polimer omurgasının modifikasyonu (Brena ve Batista-Vieira, Second edition)

1.3. Alkoller

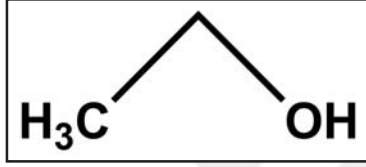
Alkoller (ROH) yapısında, hidroksil (-OH) grubu içeren organik bileşiklerdir. Yapılarındaki bu -OH grubu, kuvvetli bir şekilde polar olduğu ve hidrojen bağına katılabildiği için, alkoller en yaygın polar organik bileşikler arasındadırlar. Etanol ve Metanol gibi bazı basit yapıları alkoller, su ile karışabilmektedir (Wade 1999). Alkollerdeki oksijen atomları sp^3 melezleşmiştir ve bu bileşiklerde oksijenin dört sp^3

melez orbitalinden ikisi bağ oluşumunda kullanılırken diğer iki orbital, ortaklaşmamış birer elektron çiftiyle doldurulmuştur (Yıldırım 2011).

Alkoller hem laboratuarlarda hem de endüstride çözücü ve reaktif madde olarak büyük öneme sahiptirler. Bunun dışında, etanol alkollü içkilerde, metanol özellikle ağaç endüstrisinde ve formaldehit üretiminde, 2-propanol de antibakteriyal özelliğinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır (Yıldırım 2011).

1.3.1. Etanol (Etil alkol)

Primer alkollerin bir üyesi olan, C₂H₅OH formülüne sahip, kendine özgü koku ve tadıyla renksiz bir sıvı olarak bilinen etanol, kimya endüstrisinde özellikle çözücü olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Şekil 1.3). Ayrıca, alkollü içeceklerde birincil alkol bileşeni olarak binlerce yıldır kullanım alanı bulmasının yanı sıra, özellikle 1970'lerden günümüze kadar geçen sürede, boya, deterjan ve yakıt endüstrisinde kullanımında potansiyel bir şekilde önem kazanmıştır (Wasserman 2015).



Şekil 1.3. Etanolün molekül formülü

Etanol, basit şekerlerin fermantasyonuyla, etilenin hidrasyonu ve asetilenden elde edilen asetaldehitin indirgenmesiyle elde edilmektedir. Fermantasyon işleminden alkol eldesi genellikle, karbonhidrat bakımından zengin üzümlerin ekstraktlarını ve diğer fermantasyon ürünlerini içermektedir (Wasserman vd 2015). Bütün etanol içerikli içecekler ve endüstriyel etanolün yarısından fazlası bu işlemle elde edilmektedir. Fermantasyon reaksiyonu basit bir şekilde aşağıdaki gibi gösterilebilir (Shakhashiri 2009):



Maya fermantasyonuyla alkol üretimi maksimum %14 konsantrasyonunda elde edilir. Çünkü, daha yüksek konsantrasyonlarda maya etkinliğini kaybeder. Viski ve vodka gibi daha yüksek alkol içerikli içkileri üretmek için, sulu çözeltiye damıtma işlemi uygulanmalıdır (Solomon ve Fryhle 2002, Wasserman vd 2015).

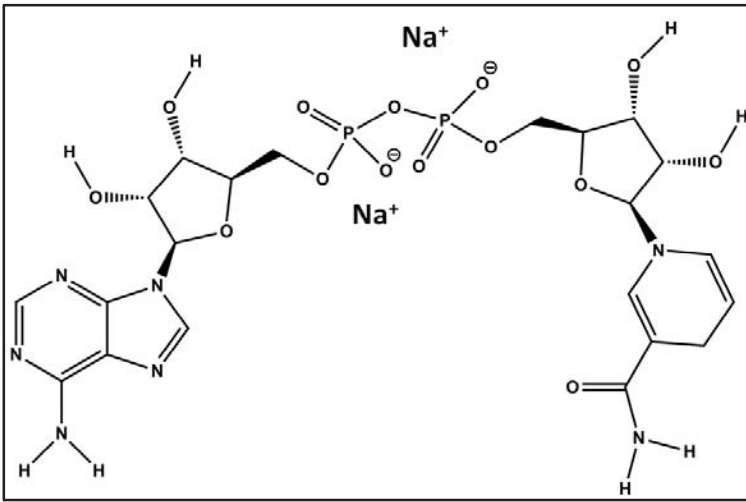
Etanol klinik ve endüstriyel analizlerde önemli bir rol oynadığı için, çeşitli numunelerdeki etanolü hızlı ve güvenilir bir şekilde tayin etmek dikkat edilmesi gereken bir konudur. Etanolün tayini; gıda ve içecek dahil bazı endüstrilerde fermantasyon işlemi kontrol etmek için oldukça önemlidir. Etanolün ölçümü, özellikle bira, şarap ve keyif vericilerin kalite-kontrolüyle ilişkilidir (Santos vd 2003).

Etanolün belirlenmesi için destilasyon, spektrofotometrik ve kromatografik analizler gibi birçok metot geliştirilmiştir. Ancak bu metotlar, zaman harcayan, pahalı ve yorucu ön işlem gerektiren kompleks yöntemlerdir. Bu nedenle, etanolü tayin etmek

için ucuz, hızlı ve güvenilir yöntemlere talep vardır. Özellikle hassas amperometrik biyosensörler gibi elektrokimyasal teknikler, bu tür bir analiz için uygun yöntemlerdir. Bu biyosensörler, seçicilik, duyarlık, taşınabilirlik, hızlı, düşük maliyetli ve minyatürleştirme potansiyeli gibi birçok uygun analitiksel karakteristikliklere sahiptir (Santos vd 2003).

1.4. Nikotinamid adenin dinükleotit koenzimi

Nikotinamid adenin dinükleotitin indirgenmiş formu (NADH) ve onun yükseltgenmiş formu NAD^+ , 300'den fazla dehidrojenaz enziminin katıldığı enzimatik reaksiyonlarda önemli bir koenzimdir. (Eguilaz vd 2016, Radoi ve Compagnone 2009). NADH'nin kimyasal yapısı Şekil 1.4.'da verilmiştir.

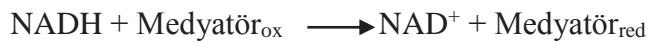


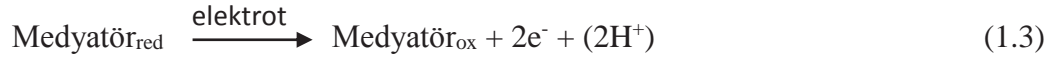
Şekil 1.4. NADH'nin kimyasal yapısı

NADH'nin kantitatif tayininde düşük maliyet, yüksek duyarlık, kısa cevap zamanı, mutlak tekrarlanabilirlik gibi bilinen avantajlarından dolayı elektrokimyasal teknikler oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. NADH'in elektrokimyasal yükseltgenmesi, dehidrojenaz bazlı amperometrik sensörler geliştirilmesinde oldukça dikkat çekmiş ve aşağıdaki reaksiyon önerilmiştir (Li vd 2013, Katakis ve Dominguez 1997, Eguilaz vd 2016).



Ancak, yalnız elektrotlarda NADH'nin doğrudan yükseltgenmesi +0,6 V gibi yüksek bir potansiyel gerektirmektedir. Dahası, NADH'in elektro-yükseltgenmesi son derece tersinmezdir ve genellikle elektrotta kirlenmeye yol açar (NAD^+ oluşumundan dolayı). Yüksek potansiyeli azaltmak ve elektrottaki kirlenmeyi en aza indirmek için azin boyaları, kinonlar, metal nanopartiküller ve karbon nanomateryaller gibi etkili elektron transfer medyatörleri ve katalistler elektrot yüzey modifikasyonu için kullanılmaktadır (Li vd 2013). Bu yüksek potansiyeli azaltmak için geliştirilen strateji aşağıdaki eşitlikteki gibidir (Katakis ve Dominguez 1997):

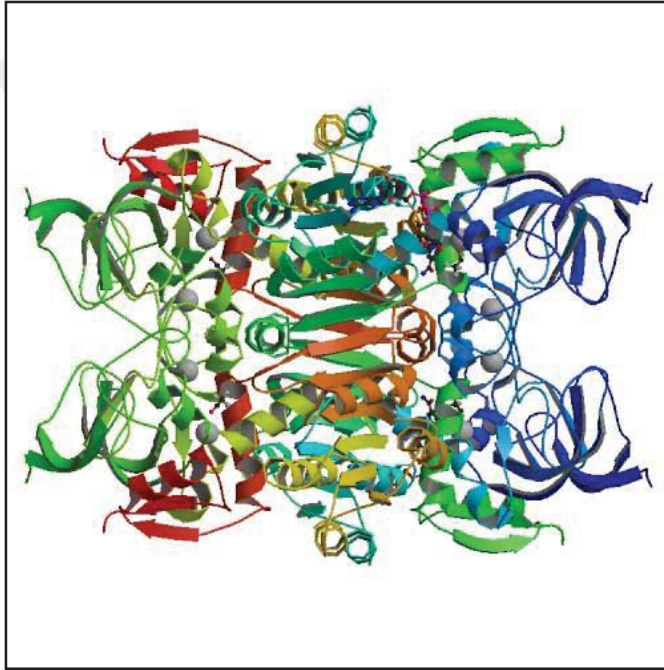




Bu stratejiye göre bir elektrokimyasal katalist, elektrot yüzeyinde daha düşük bir aşırı potansiyelde başarılı bir şekilde NADH'nin tersinir yükseltgenmesinin oluşumuna izin verir. Bu yaklaşım, hem elektrokimyasal biyokatalistin gelişmesi hem de biyosensörler için önemlidir (Katakis ve Dominguez 1997).

1.5. Alkol dehidrojenaz enzimi

Alkol dehidrojenaz (ADH, EC 1.1.1.1), bütün biyolojik indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonlarının katalizlenmesinden sorumlu oksidoredüktaz ailesine ait olan bir metalloenzimdir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Alkol dehidrojenaz enziminin üç boyutlu yapısı (Savarimuthu vd 2014)

ADH molekülleri, büyüklüklerine göre ve kofaktör gereksinimine göre 3 sınıfa ayrılırlar (Guy vd 2003) :

- 1) Zincir başına yaklaşık 370 kalıntı içeren Tip 1 veya orta zincirli enzimler
- 2) Metal iyonu içermeyen ve zincir başına yaklaşık 250 kalıntı içeren Tip 2 veya kısa zincirli enzimler
- 3) Zincir başına yaklaşık 385 kalıntı içeren uzun zincirli enzimler

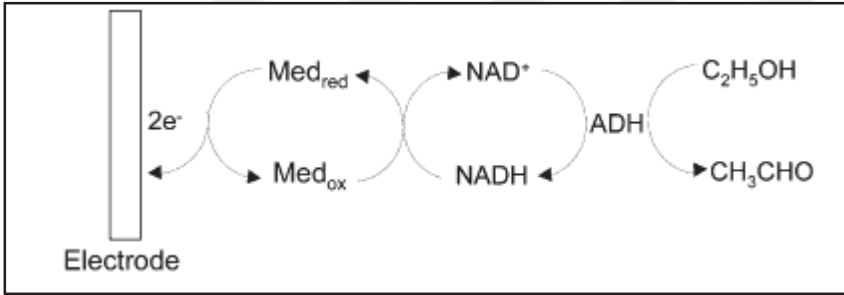
ADH monomeri, biri aktif bölgede diğeri de monomerin yüzeyindeki bir kıvrımda bulunan 2 çinko iyonu içerir. ADH enziminin aktif bölgesi, katalitik çinko iyonu yakınlarında merkezlenmiştir ve hem substrat hemde kofaktör NADH'nin

yerleşebileceği bu aktif bölge, bir çukur ile ayrılmıştır. ADH molekülü, kofaktör NADH'nin varlığında kristalize edilebilir (Guy vd 2003).

ADH, NAD⁺ koenzimiyle birlikte metanol harici alifatik ve aromatik alkollerin oksidasyonunu eşitlik 1.4'te görüldüğü gibi tersinir bir şekilde katalizleyen bir enzimdir (Azevedo vd 2005).



ADH temelli etanol biyosensörleri, alkol oksidaz (AOx) temelli biyosensörlerden daha kararlı ve özgündür. Ama yine de, ADH biyosensörlerine NAD⁺'nin ilavesi gerekir. Ayrıca kofaktörün enzime çok yakın olması gerekir (Azevedo vd 2005). Şekil 1.6'da karbon elektrot yüzeyinde ADH ile katalizlenmiş etanol ve NAD⁺'nin reaksiyonuyla oluşan NADH'nin takibi verilmiştir. NAD⁺ ve medyatör konsantrasyonları sabit olduğu için elektrokatalitik akımdaki artış sadece alkol konsantrasyonu (NADH oluşumu)'na bağlıdır ve bu özellik etanol tayini için bir biyosensör geliştirilmesinin temeli olarak kullanılır (Santos vd 2003).



Şekil 1.6. Medyatör varlığında etanolün yükseltgenmesinde ADH/NAD⁺ bazlı biyosensör mekanizması (Santos vd 2003)

1.6. Rosmarinik asit

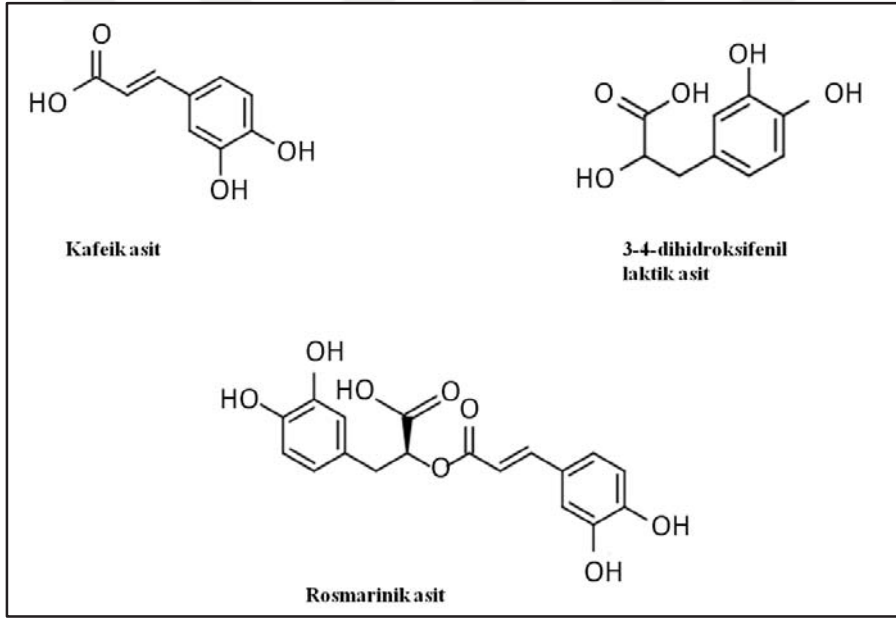
Antioksidantlar, serbest radikalleri temizleyebilen ve oksidatif hasarı geciktirebilen veya önleyebilen, sentetik ya da doğal maddelerdir. Meyve ve sebzelerin, yüksek miktarlarda antioksidant içerdikleri bilinmektedir. Özellikle fenolik antioksidantlar gibi çeşitli bileşiklerin, kalp hastalıkları ve kanser gibi çeşitli hastalıkların önlenmesine önemli oranda katkıda buldukları bilinmektedir (Cortina vd 2012). Serbest radikalleri temizleme özelliklerinden dolayı önemli bir antioksidant kaynağı olan hidroksisinamik asit ve fenilpropanoidler bu bileşikler arasında gösterilebilirler (Petrucci vd 2006).

Bir redoks ajanı olan antioksidantlar, oldukça tersinmez olan NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesindeki yüksek potansiyeli azaltmak ve elektrotta meydana gelen kirlenmeyi en aza indirmek için medyatör olarak kullanılabilir. NADH'nin yükseltgenmesinde bir redoks medyatörü olarak o-kinon/o-hidrokinon türevli redoks çiftleri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. NADH'nin yükseltgenmesinin redoks medyatör reaksiyonu aşağıdaki gibidir (Zare ve Golabi 1999, Zanardi vd 2015):



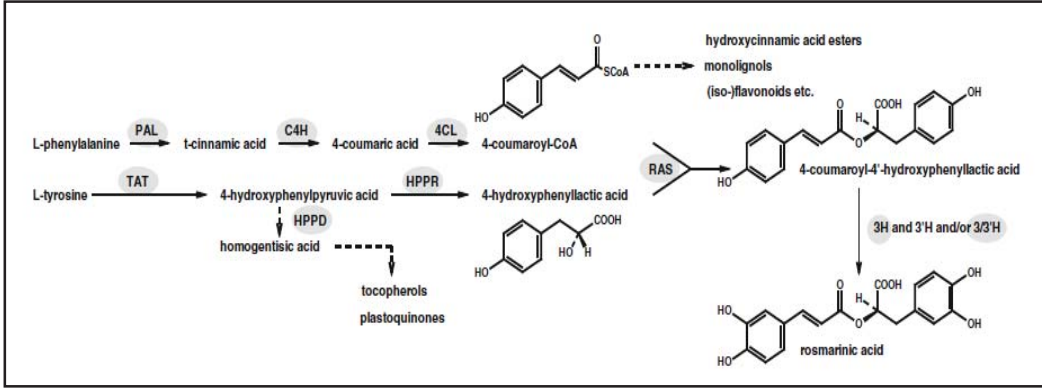
Bu elektrokatalitik sürecin oluşması sayesinde NADH yükseltgenmesi, yalın elektrot yüzeyine göre daha düşük bir potansiyelde meydana gelmektedir (Zanardi vd 2015). Yukarıda da belirtildiği gibi daha az pozitif potansiyelde NADH'nin yükseltgenmesi, elektrot yüzeyinde meydana gelen dezavantajları en aza indirmektedir.

Bir hidroksisünamik asit türevi olan rosmarinik asit (RA), kafeik asit ve 3,4-dihidroksifenillaktik asidin bir esteridir. RA yapısında iki fenolik grup ve her iki grupta da ortak olarak orto-pozisyonunda iki hidroksil grubu içerir (Şekil1.7). HIV-1 virüsü ve kan pıhtılaşmasını önleme özelliği ve ayrıca antihepatit, antiviral ve antibakteriyel gibi çok sayıda ilgi çekici biyolojik aktiviteye sahiptir. Ayrıca, yapısında iki elektroaktif katekol grubu bulundurmasından dolayı, bir elektron-proton donör mekanizması ile serbest radikalleri nötralize edebilme özelliğine de sahiptir (Franzoi vd 2008, Santhiago vd 2008, Gil vd 2013).



Şekil 1.7. Kafeik asit, 3-4-dihidroksifenil laktik asit ve Rosmarinik asitin kimyasal yapısı

RA, yaygın olarak Boraginaceae ailesinin türlerinde, Lamiacea ailesinin Nepetoidea alt familyasında ve ferns ve hornworts gibi daha küçük bitkilerde bulunur. RA'nın kimyasal sentezi, uzun bir süre boyunca araştırılmış ve en sonunda Albrecht tarafından 1991 yılında bulunmuştur. Daha sonraki zamanlarda da çok sayıda RA ve metil ester, farklı stereoisomer ya da daha az hidroksillenmiş isorinik asit gibi RA türevlerinin kimyasal sentezi tarif edilmiştir. Şekil1.8'da Coleus blumei türlerinin süspansiyon kültürlerinde bulunan RA'nın biyosentez yolu gösterilmiştir (Petersen ve Simmonds 2003):

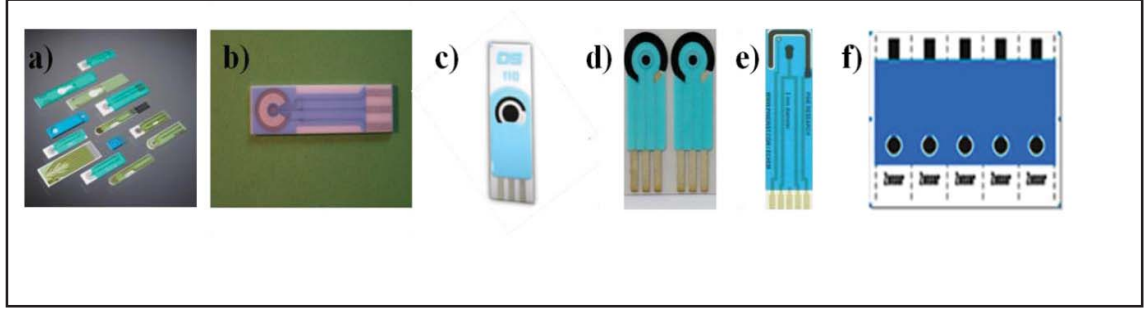


Şekil 1.8. *Coleus blumei* türlerinin süspansiyon kültürlerinde bulunan RA'nın biyosentez yolu PAL: Fenil alaninamonyumliyaz, CAH: Sinamik hidroksilaz, 4CL: 4-hidroksisinamik asit CoA-ligaz, TAT: Tirozin aminotransferaz, HPPR: Hidroksifenil piruvat redüktaz, HPPD: Hidroksifenil piruvat dioksijenaz, RAS: Rosmarinik asit sentaz, 3-H,3'-H 3 ve 3'- hidroksilaz: Hidroksisinamoil-hidroksi fenillaktat 3- ve 30 hidroksilaz (Petersen 2013)

Şekil 1.8'den de görüldüğü gibi biyosentez, L-fenilalanin ve L-tirozin aminoasitleri ile başlar ve bu biyosenteze fenilalanin amonyumliyaz (PAL), sinamik asit 4-hidroksilaz (CAH), 4-hidroksisinamik asit CoA-ligaz (4CL), tirozin aminotransferaz (TAT), hidroksifenil piruvat redüktaz (HPPR), hidroksifenil piruvat dioksijenaz (HPPD), Rosmarinik asit sentaz (RAS) ve 3'-H 3- ve 3'-hidroksilaz enzimlerinin katıldığı bilinmektedir (Petersen 2013).

1.7. Yüzeysel baskılama tekniği ve yüzeysel baskılı elektrotlar

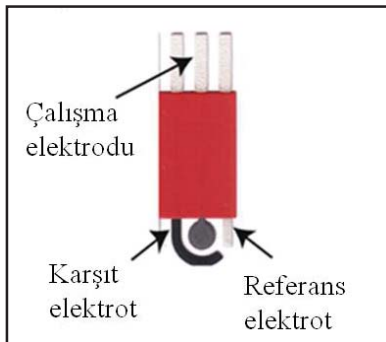
Yüzeysel baskılama tekniği, tek kullanımlık elektrotların ve biyosensörlerin üretimi için iyi yapılandırılmış ve basit bir işlemdir (Fanjul-Bolado vd 2007). Yüzeysel baskılı elektrot temelli biyosensörler, bio-aygıtların kullanımıyla gerçek numunelerin in-vivo ve in-vitro analizlerine olanak sağlayan minyatürleştirilmiş sistemlerdir. Bu nedenle, yüzeysel baskılama tekniği, tek kullanımlık biyosensörlerin büyük ölçekli üretimlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Şekil 1.9'da çeşitli markalarda ve farklı şekillerde olan yüzeysel baskılı elektrotlar yer almaktadır (Tudorche ve Bala 2007):



Şekil 1.9. Çeşitli markalardaki yüzey baskılı elektrotlar a) Bosens b) BVT c) DropSens d) Rusens e) Pine Instrument f) Zensor

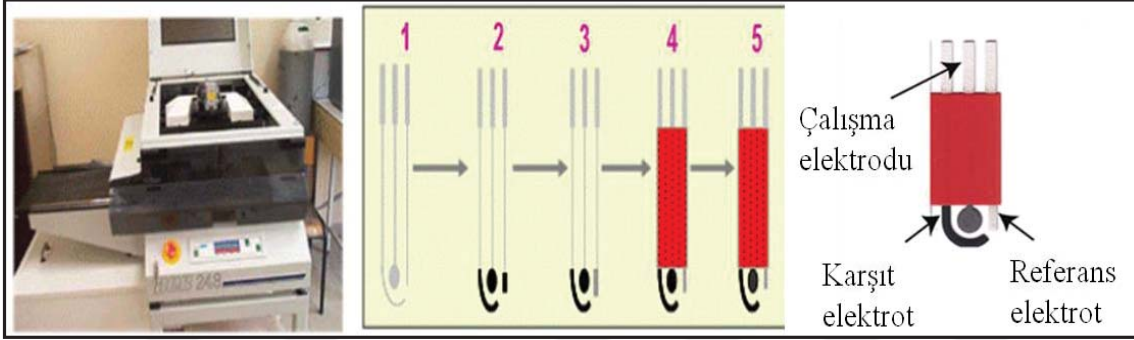
Yüzey baskılı elektrotlar sadece maliyet etkinliği sorununu değil, aynı zamanda taşınabilirlik gereksinimini de karşılamaktadır. Yüzey baskılı elektrotların uyumluluğu, araştırma alanında hayati bir öneme sahiptir ve ticari olarak farklı mürekkepler, elektrotları kolaylıkla modifiye etmek için kullanılabilir. Son olarak, kalibre edilmiş elektrotlar da, spesifik hedef analitler için üretilmektedir. Çevresel izleme için; soy metaller, anorganik nanomateryaller, proteinler, enzimler ve DNA dizileri gibi bir çok yüzey baskılı elektrot modifiye edicileri bulunmaktadır. Yüzey baskılı elektrotlar, basit, ucuz analitik yöntemlerle, kullanım ve taşınabilirlik kolaylığı özelliklerini birleştirmektedir. Özellikle son yıllarda da görüldüğü gibi, bu elektrotlar geliştirilmiş performans elde etmek için yerinde çevresel izlemeye kolayca uyarlanabilir (Hayat ve Marty 2014).

Yüzey baskılı elektrotlar çalışma, karşıt ve referans elektrot olmak üzere üçlü elektrot sisteminden oluşmaktadır (Şekil 1.10'da). Ticari karbon ve metal (Pt ya da Au) mürekkep bileşimleri, çalışma elektrodu baskılamasında yaygın olarak kullanılmasına karşın, gümüş bazlı mürekkepler referans elektrot elde etmek için kullanılmaktadır. Karbon mürekkepler, düşük zemin akıma ve geniş potansiyel aralığına yol açtıkları ve masrafsız oldukları için ilgi çekici olmuşlardır. Böylesi mürekkepler, grafit parçacıklarından, polimer bağlayıcıdan ve diğer katkı maddelerinden oluşmaktadır. Mürekkep bileşimdeki farklılıklar, karbon sensörün tüm analitiksel performansını etkileyebilir (Wang vd 1998, Taleat vd 2014).



Şekil 1.10. Yüzey baskılı elektrot bileşimi (Tudorche ve bala 2007)

Kalın film elektrot üretim işleminde temel basamaklar, düzlemsel substrat materyali (şablon veya maske aracılığıyla) uygun mürekkebin yüzeye baskılanması ve hemen ardından uygun sıcaklıkta pişirilmesidir (Wang vd 1998). Böylece, çok sayıda mürekkep ve substrat materyalleri, büyük miktarlarda düşük maliyetli sensör çubukları üretiminde kullanılabilir. Şekil 1.11’de bir yüzey baskılı elektrodun üretim aşamaları verilmiştir (Hayat ve Marty 2014).



Şekil 1.11. Üçlü bir elektrot sisteminin üretimi. Kimyasal olarak inert substrat; çalışma ve karşıt elektrodun yüzey baskılanması; referans elektrodun yüzey baskılanması; koruyucu tabakanın yüzey baskılanması; ilgili analitle çalışma elektrodun inkübasyonu (Hayat ve Marty 2014).

1.8. Voltametri

Bir indikatör yada çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlar altında akımın, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülmesinden faydalanan ve analit hakkında bilgi edinilmesini sağlayan bir grup elektroanalitik yöntemi kapsayan metot voltametri olarak adlandırılmaktadır (Skoog vd 2004). Voltametrik yöntemlerin diğer analitik yöntemlere göre birçok avantajı vardır (Kouvanes):

- Hem organik hem de anorganik türler için geniş bir konsantrasyon aralığında üstün duyarlık (10^{-12} - 10^{-1} M)
- Geniş sıcaklık aralığı
- Çeşitli analitlerin eş zamanlı tayini
- Düşük miktarlarda numune gereksinimi

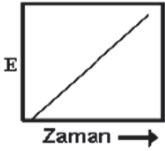
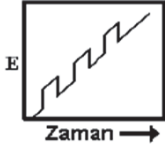
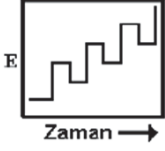
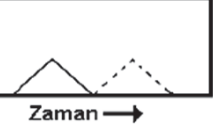
Tarihsel olarak elektrokimyanın bir bölümü olan voltametri, 1959 yılında kimya alanında Nobel ödülü alan Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından 1922 yılında bulunmuştur. 1960 ve 1970 yıllarında voltametrimin tüm alanları (teori, yöntem ve enstrümantasyon)’nda yöntemin duyarlığı ve seçiciliğini arttıran önemli gelişmeler yapılmıştır. Yine aynı yıllarda, düşük maliyetli yükselticilerin geliştirilmesiyle nispeten daha ucuz aletlerin yapılması mümkün kılınmıştır (Kouvanes)

Voltametri, anorganik, fiziko ve biyokimyacılar tarafından çeşitli ortamlarda meydana gelen yükseltgenme ve indirgenme işlemlerinin incelenmesi, yüzeylerdeki adsorpsiyon işlemlerinin araştırılması ve kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot

yüzeylerindeki elektron aktarım mekanizmalarının aydınlatılması gibi temel çalışmalar için oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Skoog vd 2004).

1.8.1. Uyarma sinyalleri

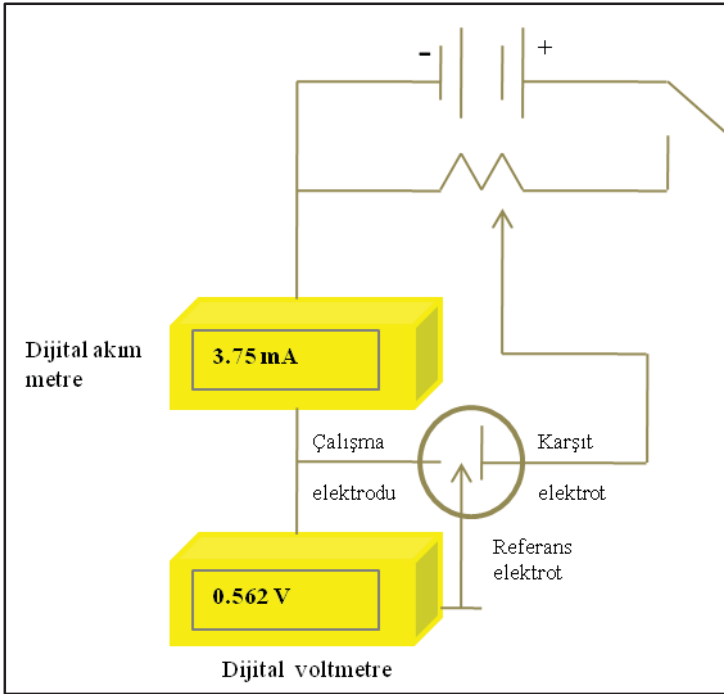
Voltametrde, çalışma elektrodunun voltajı, sistematik olarak değiştirilirken, akım ölçülür. Elektroda, zamana göre değişimli çok farklı voltajlar uygulanabilir ve voltaj-zaman fonksiyonlarına “uyarma sinyali” denir. Bu sinyallerin en basiti, çalışma elektrodunun potansiyelinin zamanla doğrusal değiştirildiği doğrusal taramadır (genellikler 1-2 V arasında). Voltametrde en çok kullanılan dört uyarma sinyalinin dalga şekli, Şekil 1.12’de verilmiştir. Klasik voltametrde uyarma sinyali, hücreye uygulanan doğru akım potansiyelin zamanın bir fonksiyonu olarak doğrusal bir şekilde arttığı bu sırada da, hücrede oluşan akım uygulanan potansiyelin fonksiyonu olarak kaydedildiği Şekil 1.12a’da gösterilen doğrusal taramadır. Şekil 1.12b ve c’deki tane puls tipi uyarma sinyali görülmektedir. Burada akımlar, bu pulsların ömrü süresince çeşitli anlarda ölçülür. Potansiyel, Şekil 1.12d’de görülen üçgen sinyallerde, biri maksimum diğeri de minimum iki değer arasında değişir. Bu artma-eksilme süreci ardı ardına tekrarlanırken, potansiyelin bir fonksiyonu olarak akım ölçülür.

<u>Adı</u>	<u>Dalga şekli</u>	<u>Voltametrinin tipi</u>
a) Doğrusal taramalı		Polarografi Doğrusal-taramalı voltametri
b) Diferansiyel puls		Diferansiyel puls polarografisi
c) Kare dalga		Kare dalga voltametrisi
d) Üçgen		Dönüşümlü voltametri

Şekil 1.12. Uyarma sinyalleri (Skoog vd 2004)

1.8.2. Voltametrik cihazlar

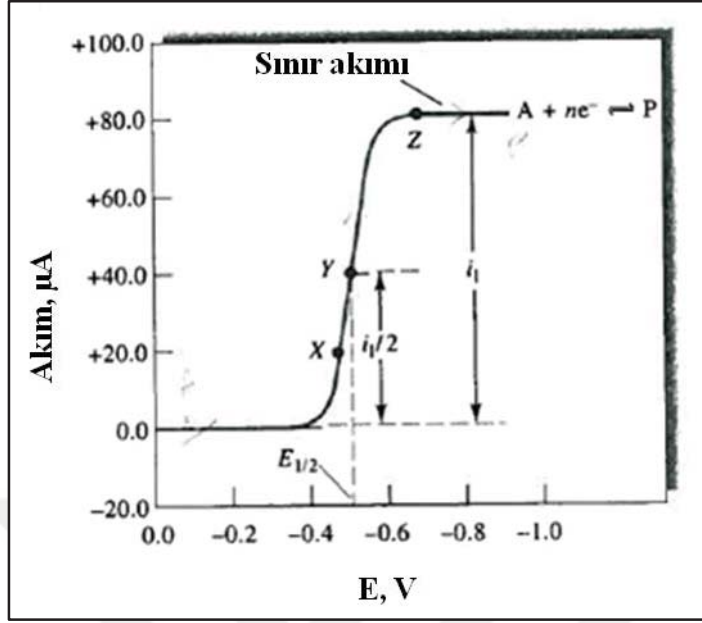
Şekil 1.13’de doğrusal-taramalı voltametrik ölçümlerin yapılması için kullanılan basit bir düzeneğin parçaları görülmektedir. Hücre, analit ve destek elektrolit adı verilen, elektrolidin aşırısını içeren bir çözeltiye daldırılmış üç elektrottan yapılmıştır. Bu üç elektrottan biri, zamanla potansiyeli doğrusal olarak değişen mikroelektrot veya *çalışma elektrodudur*. Bu elektrodun polarize olma eğilimini attırmak için boyutları ufak tutulur. İkinci elektrot, potansiyeli deney süresince sabit kalan bir *referans elektrottur*. Üçüncü elektrot ise, ya helezon şeklinde sarılmış bir Pt tel ya da bir civa havuzu şeklinde olan ve elektriğin kaynaktan çözelti içinden mikroelektroda aktarılmasını sağlayan *karşıt elektrottur*. Sinyal kaynağı, değişken bir R direnci ile seri bağlanmış bir bataryadan ibaret olan değişken güç kaynağıdır. İstenen potansiyel, C sürgüsünü direnç boyunca uygun yere hareket ettirmek suretiyle sağlanır (Skoog vd 2004).



Şekil 1.13. Voltametri için manuel bir potansiyostat (Skoog vd 2004)

1.8.3. Voltamogramlar

Bir civa film mikroelektrot üzerinde bir A türünün bir P ürününe indirgendiği bir elektroliz için tipik bir doğrusal-taramalı voltamogram Şekil 1.14’de görülmektedir. Burada, uygulanan potansiyellerin negatif bir işaret alması için, elektrodun doğrusal tarama jeneratörünün negatif ucuna bağlandığı varsayılmaktadır. Genel olarak, katodik akımlar daima pozitif işaretle gösterilirken anodik akımlar negatif işaretle gösterilir. Bu hipotetik deneydeki çözeltinin A yönünden yaklaşık 10^{-4} M, P yönünden 0,0 M ve destek elektrolit olan KCl yönünden 0,1 M olduğu varsayılır. Aşağıda çalışma elektrodunda meydana gelen tersinir yarı-reaksiyon verilmiştir:



Şekil 1.14. Bir hipotetik A ürününün bir P türü vermek üzere indirgenmesi için doğrusal taramalı voltamogram (Skoog vd 2004)

Genellikle doğrusal-taramalı voltamogramlar, voltametrik dalga olarak bilinen sigmoidal eğriler (f-) şeklinde verilir. Kesin artıştan sonraki sabit akıma *sınır akımı* (i_1) denir. Çünkü bu akım, analitin kütle aktarım olayıyla elektrot yüzeyine taşınma hızı ile belirlenir. Sınır akımları genellikle analit derişimiyle doğru orantılı olarak değişir ve bu yüzden;

$$i_1 = kc_A \quad (1.7)$$

dir. Burada, c_A analit derişimini k ise bir sabiti ifade etmektedir. Kantitatif doğrusal-taramalı voltametri bu ilişkiye dayanmaktadır.

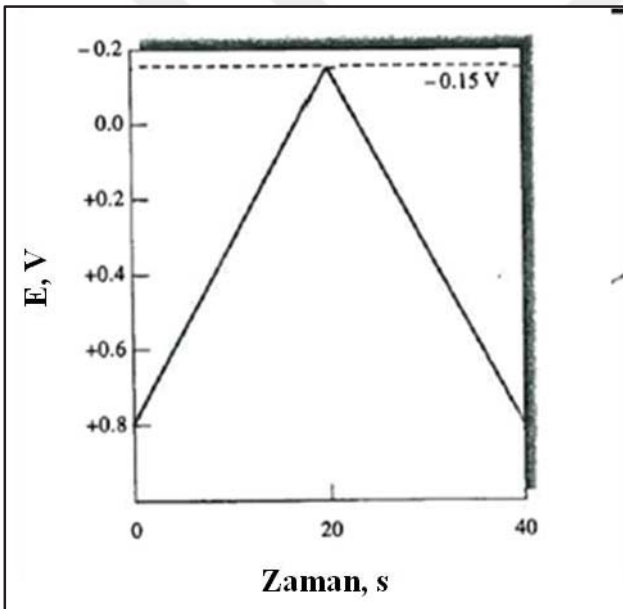
Yarı-dalga potansiyeli, akımın sınır akımının potansiyelinin yarısına eşit olduğu potansiyeldir ve $E_{1/2}$ sembolü ile gösterilir. Yarı-dalga potansiyeli, yarı-reaksiyonun standart potansiyeli ile yakından ilişkilidir; fakat genel olarak, bu değere tam eşit değildir. Yarı-dalga potansiyelleri bazen bir çözeltideki bileşenlerin tanınması için kullanılır (Skoog vd 2004).

1.8.4. Döngüsel voltametri

Döngüsel voltametri (CV), elektroaktif türlerin çalışılması için önemli ve yaygın kullanılan bir elektroanalitik tekniktir. Genellikle, yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarının incelenmesinde, reaksiyon ara ürünlerinin gözlenmesinde ve elektrotlarda oluşan ürünlerin oluşum sonrası reaksiyonlarını yakalamada kullanılmaktadır. CV tekniğinde, uygulanan potansiyel, önce bir yönde, sonrada o

yönün tersi yönde taramırken akım ölçülür. Bir CV deneyinde tek bir tam döngü olabileceği gibi bir yarım döngü veya birçok döngüler kullanılabilir (Skoog vd 2004).

Bir CV deneyinde, küçük boyutlu durgun bir elektrot, durgun bir çözeltide, Şekil 1.15'deki gibi ileri ve bunun tersi yöndeki potansiyel taramasını temsil eden üçgen dalga şeklinde, bir potansiyel uygulanır ve bir akım sinyali vermesi sağlanır. Bu örnekte, potansiyel önce +0,8 V'dan -0,15 V'a (standart kalomel elektroda karşı) değiştirilir. Daha sonra, tarama yönü ters yöne çevrilip potansiyelin başlangıçtaki +0,8 V değerine geldiği yerde tarama durdurulur ve burada her iki yöndeki tarama hızı 50 mV/s'dir. Çoğu zaman bu döngü, çok defa tekrarlanır. -0,15 V'dan +0,8 V'a taramanın ters döndüğü potansiyellere *dönüş potansiyeli* denir. Belirli bir deneyde, dönüş potansiyelleri, bir veya daha çok sayıda türün difüzyon kontrollü yükseltgenmesini veya indirgenmesini gözlemeyi mümkün kılacak şekilde seçilir. İlk taramanın yönü, örneğin bileşimine bağlı olarak, burada gösterildiği gibi, negatif yönde olabileceği gibi, pozitif de olabilir (Skoog vd 2004).

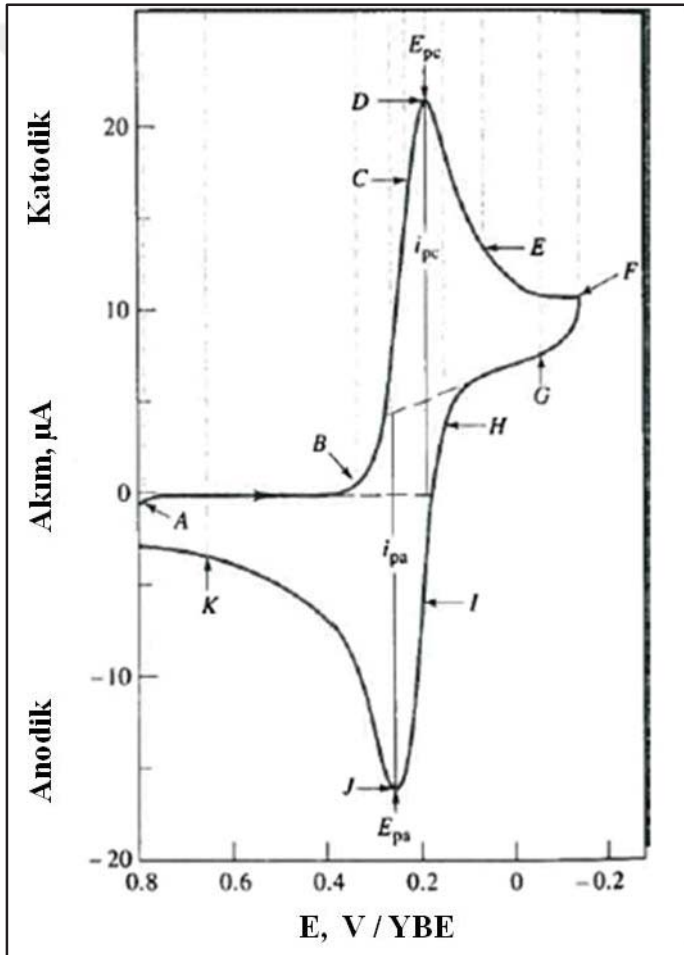


Şekil 1.15. Döngüsel voltametrik uyarma sinyali (Skoog vd 2004)

6 mM $K_3Fe(CN)_6$ ve 1 M KNO_3 içeren bir çözeltinin Şekil 1.15'deki döngüsel uyarma sinyaline maruz kaldığında elde edilen akım eğrisi Şekil 1.16 'da görülmektedir. Burada çalışma elektrodu, durgun bir Pt elektrot, referans elektrot ise doygun kalomel elektrottur. +0,8 V'luk başlangıç potansiyelinde çok küçük bir anodik akım mevcutken tarama ilerledikçe bu akım sıfırlanır. Bu çok küçük negatif başlangıç akımı suyun yükseltgenerek oksijen oluşturmaya ilişkindir (Daha pozitif potansiyellerde bu akım hızla büyür ve yaklaşık +0,9V'da oldukça büyük bir değer alır). +0,7 V'dan +0,4 V'a kadar akım sıfırdır. Çünkü, bu aralıkta indirgenebilir veya yükseltgenebilir bir tür yoktur. Potansiyel yaklaşık +0,4 V'dan daha az pozitif değerler aldığı zaman, katodik akım gelişmeye başlar (B noktası). Bu akım ferrisiyanürün ferrosiyanüre indirgenmesinden kaynaklanmaktadır. Buradaki katodik reaksiyon:



B ve D noktaları arasında, akım hızla yükselirken yüzeydeki $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ derişimi gittikçe azalır. Pik akımı, iki bileşene ayrılabilir. Birinci bileşen, reaktantın yüzey derişiminin Nerst eşitliği ile belirlenen denge değerine ulaşması için gerekli başlangıç akım artışıdır. İkinci bileşen ise, normal difüzyon kontrollü akımdır. İlk akım maksimumundan sonra hızla düşer (D'den F'ye kadar) çünkü, difüzyon tabakası elektrot yüzeyinden itibaren gittikçe kalınlaşmaktadır. F noktasında (-0,15 V) tarama ters yöne döner. Ama daha pozitif potansiyellere yönelmiş olsa bile elektrot potansiyeli hala $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ indirgenmesi için yeterince negatif olduğu için, akım hala katodiktir. Potansiyel pozitif değere doğru kaydıkça, artık $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ indirgenmesinin olmadığı bölgeye gelinir; akım sıfıra iner; sonra da anodik akım olur. Anodik akım, ileri tarama sırasında oluşup elektrot yüzeyi civarında biriken $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ türünün geri yükseltgenmesine ilişkindir. Bu anodik akım da bir pik yaparak, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, anodik reaksiyonda kullanıldıkça azalır.



Şekil 1.16. $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ yönünden 6 mM ve KNO_3 yönünden 1 M olan bir çözeltinin döngüsel voltamogramı (Skoog vd 2004)

Döngüsel voltamogramda önemli parametreler, katodik pik potansiyeli (E_{pc}), anodik pik potansiyeli (E_{pa}), katodik pik akımı (i_{pc}) ve anodik pik akımı (i_{pa})'dır. Tersinir bir elektrot reaksiyonunda, anodik ve katodik pik akımları mutlak değere

yaklaşık eşit olup işaretçe zıttır. Yine tersinir bir elektrot reaksiyonu için, 25°C'da, pik potansiyelleri farkının (ΔE_p),

$$\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}| = 0,059 / n \quad (1.9)$$

olması beklenir. Burada n , yarı-reaksiyonda kullanılan elektron sayısıdır. Elektron aktarım kinetiği çok yavaş olduğu için, tersinmezlik varsa ΔE_p beklenen değerden daha büyük çıkar. Bir elektron aktarım reaksiyonu, düşük tarama hızlarında tersinir gibi görülürken, tarama hızı büyüdükçe ΔE_p büyüyorsa, bu bir tersinmezlik işaretidir. Bu yüzden, elektrot aktarım kinetiğinin yavaş olup olmadığını gözlemlemek ve hız sabitlerini elde etmek için farklı tarama hızlarındaki ΔE_p değerleri bulunur.

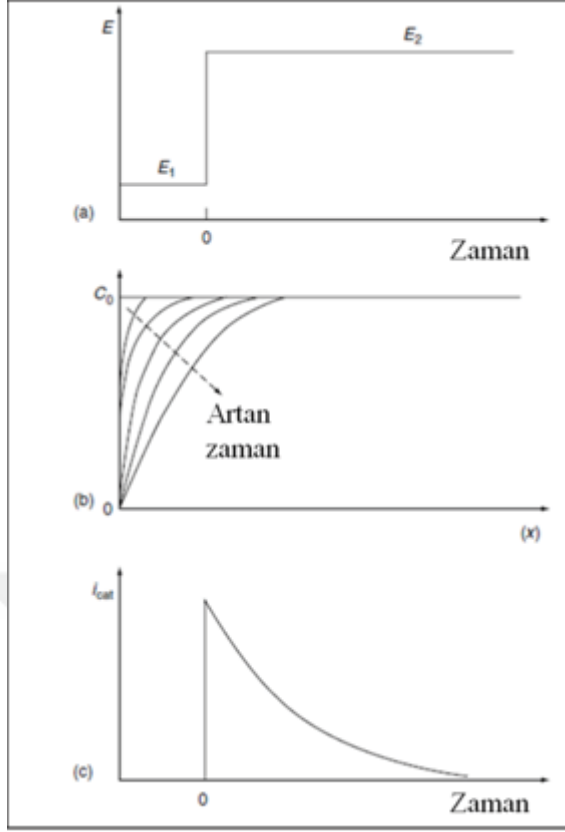
Nicel bilgi için, Randels-Sevcik eşitliği kullanılır. 25°C'da bu eşitlik aşağıdaki gibidir:

$$i_p = 2,686 \times 10^5 n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (1.10)$$

Burada i_p , pik akımı (Amper); A , elektrot yüzey alanı (cm^2); D , difüzyon katsayısı (cm^2/s); C derişim (mol/cm^3) ve v , tarama hızıdır (V/s). Döngüsel voltametri, derişim, elektrot yüzey alanı ve tarama hızı biliniyorsa, difüzyon katsayılarını tayin için bir yoldur (Skoog vd 2004).

1.9. Kronoamperometri

Kronoamperometri, karıştırma olmayan bir çözeltide, çalışma elektrodun potansiyelinin faradik reaksiyonun olmadığı bir değerden, elektroaktif türlerin yüzey konsantrasyonunun etkin bir şekilde sıfır olduğu bir potansiyele kademeli olarak değiştirilmesini içerir (Şekil 1.17a). Bu koşullar altında kütle transferi sadece difüzyonla olduğu için, akım-zaman eğrisi elektrodun yüzeyi etrafında konsantrasyon gradiyentindeki değişimi yansıtır. Bu, reaktantın tükenmesiyle ilgili difüzyon tabakasının kademeli bir genişlemesini içerir ve bu yüzden, zaman ilerledikçe konsantrasyon grafiğinin eğimi azalır (Şekil 1.17b). Dolayısıyla, akım (düzlemsel bir elektrotta) zamanla zayıflar (Şekil 1.17c) ve akımın zamanla değişimi aşağıdaki Cottrell denkleminde verildiği gibidir:



Şekil 1.17. Kronoamperometrik deney; a) potansiyel-zaman dalga-formu b) zaman ilerledikçe konsantrasyondaki değişim c) akım-zaman cevabı (Wang 2004)

$$i(t) = \frac{nFACD^{1/2}}{\pi^{1/2} t^{1/2}} \quad (1.11)$$

Burada n , F , A , C , D ve t sırasıyla elektron sayısı, Faraday sabiti, yüzey alanı, konsantrasyon, difüzyon katsayısı ve zamandır (Wang 2004). Bu eşitliğe göre akım, $t^{1/2}$ ile ters orantılıdır ve akım değerleri $t^{1/2}$ değerlerine karşı grafiklendirildiğinde elde edilen eğri orjinden geçer. Bu eğriden faydalanılarak, bir elektrot reaksiyonunun difüzyon kontrollü olup olmadığı ve elektroaktif maddenin difüzyon katsayısı ve aktarılan elektron sayısı belirlenebilir (Soğancı 2014).

1.10. Çalışmanın amacı

RA'nın, NADH'nin elektroyükseltgenme potansiyelini düşürmesi ve böylece mevcut NADH sensörlerine ve dehidrojenaz temelli biyosensörlere göre daha düşük bir potansiyelde amperometrik tayine olanak sağlayacağı düşünülmektedir. Bu nedenle bu çalışmada ilk olarak, yüzey baskılı elektrotlara RA'nın, döngüsel voltametri tekniği kullanılarak birikmesinin sağlanması ve döngüsel voltametri tekniği ile elde edilecek

voltamogramlardan yararlanılarak NADH'nin elektroyükseltgenmesinde RA'nın medyatör özelliğinin incelenmesi amaçlanmıştır. Daha sonra RA modifiyeli elektrotların, alkol dehidrojenaz enzimi ile modifiye edilmesiyle biyosensörlerin hazırlanması ve hazırlanan bu biyosensörlerin etanole verdiği yanıtların amperometrik yöntemler ile incelenmesi amaçlanmıştır.



2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

Literatürde medyatör temelli alkol biyosensörleri ile ilgili birçok çalışma olmasına karşın antioksidanların medyatör olarak kullanılmasına dair çok az çalışma vardır. Hatta sinamik asit türevli antioksidanlardan olan RA'ya ait çalışmaya literatürde hiç rastlanmamıştır. Bu nedenle bu bölümde sadece medyatör olarak antioksidan modifiyeli biyosensörlerde NADH'nin oksidasyonunu içeren çalışmalara ve tek kullanımlık elektrotlarla yapılmış olan amperometrik alkol biyosensörlerini içeren çalışmalara yer verilecektir.

Zare ve Golabi 1999 yılında, bir camısı karbon elektrodun yüzeyine elektro-kaplama yoluyla kafeik asit (KA)'in modifiye edilmesini temel alan bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada, çeşitli pH çözeltilerinde hazırladıkları elektrodun redoks özelliklerini incelemek amacıyla çeşitli tarama hızlarında dönüşümlü voltametri tekniği kullanmışlardır. Elde ettikleri voltamogramlardan elektrot cevabının pH ile ilişkisini 58,5 mV/pH olarak bulmuşlardır ki bu değerde beklenen Nerst değerine oldukça yakın olduğu bildirilmiştir. Yine hazırladıkları elektroda voltametri, kronoamperometri ve döner disk voltametri gibi tanı yöntemlerini uygulayarak, indirgenmiş NADH'nin elektrokatalitik oksidasyonunu incelemişlerdir. Daha sonra modifiye ettikleri elektrot ile modifiye edilmemiş bir elektrodu karşılaştırmışlar ve yaklaşık 450 mV üst potansiyelli bir azalma ile pH 7,0 fosfat tampon çözeltisinde NADH oksidasyonuna karşı güçlü ve kalıcı elektrokatalitik özellikler sergilediğini bulmuşlardır. Elektrokatalitik akımın, 0,05'den 1 mM test aralığındaki NADH konsantrasyonuyla doğrusal bir şekilde arttığını tespit etmişler ve elektrot yüzeyi ile immobilize KA arasındaki elektron transferi için görünür yük transfer hız sabiti ve transfer katsayısını; sırasıyla 11,2 ve 0,43 s⁻¹ olarak hesaplamışlardır. Ayrıca AA modifiyeli elektrot yüzeyinde NADH'nin oksidasyonu için heterojen hız sabiti belirlenmiş ve bu değer yaklaşık 3x10³ M⁻¹.s⁻¹ olduğu tespit edilmiştir. Son olarak Zare ve Golabi bu çalışmalarında NADH'nin difüzyon katsayısını kronoamperometrik sonuçlar kullanarak, 3,24x10⁻⁶ cm²/s olarak hesaplamışlardır (Zare ve Golabi 1999).

Lee ve Compton biyosensör gelişimine uygun bir polimer oluşturmak için camısı bir karbon elektrot yüzeyine Kafeik asidi modifiye ederek 2013 yılında bir biyosensör geliştirmişlerdir. Yüzeye bağlı türlerin polimer film içeriğini, elektro-kaplama yöntemini kullanarak daha da optimize etmişlerdir ve böylece, yüzey konsantrasyonunun yaklaşık olarak 10⁻⁹ mol.cm⁻² arttığını tespit etmişlerdir. Lee ve Compton bu çalışmalarında, dönüşümlü voltametri tekniğini kullanarak modifiye edilmiş karbon elektrotla, farklı konsantrasyonlardaki NADH, sistein ve glutation gibi koenzimlerin elektrokatalitik oksidasyonu gözlemlemişlerdir. Bu koenzimlerin elektrokatalitik oksidasyonundan faydalanarak, her bir durum için 300 nM-10 mM konsantrasyon aralığında bir kalibrasyon eğrisi elde etmişlerdir. Tayin sınırını; NADH, sistein ve glutation için sırasıyla 246, 99 ve 2,2 µM olarak hesaplamışlardır (Lee ve Compton 2013).

ADH, toluidin mavisi (TBO) ve NADH enziminin tutuklamasını temel alan özgün bir biyosensör, etanol tayini için geliştirilmiştir. Alpat ve Telefoncu 2010 yılında yaptıkları çalışmalarında ilk olarak ADH'yi, TBO'ya bağlı selüloz asetat ile modifiye edilmiş camısı bir karbon elektrot yüzeyine tutuklamışlardır. Daha sonra da yüzeyi,

etanol tayini için yeni bir voltametrik sensör sağlamak üzere bir çapraz bağlama (glutaraldehit/sığır serum albümin (BSA)) prosedürü ile kaplamışlardır. NADH/ADH sistemini, etanol tayininde bir biyosensör geliştirmek için basit ve etkili bir yol olarak belirtmişlerdir. Geliştirdikleri biyosensörün; sıcaklık, tekrarlanabilirlik, operasyonel ve depolama stabilitesi, çözeltilerin çalışma pH'sı, enzim aktivitesi, membran kalınlığı, substrat özgülüğü açısından cevabını karakterize etmişler ve bu biyosensörün aynı zamanda, iyi bir termal kararlılık ve uzun süreli depolama kararlılığı göstermesinin yanısıra düşük tayin sınırı ve hızlı yanıt verdiğini bildirmişlerdir. Sinyal/gürültü oranının üç katı olarak bulunan bir tayin sınırını, $5,0 \times 10^{-6}$ M olarak hesaplamışlardır. Hatta bu biyosensörün 20. günün sonunda bile hala başlangıçtaki etkinliğinin % 50'sini koruduğunu gözlemlemişlerdir. Alpat ve telefoncu çalışmalarında ayrıca optimize şartlar altında, çeşitli alkol içerikli (hafif % 3,0 (v/v); sert % 6,1 (v/v) ve normal % 5 (v/v) etanol) bira numunelerinde etanolün tayinini gerçekleştirmişlerdir. Etanol konsantrasyonu, matris etkilerinin ortadan kaldırılması nedeniyle standart ekleme yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde ettikleri sonuçların hafif, sert ve normal bira için sırasıyla $3,0 \pm 0,1$, $6,1 \pm 0,3$, $5,0 \pm 0,3$ hacim% Etanol olduğunu bulmuşlardır (Alpat ve Telefoncu 2010).

İnsan nefesindeki etanolünün tayininde ve diğer gaz bileşiklerinin kantitatif analizinde kullanılabilen tek kullanımlık ADH/NAD⁺ temelli amperometrik bir biyosensör, 1995 yılında Park ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Yüzey baskılama tekniği ile esnek poliester substrat üzerine karbon hamurunun baskılanmasını temel alan bir biyosensör hazırlamışlardır. Biyosensörün kullanımından önce aktivasyon edilmesi için sensör, ya nemlendirilmiş bir gaza maruz bırakılmış ya da bir tampon çözelti içine daldırılmıştır. Park ve arkadaşları bu çalışmalarında; etanol buharına karşı iyi bir lineer cevap elde ettiklerini ve tek kullanımlık amperometrik biyosensörün insan nefesindeki alkolünün belirlenmesi için tatminkar bir şekilde kullanılabileceğini kanıtladıklarını bildirmişlerdir (Park vd 1995).

NADH'in tayini için Kafeik asit temelli tek kullanımlık elektrokimyasal bir sensör 2015 yılında Zanardi ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Karbon siyahı nanopartikülleri (CB) ile modifiye edilmiş yüzey baskılı elektrot (SPE), elektrot yüzeyinde kafeik asitin (KA) istikrarlı bir şekilde depolanması için yeni bir yöntem olarak test edilmiştir. KA/CB kompozisyonunun çeşitli miktarından elektrokimyasal performans, NADH tayinine göre belirlenmiştir. KA/CB'nin elektrokatalitik etkinliği ayrıca, kaplamanın tek bir bileşeniyle, yani KA veya CB ile modifiye edilmiş SPE'lerin elektrokatalitik etkinliği ile karşılaştırılmıştır. Son olarak, tipik bir NADH'ye bağımlı enzim olan gliserol dehidrojenaz, KA/CB kaplama üzerine, sensörün gliserol tayininde uygulanabilirliğini test etmek için eklenmiştir. Bu amaçla uygulanan ilk testlerin, gıda kalite kontrolünde potansiyel uygulamalar açısından bu biyosensörün potansiyellerini derinleştirmeyi teşvik ettiğini gösterdiğini bildirmişlerdir (Zanardi vd 2015).

Klorojenik asitin elektrokimyasal çalışması için dönüşümlü voltametri, kronoamperometri, döner disk elektrot voltametrisinin yanı sıra kuantum kimyasal metotları kullanılmıştır (Namazian ve Zare 2005). Klorojenik asitin elektrokimyasal davranışı kuvvetli bir şekilde pH çözeltilerine bağlı olduğu tespit edilmiş ve pH 2,0-7,8 ve 7,8-10,0 aralığında eğim değerlerinin sırasıyla -57,1 ve -27,9 mV/pH olduğu bulunmuştur. Camsı karbon elektrotta klorojenik asitin oksidasyonu için, elektron

transfer katsayısı, α , ve heterojen elektrokimyasal reaksiyon hız sabitinin, k_h , sırasıyla 0,26 ve $2,1 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ olduğu bulunmuştur. Ayrıca, deneysel koşullarda kronoamperometrik sonuçlar kullanılarak klorojenik asitin difüzyon katsayısı da $1,46 \times 10^{-8} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır (Namazian ve Zare 2005).

Zare ve Golabi'nin 1998 yılında yaptığı çalışmada, inaktif bir camı karbon elektrotta, klorojenik asit çözeltisinin redoks cevabı araştırılmış ve elektrot hazırlama işlemi için bir ECE mekanizması önerilmiştir. Aktive edilmiş camı karbon elektrotta klorojenik asitin oksidasyonunun, elektrot yüzeyinde yaklaşık $4,5 \times 10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}$ kadar birikmiş bir tabakanın oluşumuna yol açtığını bildirmişlerdir. Biriktirme işlemi için dönüşümlü voltametri tekniği kullanılmış ve elde edilen modifiye elektrodun, yüzey-tutuklanmış redoks çiftleri için beklenen kinon: hidrokinon grubunun aktivitesini koruduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada Zare ve Golabi, farklı koşullarda elektrot hazırlama işlemi süresince elektro-kaplama filmlerin özellikleri ve depolanmış filmin kararlılığı belirlenmiştir. Bu filmlerin redoks aktivitesinin pH bağımlılığının pH birimi başına 57 mV olduğu bulunmuştur ki buda beklenen değere (pH birimi başına 59 mV) oldukça yakındır. Modifiye edilmiş elektrodun, yaklaşık 430 mV aşırı geriliminin azalması ve pik akımında bir artış ile fosfat tampon çözeltisi (pH 7,0) içinde, NADH oksidasyonu için güçlü ve kalıcı elektrokatalizör özellik sergilediği bildirilmiştir. Elektrokatalitik akımın, NADH konsantrasyonu ile 0,1-1,0 mM arasında doğrusal olarak arttığı belirlenmiş ve NADH elektrooksidasyonu için görünür elektron transfer hız sabiti, k_s , ve heterojen hız sabiti, k_h , sırasıyla dönüşümlü voltametri ve döner disk elektrot voltametri kullanılarak belirlenmiştir (Zare ve Golabi 1998).

3.MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasallar

B-nikotinamid adenin dinükleotit (NAD^+) ve β -nikotinamid adenin dinükleotitin indirgenmiş hali ($NADH$), rosmarinik asit, alkol dehidrojenaz (E.C. 1.1.1.1.,*Saccharomyces cerevisiae*'den) ve glutaraldehit (GA) (%25'lik a/h) çözeltisi Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Potasyum dihidrojenfosfat (KH_2PO_4), dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4), potasyum klorür (KCl), etanol, hidroklorik asit (HCl %37'lik) ve sodyum hidroksit (NaOH) Merck'ten temin edilmiştir. Kullanılan tüm kimyasallar yüksek analitik saflıktadırlar.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Elektrokimyasal ölçümler, PalmSens potentiostat kullanımıyla gerçekleştirilmiştir. Standart tampon çözeltileriyle kalibre edilmiş Mettler Toledo pH-metre, 25°C'de istenilen pH'da tampon çözeltiler hazırlamak için kullanılmıştır. Katı kimyasalların tartımı için, Precia XR 2055M-DR 0,01 mg duyarlı elektronik terazi kullanılmıştır. Batch koşullarında amperometrik tayin sırasında çözeltiyi karıştırmak istenilen hızda karıştırmak için, Hanna manyetik karıştırıcı kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan ultra saf su Millipore Milli-Q Direct Q-3 ultra saf su cihazından elde edilmiştir.

3.1.2.1. Elektrokimyasal ölçüm sistemi

Deneylerde voltametri ve kronoamperometri gibi çeşitli elektrokimyasal yöntemlerin çalışılabildiği, özellikle biyosensör sistemlerinde kullanılmak üzere tasarlanan PalmSens (Şekil 3.1) elektrokimyasal ölçüm sistemi kullanılmıştır. Bilgisayar kontrollü olan bu PalmSens cihazının sinyalleri PSTrace 4.6 yazılımı ile değerlendirilmiştir. Bu sistem ile, deney verileri grafik şeklinde görüntülenebildiği gibi manyetik ortamda dosyalar olarak kaydedilen veriler istenildiği zaman tekrar görüntülenebilmektedir.

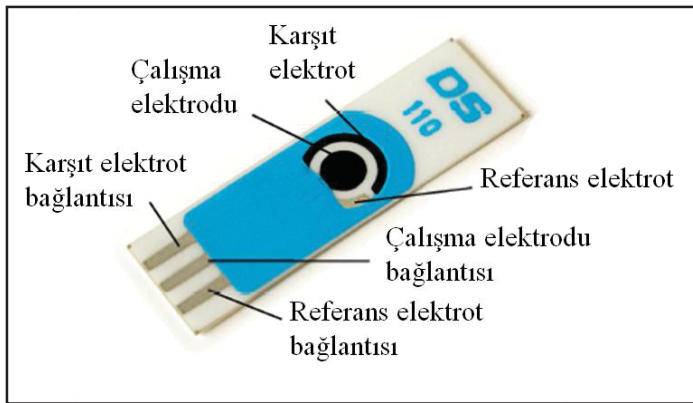


Şekil 3.1. PalmSens potansiyostat

http://daneshyark.com/en/index.php?option=com_content&view=article&id=62:palm-sensor-electrochemical-potentiostat-galvanostat-electrochemistry-test-laboratory&catid=41:palm-instruments

3.1.3. Kullanılan elektrotlar, hücreler ve konektörler

Bu çalışmada, Dropsens firmasından temin edilmiş tek kullanımlık yüzey baskılı elektrotlar kullanılmıştır (Şekil 3.2). Çalışılan yüzey baskılı karbon elektrot (YBCE)'un özellikleri şöyledir: C (4 mm), Yardımcı elektrot: C, Referans elektrot: Ag/AgCl (0,1 M KCl).

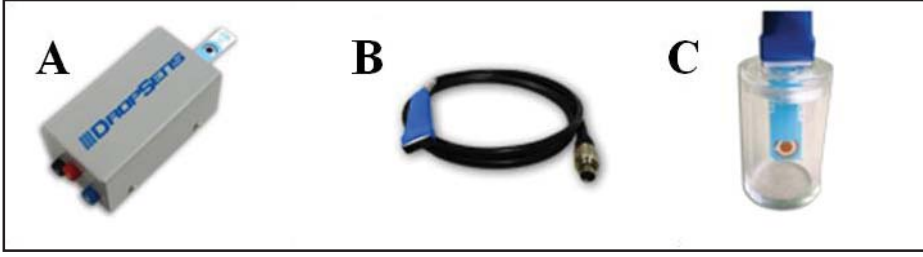


Şekil 3.2. Yüzey baskılı elektrotların genel yapısı

http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html

Elektrotların PalmSens potentiostat bağlantısı konektörler ile sağlanmıştır ve bu konektörler DropSens'ten temin edilmiştir. Sensör konektörleri, damlamalı analizler için ve batch analizleri için farklı olarak tasarlanmıştır. Batch analizlerinde kullanılan

elektrokimyasal hücre, metakrilattan yapılmış ve 5-8 mL gibi büyük hacimli çözeltilerin karıştırma şartları için oldukça elverişlidir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Yüzeysel elektrotlar için sensör konektör çeşitleri A) Damlamalı analizler için kutu biçiminde B) Batch analizleri için kablo şeklinde C) Batch analizi için elektrokimyasal hücre
(http://www.dropsens.com/en/accessories_pag.html#connectores)

3.2. Metot

3.2.1. Destek elektrolit tampon çözeltisinin hazırlanması

Deneylerde destek elektrolit olarak 0,1 M KCl içerisinde, KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 kullanılarak hazırlanan 50 mM fosfat tamponu kullanılmıştır. Bu destek elektrolit tampon çözeltilerini istenilen pH değerlerinde ayarlamak için üzerine, 1 M NaOH veya 1 M HCl ilave edilmiştir. Deneylerde kullanılan bütün çözeltiler fosfat tampon sistemi içerisinde hazırlanmıştır.

3.2.2. YBE üzerine RA'nın hazırlanması

50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde 1 mM rosmarinik asit çözeltisi hazırlanmıştır. Döngüsel voltametri tekniği uygulanarak rosmarinik asitin elektrot yüzeyine tutuklanması sağlanmıştır. Döngüsel voltametri, -0,1 V ile +0,8 V potansiyel aralığında $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ tarama hızında 5 döngü uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Tek kullanımlık YBE'ler ultra saf su ile yıkandıktan sonra yüksek saflıktaki N_2 gazı ile kurutulmuştur.

3.2.3. ADH temelli biyosensörlerin hazırlanması

3.2.3.1. Glutaraldehit (GA) ile tutuklama

Uygun aktivitedeki enzim üzerine, $10 \mu\text{L}$ 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu mikro pipetle aktarılmıştır. Daha sonra bu enzim çözeltisinin $5 \mu\text{L}$ 'si tek kullanımlık YBE'lerin ÇE'si üzerine damlatılmış ve hazırlanan bu biyosensörler 1 saat $+4^\circ\text{C}$ 'de sabit nem ortamında bekletilmiştir. Bu süre sonunda hazırlanan bu biyosensörlerin ÇE üzerine %1'lik GA çözeltisinden $1 \mu\text{L}$ damlatılmıştır. Biyosensörler $+4^\circ\text{C}$ 'de sabit nem ortamında 30 dakika stabilizasyon işleminin tamamlanması için bekletilmiştir.

3.2.4. Elektrokimyasal ölçümler

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

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

3.2.5. ADH temelli biyosensörlerin ölçüm prensibi

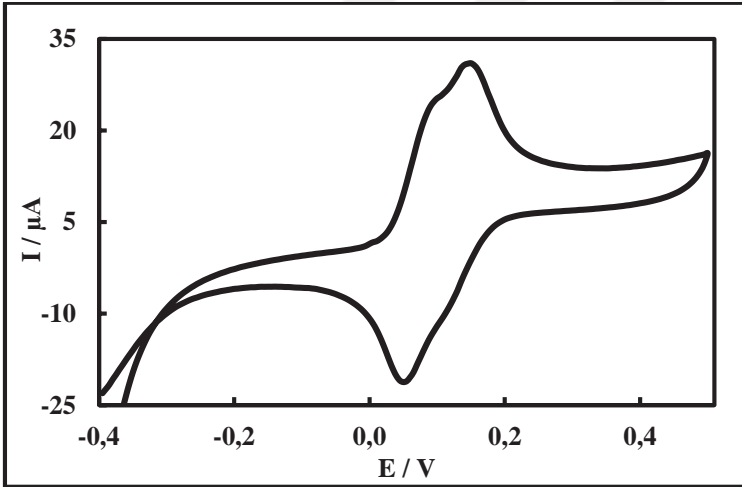
Etanol tayinine yönelik olarak geliştirilmek istenilen ADH temelli biyosensörün ölçüm prensibi, medyatör varlığında NADH'nin yükseltgenmesinin takibine dayanmaktadır. Etanol konsantrasyonunun artmasıyla NADH miktarıda artacaktır.

Amperometrik ölçümler; 7 mL 50 mM pH 7,75 fosfat tamponu ve 1 mL 7 mM NAD⁺ çözeltisi elektrokimyasal hücreye ilave edilmiştir. Akımın kararlı hale gelmesi beklendikten sonra, belirli konsantrasyondaki etanol ardışık olarak hücreye eklenmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. YBCE üzerinde RA'nın elektrokimyasal davranışı

RA'nın 10 mV.s^{-1} tarama hızındaki elektroyükseltgenmesi; $+0,085 \text{ V}$ birinci anodik pik potansiyeli (E_{pa1}) ve $+0,150 \text{ V}$ ikinci anodik pik potansiyeli (E_{pa2}) olmak üzere iki basamakta gerçekleşmektedir. Elektroindirgenme pikleri ise $+0,050 \text{ V}$ ve $+0,120 \text{ V}$ katodik pik potansiyellerinde gözlemlenmiştir (Şekil 4.1). RA yapısında (Şekil 1.7) iki elektroaktif katekol ucuna sahip olduğu için RA'nın ilk yükseltgenme basamağı, onun kafeik asit (KA) ucu ile ilişkiliyken, ikinci yükseltgenme basamağı ise 3,4-dihidroksifenil laktik asit (DHPLA) ucu ile ilişkilidir (Gil vd 2013). Literatürde, RA'nın camısı karbon elektrot üzerindeki ilk redoks pikinin $+0,17 \text{ V}$ ve $+0,14 \text{ V}$ 'da, ikinci redoks pikinin ise $+0,22 \text{ V}$ ve $+0,19 \text{ V}$ 'da gözlemlendiği bildirilmiştir (Gil vd 2013). Çalışmamızda, tek kullanımlık YBCE'lerin elektrokimyasal ön işlem ile aktive edilmesi, RA'nın redoks pik potansiyellerinin değerini düşürmüştür. Bu sonuç, NADH'nin elektrokimyasal analizinde RA'nın medyatör olarak kullanılması için bir avantajdır. Yine literatürde, camısı karbon elektrot üzerinde kafeik asitin anodik ve katodik pik potansiyelleri $+0,21 \text{ V}$ ve $+0,16 \text{ V}$ 'da gözlenmiştir. (Gonçalves vd 2011). RA'nın DHPLA ucunun redoks çifti, KA ucunun redoks çiftinden daha yüksek bir potansiyelde pik vermektedir (Gil vd 2013). Benzer sonuçlar bizim çalışmamızda da gözlenmiştir.



Şekil 4.1. 1 mM RA'nın 10 mV.s^{-1} tarama hızında ve $-0,4 \text{ V}$ ile $+0,5 \text{ V}$ arasındaki döngüsel voltamogramı (50 mM pH 7,0 PBS, 0,1 M KCl)

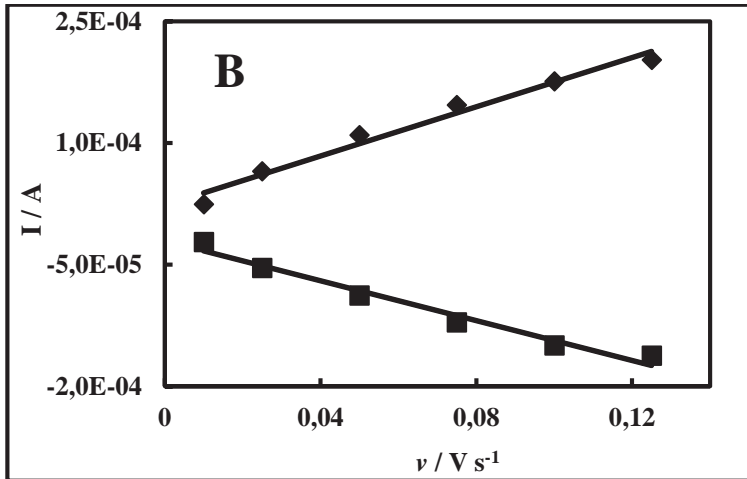
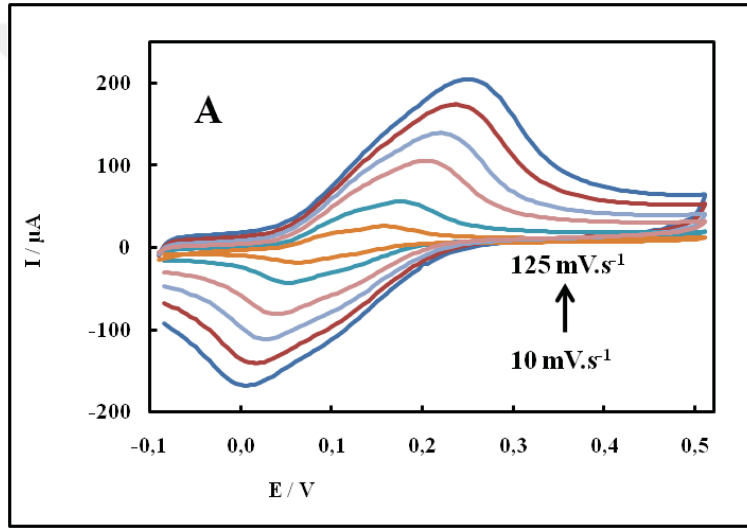
RA'nın redoks piklerindeki farklılığın nedeni şu şekilde açıklanabilir: KA'nın katekol ucundaki karboksil ve ester gruplarının indüktif etkisi, elektron çekici etki yaparken, DHPLA'nın katekol ucundaki karboksil grubu bunun tersi bir etki yaratmaktadır. Çünkü, DHPLA'nın zincir yapısı katekol ucuna uzaktır. Bu nedenle elektrostatik etki zayıftır. KA'da karboksil fonksiyonunun deaktive edici etkisi, çift bağ ile korunur. Ancak, KA'nın fenolik grubundaki elektron yoğunluğunu, karboksil grubu azaltır. Çünkü, elektron transferi daha zorlaşır (Gil vd 2013). Sonuç olarak, katekol ucunun elektron yoğunluğunu, delokalizasyon ile azaltan grupların varlığında, hem pik

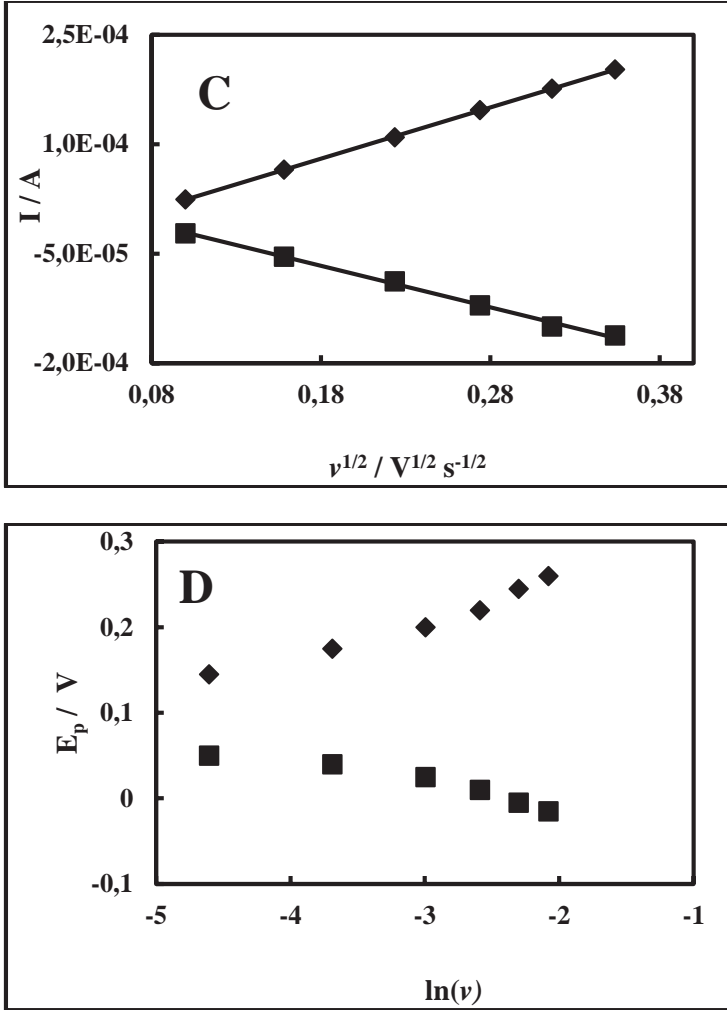
potansiyelleri hem de pik akımları azalmaktadır. Delokalize olmayan gruplar katekol ucuna eklendiğinde ise hem pik akımı hem de pik potansiyelleri artmaktadır.

10 mV.s^{-1} tarama hızındaki anodik ve katodik pik potansiyelleri arasındaki fark, $|E_{pa1} - E_{pc1}|$ ve $|E_{pa2} - E_{pc2}|$, sırasıyla, 30 mV ve 35 mV olarak hesaplanmıştır. Bu değerler, iki elektronlu iki protonlu RA'nın yükseltgenme mekanizması ile uyumludur (Salas-Reyes vd 2011, Enache ve Oliveira-Brett 2011, Hapiot vd 1996, Giacomelli vd 2002, Brett ve Oliveira-Brett 1993) (30 mV teorik değer). RA'nın yükseltgenme reaksiyonu aşağıdaki eşitlikle verilebilir:



10 mV.s^{-1} tarama hızındaki RA'nın birinci ve ikinci redoks çiftleri için formal potansiyel değerleri $[E^{o'} = (E_{pa} + E_{pc})/2]$ sırasıyla, $+0,0675 \text{ V}$ ve $+0,135 \text{ V}$ 'dur.





Şekil 4.2. A) YBCE/RA elektrodunun -0,1 V and +0,5 V potansiyel aralığında farklı tarama hızlarında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 10, 25, 50, 75, 100, 125 $mV.s^{-1}$, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızı grafiği C) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızının karekökü grafiği D) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik potansiyeli-tarama hızının doğal logaritması grafiği

Şekil 4.2A'da YBCE üzerinde 1 mM RA'nın farklı tarama hızlarındaki (10, 25, 50, 75, 100, 125 $mV.s^{-1}$) döngüsel voltamogramları verilmiştir. Tarama hızı arttıkça anodik ve katodik pik akımlarının doğrusal bir şekilde arttığı Şekil 4.2B'den anlaşılmaktadır. Tarama hızının artmasıyla anodik ve katodik pik potansiyelleri sırasıyla, daha pozitif ve negatif değerlere kaymıştır. Bu durum, RA'nın elektroyükseltgenme reaksiyonunun tersinmez bir elektrot süreci sergilediğini göstermektedir.

Şekil 4.2B'de anodik ve katodik pik akımlarının tarama hızına karşı, Şekil 4.2C'de de tarama hızının kareköküne karşı grafikleri verilmiştir. Hem anodik hem de katodik pik akımlarının, çalışma şartlarımızdaki tarama hızı ve tarama hızının

kareköküyle doğrusal olduğu bu grafiklerden görülmektedir. Yapılan regresyon analizlerinin sonucunda bu grafiklerin korelasyon katsayıları sırasıyla, 0,9884, 0,9864, 0,9999 ve 0,9982 olarak bulunmuştur. Bu değerler incelendiğinde, Şekil 4.2.C’de verilen grafiğin korelasyon katsayısının daha iyi olduğu açıkça görülmektedir. Buda, YBCE’ler üzerinde RA’nın elektro-yükseltgenmesinin difüzyon kontrollü bir proste gerçekleştiğini göstermektedir. Şekil 4.2D’de Şekil 4.2A’daki verilerinden yararlanarak tarama hızının doğal logaritması ($\ln v$) ve pik potansiyeli arasındaki ilişki verilmiştir. YBCE’lerin yüzeyi ve çözelti arasında meydana gelen RA’nın elektroyükseltgenmesi için elektron-transfer katsayısı (α) aşağıdaki eşitlikten bulunabilir (Harison ve Khan 1970):

$$E_p = \left(\frac{RT}{2\alpha F} \right) \ln v + \text{sabit} \quad (4.1)$$

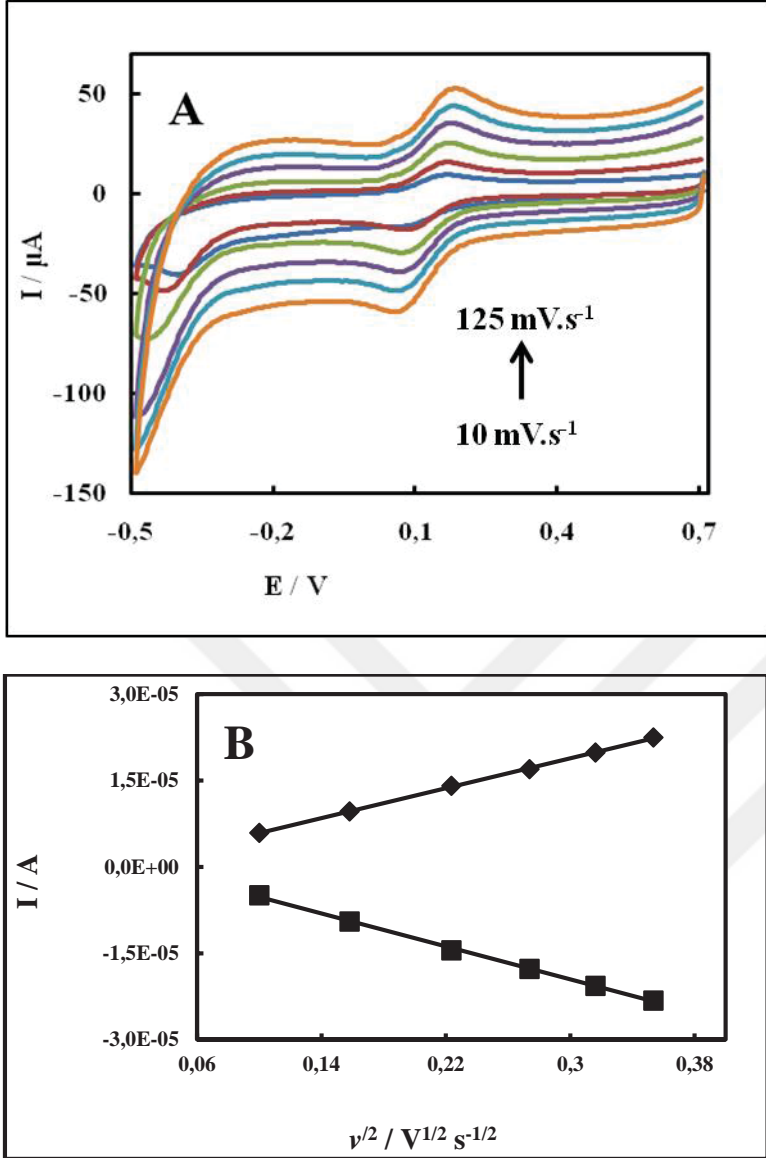
Burada E_p pik potansiyelini, v tarama hızını, T sıcaklığı (293 K), R gaz sabitini (8,314 J.K⁻¹.mol⁻¹) ve F ise Faraday sabitini (96485 C.mol⁻¹) ifade eder. Bu eşitlik, tersinmez olan difüzyon kontrollü proses için geçerlidir. Bu eşitlik’ten α değeri 0,2833 olarak hesaplanmıştır.

1 mM RA’nın YBCE’ler üzerine difüzyon katsayısını hesaplamak için, difüzyon kontrollü elektrokimyasal proses için uygun bir eşitlik olan Randles-Sevcik eşitliğinden yararlanılmıştır:

$$i_p = 2,96 \times 10^5 n^{3/2} A_{ea} D^{1/2} C v^{1/2} \quad (1.10)$$

Burada i_p yükseltgenme pik akımı, A_{ea} elektroaktif alan (cm²), D elektroaktif türlerin difüzyon katsayısı (cm².s⁻¹), n transfer edilen elektronların sayısı, v potansiyel tarama hızı (V.s⁻¹) ve C çözeltideki redoks türlerinin konsantrasyonu (mol.cm⁻³)’dur (Brett-Oliveira-Brett 1993).

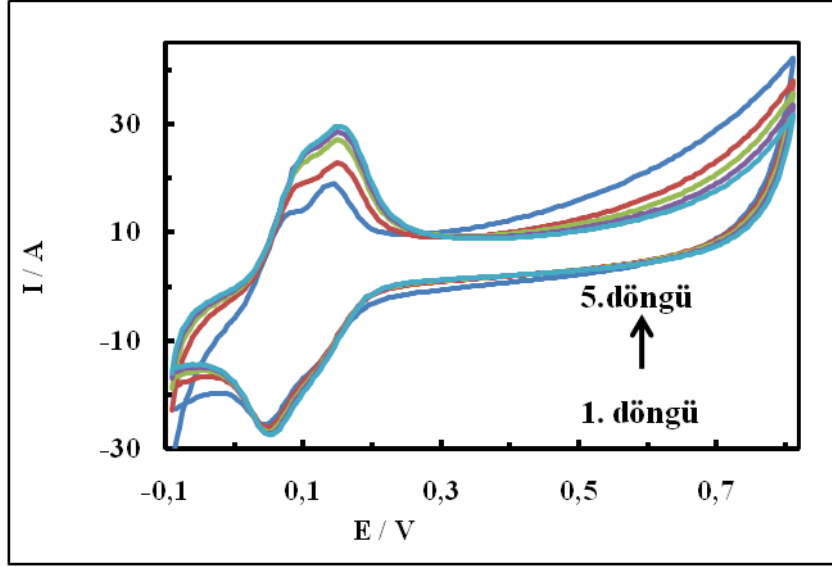
Eşitlik 1.10’u kullanabilmek için YBCE’lerin elektroaktif yüzey alanının değeri gerekmektedir. Bu nedenle ilk olarak aktive edilmiş YBCE’ye 10-125 mV.s⁻¹ tarama hızı aralığında, 0,1 M KCl destek elektrolit çözeltisinde, 1 mM potasyum ferrisiyanür varlığında -0,5 V ile +0,7 V arasında dönüşümlü voltametri uygulanmıştır. Elde edilen voltamogramlar Şekil 4.3A verilmiştir. Bu voltamogramların gösterdiği anodik ve katodik pik akımlarının tarama hızının kareköküne karşı grafikleri de Şekil 4.3B de verilmiştir. Buradan hem anodik hem de katodik pik akımlarının 10-125 mV.s⁻¹ tarama hızı aralığında tarama hızının kareköküyle mükemmel bir doğrusallık gösterdiği anlaşılmaktadır. Fe(CN)₆³⁻ çözeltisinin difüzyon katsayısı (7,63x10⁻⁶)’dur (Bark ve Faulkner 2001). Şekil 4.3B’deki grafiğin doğru denkleminde ve eşitlik 1.10’dan yararlanılarak YBCE’nin elektroaktif yüzey alanı 0,079 cm² olarak hesaplanmıştır. Bu değer eşitlik 1.10’de yerine yazılarak, 1 mM RA’nın 0,079 cm² yüzey alanına sahip YBCE’deki difüzyon katsayısı hesaplanmış ve 1,132x10⁻⁴ s⁻¹ olarak bulunmuştur.



Şekil 4.3. A) YBCE/RA elektrodunun 1 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ içerisinde farklı tarama hızlarında (10, 25, 50, 75, 100, 125 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) -0,5 V ile +0,7 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızının karekökü grafiği

4.2. RA modifiyeli YBCE'nin elektrokimyasal karakterizasyonu

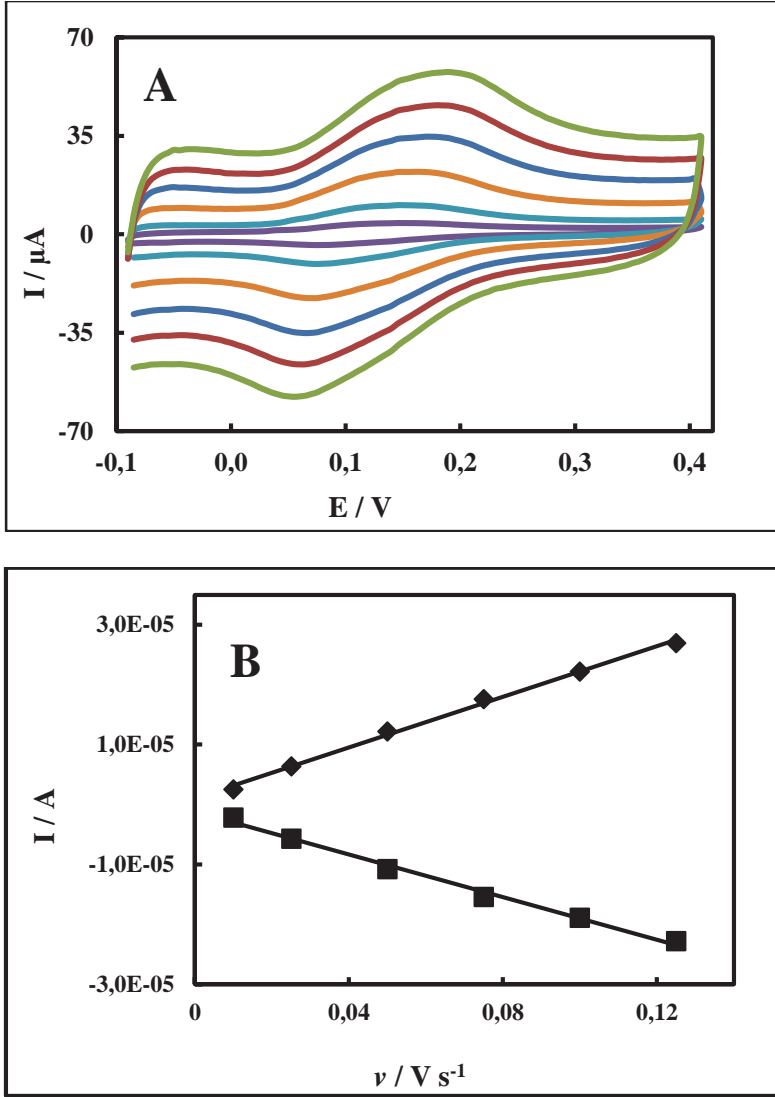
YBCE'nin RA ile modifikasyonu için, 0,1 M KCl içeren 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içinde hazırlanmış 1 mM RA çözeltisi YBCE üzerine damlatılmış ve 20 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ tarama hızında -0,1 V - +0,8 V potansiyel aralığında 5 döngü dönüşümlü voltametri uygulanmıştır. Voltamogramlar Şekil 4.4'de verilmiştir. Anodik ve katodik pik akımlarının ilk döngüdekine göre artışının hızı, döngü sayısı arttıkça azalmıştır. Bu sonuçların DHPLA (Pariante vd 1996), kafeik asit (Zare ve Golabi 2000, Lee ve Compton 2013, Zanardi vd 2015) ve klorojenik asit (Zare ve Golabi 1999) ile modifiyeli elektrotlarla elde edilen sonuçlarla benzer olduğu görülmüştür.



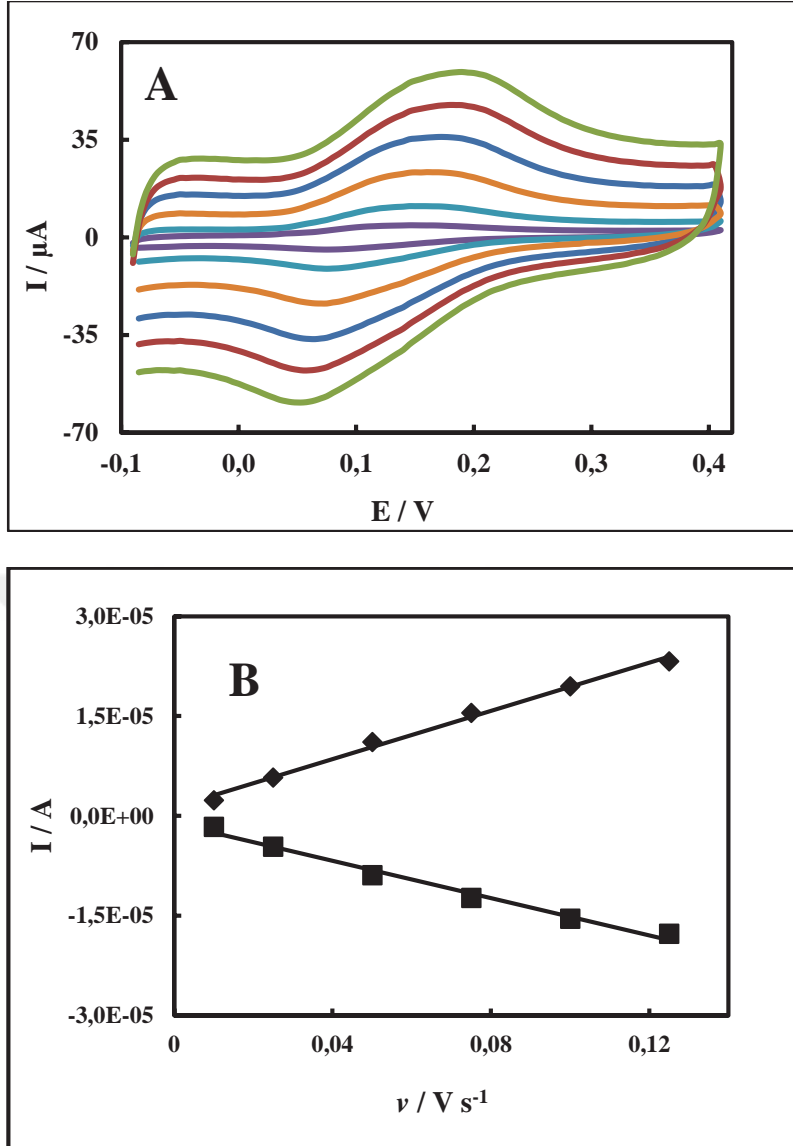
Şekil 4.4. YBCE elektrodunda 5 döngü RA'nın -0,1 V ile +0,8 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (pH 7,0 50 mM fosfat tamponu, 0,1 M KCl, 1 mM RA çözeltisi, 20 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ tarama hızı)

Katekol ucu içeren bileşiklerin karbon yüzeylerine tutunması, yükseltgenme sonucu oluşan kinonların nükleofilik saldırısını temel alır. Anodik potansiyelde oluşan kinonlar, aktive edilmiş karbon yüzeyinde yer alan aktif fonksiyonel gruplar (karboksil, hidroksil grubu gibi) ile Michael akseptörü olarak reaksiyona girerler. Aktive edilmiş karbon elektrodu, kinon halkasının 4 veya 5 pozisyonuna nükleofil olarak saldırır. RA durumunda, o-kinon halkasının sadece 5. pozisyonu nükleofilik saldırı için uygundur (Golabi ve Nematollahi 1997, Nematollahi ve Golabi 1996, Golabi ve Nematollahi 1997, Golabi ve Nematollahi 1997). Aktive edilmiş YBCE yüzeyindeki karboksil ve hidroksil grupları ile RA'nın elektroyükseltgenmesi için uygun bir yüzey sağlar. Bu gruplar, RA'nın yükseltgenmesi ile oluşan o-kinon'a karşı nükleofil olarak hareket eder. Karbon yüzeyindeki aktif gruplar ile RA arasında bağ oluşumu gerçekleşir ve RA elektrot yüzeyine depolanır.

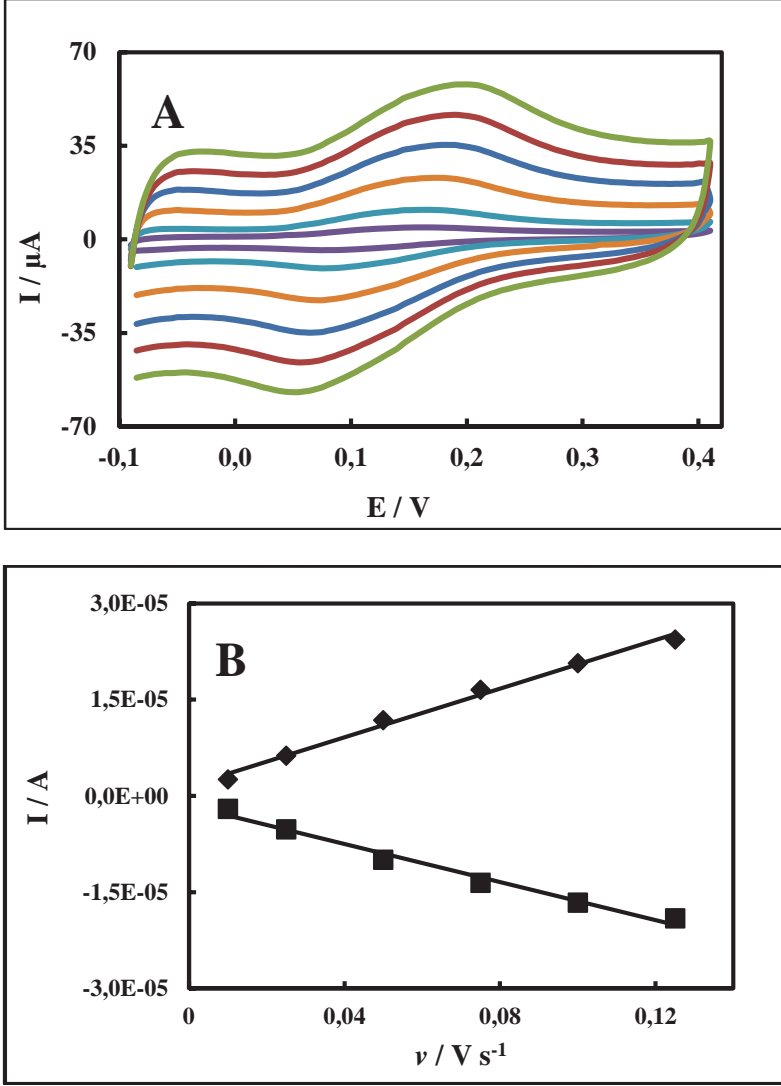
YBCE üzerinde RA'nın depolanmasında döngü sayısının etkisini incelemek için, YBCE'ler farklı döngü sayılarında (5, 10 ve 15 döngü) RA ile modifiye edilmiştir. Farklı döngü sayılarında RA ile modifiye edilmiş YBCE/RA elektrotlarına, 0,1 M KCl içeren 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda, farklı tarama hızlarında (10 mVs^{-1} ile 125 mVs^{-1} aralığında) -0,1 V ile +0,5 V potansiyel aralığında dönüşümlü voltametri uygulanmıştır. 5, 10 ve 15 döngü uygulanarak RA ile modifiye edilmiş YBCE'lerden elde edilen döngüsel voltamogramlar sırasıyla Şekil 4.5A, 4.6A ve 4.7A'da verilmiştir. Şekil 4.5B, 4.6B ve 4.7B'de ise, Şekil 4.5A, 4.6A ve 4.7A'daki verilerden yararlanılarak anodik ve katodik pik akımlarının tarama hızına karşı çizilmiş grafikleri verilmiştir. Anodik ve katodik pik akımlarının her ikisinde tarama hızıyla doğrusal olması, elektrokimyasal kinetiğin yüzey-kontrollü bir proses olduğunun ve RA'nın YBCE'lerin yüzeyine tutulduğunun (biriktirilmiş olduğunun) göstergesidir.



Şekil 4.5. A) 5 döngü uygulanarak RA ile modifiye edilmiş YBCE'nin -0,1 V ile +0,8 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (pH 7,0 50 mM fosfat tamponu, 0,1 M KCl, 1 mM RA çözeltisi, 10-125 $mV.s^{-1}$ tarama hızı aralığında) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızı grafiği



Şekil 4.6. A) 10 döngü uygulanarak RA ile modifiye edilmiş YBCE'nin -0,1 V ile +0,8 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (pH 7,0 50 mM fosfat tamponu, 0,1 M KCl, 1 mM RA çözeltisi, 10-125 $mV.s^{-1}$ tarama hızı aralığında) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızı grafiği



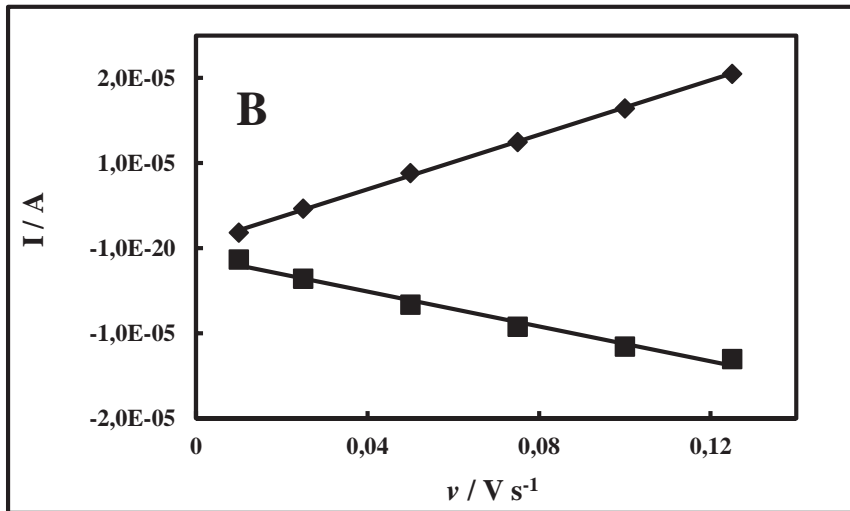
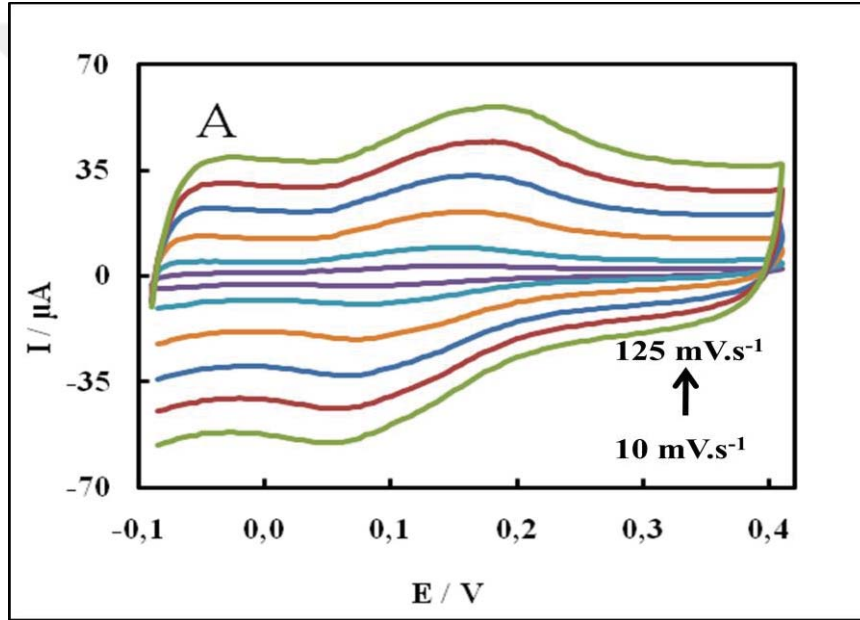
Şekil 4.7. A) 15 döngü uygulanarak RA ile modifiye edilmiş YBCE'nin -0,1 V ile +0,8 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (pH 7,0 50 mM fosfat tamponu, 0,1 M KCl, 1 mM RA çözeltisi, 10-125 mV.s⁻¹ tarama hızı aralığında) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızı grafiği

Yüzey-kontrollü proses için YBCE'lerin yüzeyinde RA'daki elektroaktif türlerin ortalama yüzey konsantrasyonu, (Γ), Laviron eşitliği kullanılarak hesaplanabilmektedir (Bard ve Faulkner 2001):

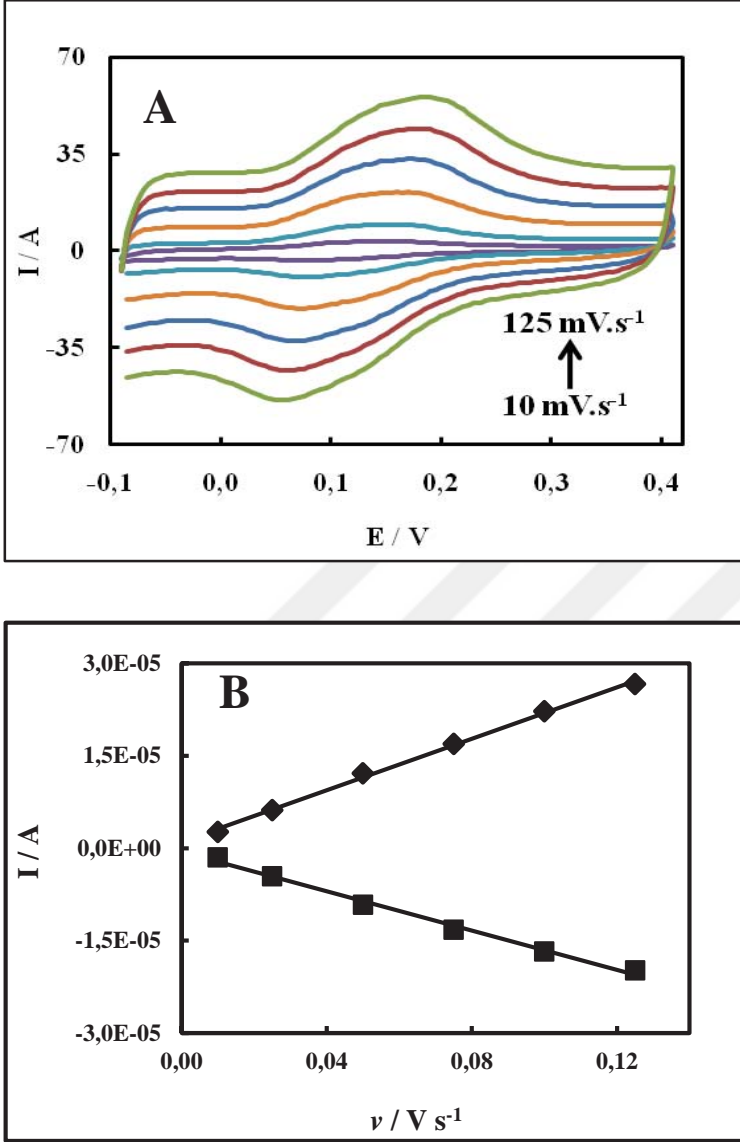
$$I_p = \frac{n^2 F^2 \nu A \Gamma}{4RT} \quad (4.2)$$

5, 10 ve 15 döngü sayılarında RA modifiyeli YBCE için Γ değerleri sırasıyla, $6,52 \times 10^{-10}$ mol.cm⁻², $5,58 \times 10^{-10}$ mol.cm⁻² ve $5,85 \times 10^{-10}$ mol.cm⁻² olarak hesaplanmıştır. Bu hesaplanmış Γ değerlerine göre optimum döngü sayısı, bu döngü sayıları içinde en yüksek yüzey konsantrasyonunu sağlamasından dolayı 5 döngü olarak belirlenmiştir.

RA'nın birikmesinde tarama hızının etkisini incelemek için sırasıyla 10, 20 ve 40 mV.s^{-1} tarama hızlarında YBCE'ler RA ile modifiye edilmiştir. RA modifiyeli elektrodun döngüsel voltamogramları 10-125 mV.s^{-1} arasında değişen tarama hızlarında kaydedilmiş ve elde edilen voltamogramlar 10, 20 ve 40 mV.s^{-1} tarama hızları için sırasıyla Şekil 4.8A, 4.5A ve 4.9A'da verilmiştir. Şekil 4.8B, 4.5B ve 4.9B'de ise, Şekil 4.8A, 4.5A ve 4.9A'deki verilerden yararlanılarak anodik ve katodik pik akımlarının tarama hızına karşı çizilmiş grafikleri verilmiştir. Anodik ve katodik pik akımı değerleri, 10-125 mV.s^{-1} aralığında potansiyel tarama hızı ile doğrusal olarak artmaktadır. Bu sonuçlar, elektrokimyasal kinetiğin yüzey-kontrollü bir proses olduğunu göstermektedir. 10, 20 ve 40 mV.s^{-1} tarama hızlarında 5 döngü RA ile modifiye edilmiş YBCE'ler için Γ değerleri, eşitlik 4.2'den yararlanılarak hesaplanmış ve sırasıyla, $4,94 \times 10^{-10}$, $6,52 \times 10^{-10}$ ve $6,45 \times 10^{-10}$ mol.cm^{-2} olarak bulunmuştur. En yüksek yüzey konsantrasyonu 20 mV.s^{-1} tarama hızında modifiye edilen YBCE/RA elektrodunda elde edildiği için, optimum tarama hızı 20 mV.s^{-1} olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.8. A) YBCE elektrodunda RA'nın 5 döngü elektrodepozisyonunda 10 mV.s^{-1} tarama hızında ve $-0,1 \text{ V}$ and $+0,4 \text{ V}$ potansiyel aralığında farklı tarama hızlarında elde edilen döngüsel voltamogram (Tarama hızı: 10, 25, 50, 75, 100, 125 mV.s^{-1} , 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızı



Şekil 4.9. A) YBCE elektrodunda RA'nın 5 döngü elektrodepozisyonunda 40 mV.s^{-1} tarama hızında ve $-0,1 \text{ V}$ and $+0,4 \text{ V}$ potansiyel aralığında farklı tarama hızlarında elde edilen döngüsel voltamogram (Tarama hızı: 10, 25, 50, 75, 100, 125 mV.s^{-1} , 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızı grafiği

RA birikmiş yüzey ve YBCE arasındaki görünür yüzey yük aktarım transfer hız sabiti, k_s , ve elektron transfer katsayısı, α , Laviron tarafından geliştirilen işlemi takiben

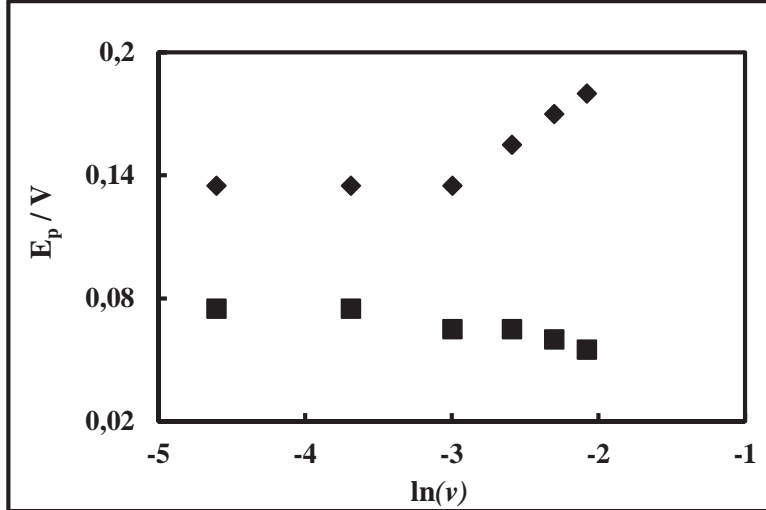
tarama hızı ile pik potansiyellerinin değişiminin ölçülmesinden hesaplanabilir (Laviron 1974, Laviron 1979). Laviron eşitlikleri, eşitlik 5, 6 ve 7'de verilmiştir:

$$E_{pc} = E^o + \left[\frac{RT}{\alpha nF} \right] \ln \left[\frac{RTk_s}{\alpha nF} \right] - \left[\frac{RT}{\alpha nF} \right] \ln v \quad (4.3)$$

$$E_{pa} = E^o + \left[\frac{RT}{(1-\alpha)nF} \right] \ln \left[\frac{RTk_s}{(1-\alpha)nF} \right] + \left[\frac{RT}{(1-\alpha)nF} \right] \ln v \quad (4.4)$$

$$\ln k_s = \alpha \ln(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \ln \alpha - \ln \left[\frac{RT}{nFv} \right] - \alpha(1 - \alpha) \left[\frac{nF\Delta E_p}{RT} \right] \quad (4.5)$$

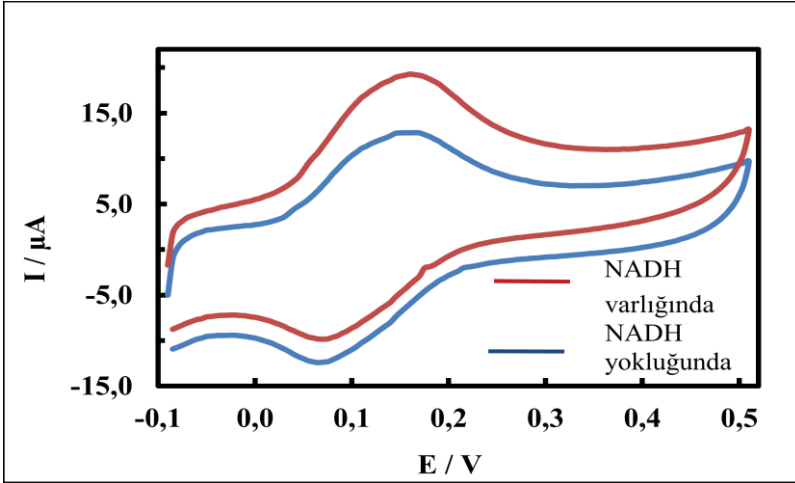
Şekil 4.5A'nın verilerinden elde edilen 5 döngü RA ile modifiyeli YBCE için E_p 'ye karşı $\ln v$ grafiği Şekil 4.10'da verilmiştir. Görüldüğü gibi, 50-125 $mV.s^{-1}$ tarama hızı aralığında, E_{pa} , $\ln v$ 'ye karşı doğrusal olarak değişmiştir. Doğrusal regresyon analizi doğru denklemini $E_{pa} = 0,0495 \ln v + 0,2833$ olarak ve regresyon katsayısını da 0,9997 olarak vermiştir. Bu doğru için α değeri 0,745 olarak hesaplanmıştır. Bu α değeri ve eşitlik 4.5 kullanılarak hesaplanan k_s değeri ise 0,27 s^{-1} olarak bulunmuştur.



Şekil 4.10. Şekil 4.5A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik potansiyeli-tarama hızının doğal logaritması grafiği

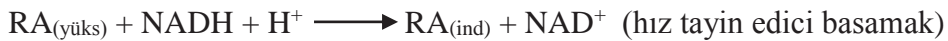
4.3. RA modifiyeli YBCE'de NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi

Çalışmamızın amaçlarından biri, NADH'nin elektroyükseltgenmesi'nde yeni bir doğal medyatör modifiyeli elektrodun geliştirilmesidir. RA'nın NADH'nin elektroyükseltgenmesindeki elektrokatalitik aktivitesini test etmek için, RA modifiyeli YBCE'ye, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu (0,1 M KCl) içerisinde 1 mM NADH'nin varlığında ve yokluğunda döngüsel voltametri uygulanmış ve elde edilen voltamogramlar Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11. YBCE/RA elektrodunun 50 mV s⁻¹ tarama hızında 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda (0,1 M KCl) 1 mM NADH varlığında ve yokluğundaki döngüsel voltamogramı

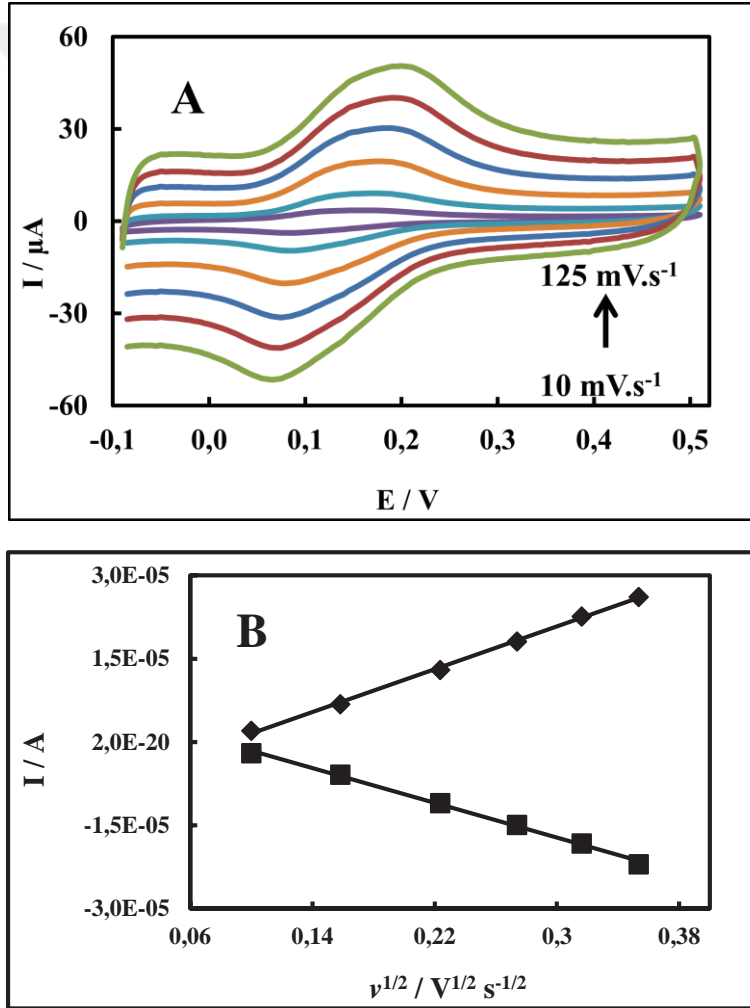
RA medyatörünün etkisiyle, NADH varlığında anodik pik akımı önemli oranda artarken (8,14 µA'den 11,67 µA'e), katodik pik akımı azalması (5,93 µA'den 5,65 µA'e) NADH'nin elektrokimyasal davranışı için karakteristik bir özelliktir (Pariante vd 1996). NADH varlığında I_{pa} / I_{pc} oranı 2,06 iken NADH yokluğunda bu oran 1,30'a düşmektedir. Bu sonuçlar NADH'nin, RA'daki o-kinon halkaları tarafından yükseltgenildiğini belirtmektedir. NADH'nin anodik ve katodik pik potansiyelleri sırasıyla 150 mV ve 65 mV'dur. Bu anodik potansiyel, yalın veya RA'sız farklı formülasyona sahip elektrotlarla karşılaştırıldığında daha düşüktür. Gao ve arkadaşlarının 2003 ve 2004 yılında yaptığı çalışmanın sonuçlarına bakıldığı zaman yalın YBCE için bu potansiyelin sırasıyla 600 mV ve 700 mV olduğu belirtilmiştir (Gao vd 2003, Gao vd 2004). Politiyonin ile modifiyeli elektrotta bu potansiyelin 300 mV olduğu (Gao vd 2003) ve poliazureA ile modifiyeli elektrotta ise bu potansiyelin 200 mV (Gao vd 2004) olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda YBCE/RA modifiyeli elektrotta RA'nın elektrokatalitik aktivitesinden dolayı daha düşük anodik pik potansiyeli elde edildiği açıkça görülmektedir. NADH'nin yükseltgenmesindeki daha düşük anodik pik potansiyeli, NADH'nin elektroyükseltgenmesi için RA'nın elektrokatalitik etki sergilediğini belirtmektedir. NADH varlığında yükseltgenme pik akımının artması, NADH'nin çözüldüğü elektrot yüzeyine doğru difüzlenerak yükseltgenildiğini ve buna karşın yüzeydeki RA'nın indirgenildiğini gösterir. Bu elektrokimyasal işlem zinciri şöyle formülize edilebilir:

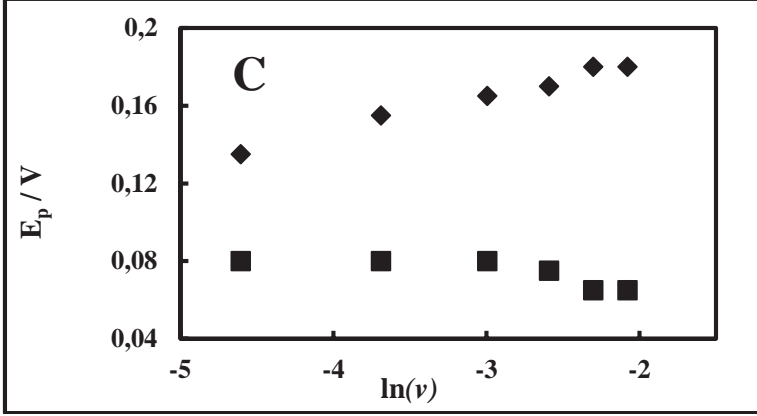


Modifiye edilmiş elektrot tarafından NADH'nin tüm yükseltgenmesi;



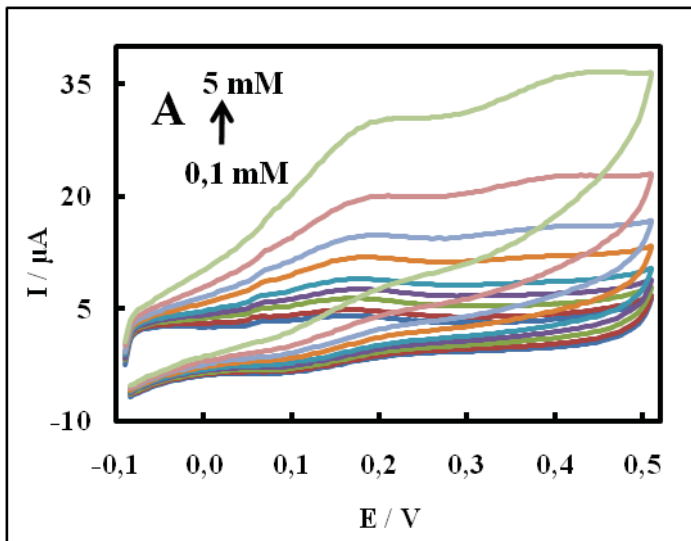
Şekil 4.12A'da, 1 mM NADH içeren 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu (0,1 M KCl'de)'nda çeşitli tarama hızlarındaki (10-125 mV.s⁻¹) YBCE/RA modifiyeli elektrodun döngüsel voltamogramları verilmiştir. Görüldüğü gibi, tarama hızı arttıkça, NADH'nin yükseltgenme pik potansiyeli biraz daha pozitif potansiyellere kaymaktadır. NADH varlığında YBCE/RA elektrodunun anodik pik akımına karşı tarama hızının karekökü grafiğinin doğrusal olduğu Şekil 4.12B'den anlaşılmaktadır. Buna göre NADH'nin RA modifiyeli YBCE üzerindeki elektroyükseltgenmesi, difüzyon kontrollüdür. Şekil 4.12B'deki doğrunun eğimi ve eşitlik 3'e göre, 1 mM NADH için difüzyon katsayısı $2,13 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.12A'nın verilerinden elde edilen pik potansiyelleri $\ln v$ 'nin bir fonksiyonu olarak Şekil 4.12C'de verilmiştir. Anodik pik potansiyelleri tüm tarama hızı aralığında $\ln v$ 'ye karşı doğrusal olarak değişmektedir. Bu değişim için doğrusal regresyon denklemi $E_{pa} = 0,01787 \ln v + 0,2185$, $r = 0,9928$ şeklindedir. Şekil 4.12C'deki doğrunun eğimi ve eşitlik 1.10 kullanılarak, 1 mM NADH için α değeri hesaplanmış ve bu değer 0,706 olarak bulunmuştur.

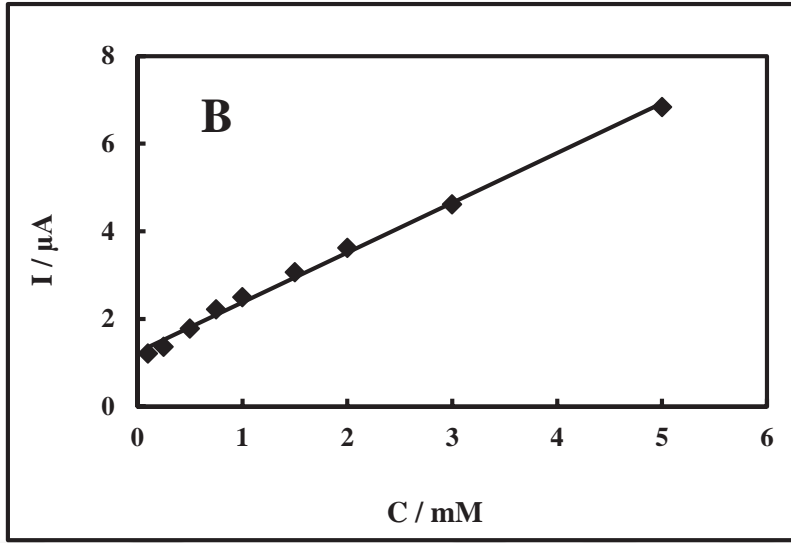




Şekil 4.12. A) YBCE/RA elektrodunun 1 mM NADH içeren 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu (0,1 M KCl'de)'ndaki farklı tarama hızlarındaki (10-125 mV.s⁻¹) döngüsel voltamogramları B) A'daki verilerden yararlanılarak elde edilen akım-tarama hızının karekökü grafiği C) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik potansiyeli-tarama hızının doğal logaritması grafiği

YBCE/RA elektrodun NADH'ye karşı olan voltametrik cevabında NADH konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir. Bunun için 50 mM pH 7,0 (0,1 M KCl) tamponunda hazırlanmış NADH'nin farklı konsantrasyonları için döngüsel voltametri uygulanmış ve sonuçlar Şekil 4.13A'da verilmiştir. Burada, NADH konsantrasyonu arttıkça anodik pik akımlarının da arttığı görülmektedir. Şekil 4.13A'daki yükseltgenme pik akımlarının NADH konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak 0,1-5 mM aralığında NADH konsantrasyonuyla doğrusal bir değişim sergilediği Şekil 4.13B'den anlaşılmaktadır. NAD⁺ üretimiyle elektrokatalitik prosesin engellenebilmesinden kaynaklanan kinetik sınırlamalardan dolayı, NADH'nin 5 mM'dan daha yüksek konsantrasyonlarında bu doğrusallıktan sapmalar görülmüştür. Benzer gözlemler literatürde de verilmiştir (Zare ve Golabi 2000, Lee ve Compton 2013, Zare ve Golabi 1999).





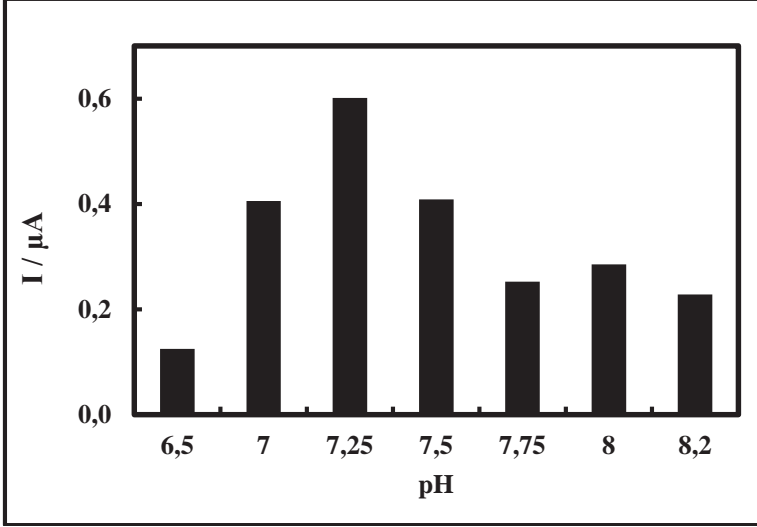
Şekil 4.13. A) YBCE/RA elektrodunun değişen NADH konsantrasyonlarında (0,1 mM - 5 mM) -0,1V and +0,5 V potansiyel aralığında ve 50 mV.s⁻¹ tarama hızındaki döngüsel voltamogramları (50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl) B: A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen akım-NADH konsantrasyonu grafiği

4.4. Amperometrik NADH Tayinine İlişkin Bulgular

Çalışmamızda hazırladığımız YBCE/RA elektrodunun NADH'nin yükseltgenmesine karşı gösterdiği yüksek elektrokatalitik etki ve yüksek duyarlık bu elektrodun NADH'nin amperometrik tayininde medyator olarak antioksidan modifiyeli sensör kullanılması açısından bir yeniliktir. Bu bölümde, YBCE/RA elektrodunun NADH'nin amperometrik tayininde sensör olarak kullanımı ile ilgili yapmış olduğumuz çalışmalardan bahsedilecektir.

4.4.1. pH optimizasyonu

NADH'nin ani bozulmasından dolayı yüksek alkali ve asitli çözeltilerde kararsız olduğu bilinmektedir (Lowry ve Passonneau 1971). NADH'nin elektroyükseltgenmesinde YBCE/RA elektrodun sensör özelliklerini araştırmak için, +0,25 V'da NADH'nin amperometrik tayini gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, NADH'nin sensör özelliklerinde pH etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 1 mM NADH varlığında farklı pH'lardaki (6,5-8,2) 50 mM fosfat tamponları kullanılarak +0,25 V potansiyelde akımlar ölçülmüştür. Ölçülen akım değerlerine karşılık pH değerlerinin grafiği Şekil 4.14'de verilmiştir.

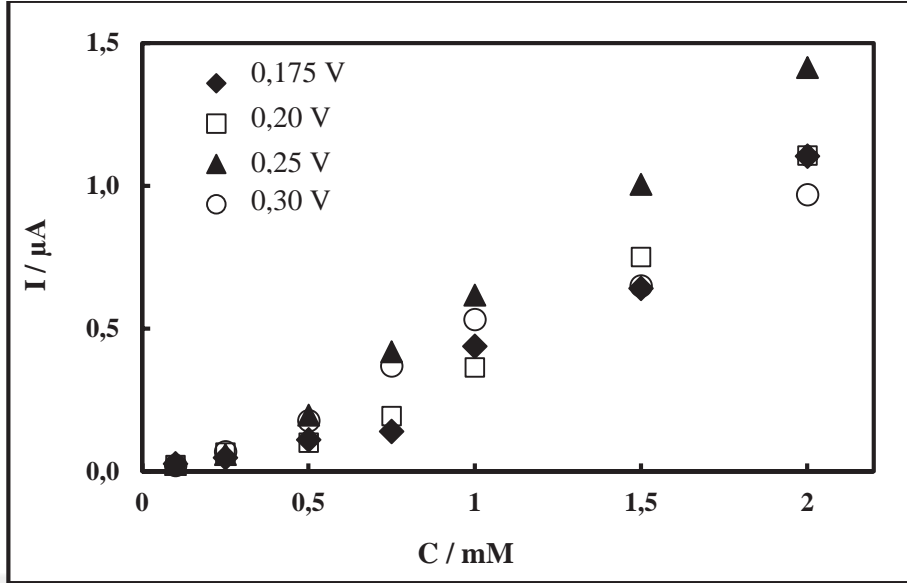


Şekil 4.14. Farklı pH'lardaki 1 mM NADH çözeltisinin, YBCE/RA elektrodu kullanılarak elde edilen akım-pH grafiği

Elde edilen eğrilerden, yüksek duyarlıkla NADH sensörü kullanılarak NADH'nin tayini için optimum pH 7,25 olarak belirlenmiştir. Çalışmanın bundan sonraki kısmında 50 mM pH 7,25 fosfat tamponu kullanılmıştır.

4.4.2. Çalışma potansiyelinin optimizasyonu

NADH'nin analitiksel tayini için geliştirilen sensörün, tayini daha düşük potansiyelde gerçekleştirmesi beklenir. Zira, yüksek potansiyelde, NADH'nin yükseltgenme ürünleri elektrot yüzeyinde adsorplanır ve elektrot yüzeyinin kirlenmesine yol açabilir. Çalışmanın bu kısmında, YBCE/RA sensörlerinin NADH'nin tayini için farklı potansiyelerde gösterdiği amperometrik yanıtlar incelenmiştir. YBCE/RA sensörleri ile NADH'nin amperometrik tayini pH 7,25'de, 0,15 V, 0,20 V, 0,25 V ve 0,30 V potansiyellerinde yapılmıştır. Elde edilen amperogramlardan yararlanılarak akım-konsantrasyon grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.15). Bu grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.15. YBCE/RA sensörünün farklı potansiyellerde NADH'nin derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,25 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)

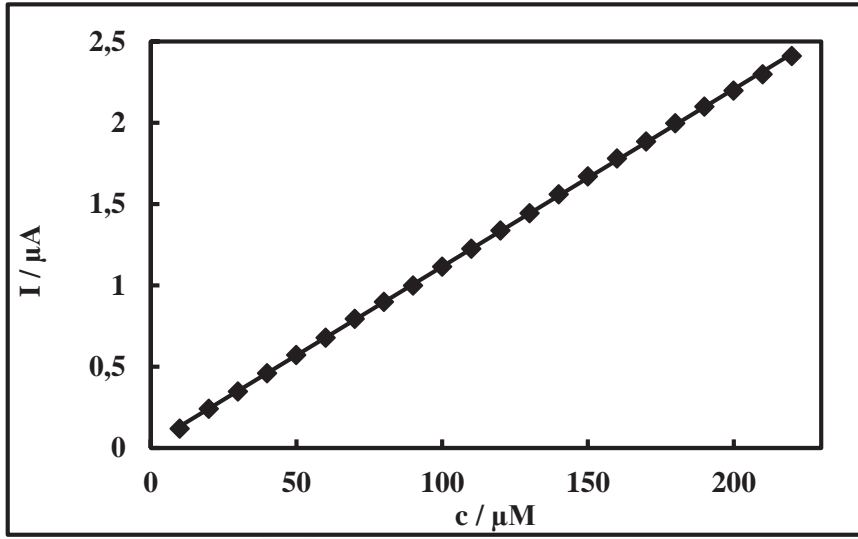
Çizelge 4.1 Şekil 4.15'de verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayıları değerleri

Çalışma potansiyeli / V	Duyarlık / ($\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$)	Korelasyon katsayısı (R^2)
0,175	0,566	0,9442
0,200	0,585	0,9596
0,250	0,755	0,9938
0,300	0,497	0,9839

En yüksek duyarlık ve korelasyon katsayısı +0,25 V potansiyel değerinden elde edildiği için, optimum çalışma potansiyeli +0,25 V olarak belirlenmiştir.

4.4.3. Analitiksel karakterizasyon

YBCE/RA elektrodu ile NADH'nin amperometrik tayini, içerisinde 8 ml 50 mM pH 7,25 fosfat tamponu bulunan elektrokimyasal hücrede, çözeltinin sabit hızda sürekli karıştırıldığı şartlarda +0,25 V'da gerçekleştirilmiştir. Akım kararlı hale geldikten sonra, 10 μM NADH elektrokimyasal hücreye ardışık olarak katılmıştır. Kararlı hal akım cevabı ölçülmüş ve zamana karşı akım değerleri potansiyostat tarafından kaydedilmiştir. Her NADH eklenmesinden sonra ölçülen sabit akıma karşılık konsantrasyon eğrisi Şekil 4.16'de verilmiştir. NADH'nin amperometrik tayini için kullanılan YBCE/RA sensörünün analitiksel karakterizasyonu için duyarlık, bağıl standart sapma, tayin ve gözlemlenebilirlik sınırı ve tekrarlanabilirlik gibi parametreler belirlenmiş ve Çizelge 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.16.YBCE/RA sensörü ile NADH'nin amperometrik tayini için kronoamperogramlardan yararlanılarak elde edilen grafik (+0,25 V potansiyel, pH 7,25 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)

Çizelge 4.2.YBCE/RA sensörü ile NADH'nin amperometrik tayini için elde edilen analitiksel parametreler YBCE/RA sensörü ile NADH'nin amperometrik tayini için elde edilen analitiksel parametreler

Duyarlık	10,94 $\mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1}$
Tekrarlanabilirlik	RSD % 1,65 (n=10) (1 mM NADH)
Doğrusal aralık	18,72 μM – 220 μM
Tespit limiti	5,62 μM
Tayin limiti	18,72 μM

YBCE/RA sensörünün uygulama kararlılığı, 1 mM NADH çözeltisinin +0,25 V potansiyelde 30 gün boyunca aralıklarla akımların ölçülmesi ile test edilmiştir. 30 gün boyunca NADH için sensör cevabının ilk günkü akıma göre bağlı akım değerleri Çizelge 4.3'de verilmiştir. Başlangıçta NADH için sensörün amperometrik cevabı 2. günün sonunda % 2,55, 10.günün sonunda % 28,53, 15. günün sonunda % 51,4 ve 30. günün sonunda ise %61,12 oranında azalmıştır. YBCE/RA sensörünün uygulama kararlılığı ilk kullanımdan sonra azalmış olsa da, 30. güne kadar NADH için amperometrik yanıt vermiştir. Bu sonuçlardan, tek kullanımlık olarak hazırlanan bir sensör için, bu uygulama kararlılığının iyi olduğu ve RA'nın doğal bir antioksidant olmasından dolayı, sensörün uygulama kararlılığını arttırdığı sonucuna varılabilir.

Çizelge 4.3 YBCE/RA sensörünün uygulama kararlılığı verileri

Gün	1	2	3	4	5	8	10	15	22	30
%Bağlı akım	100	97,45	93,94	90,87	87,19	78,16	71,47	48,6	41,1	38,88

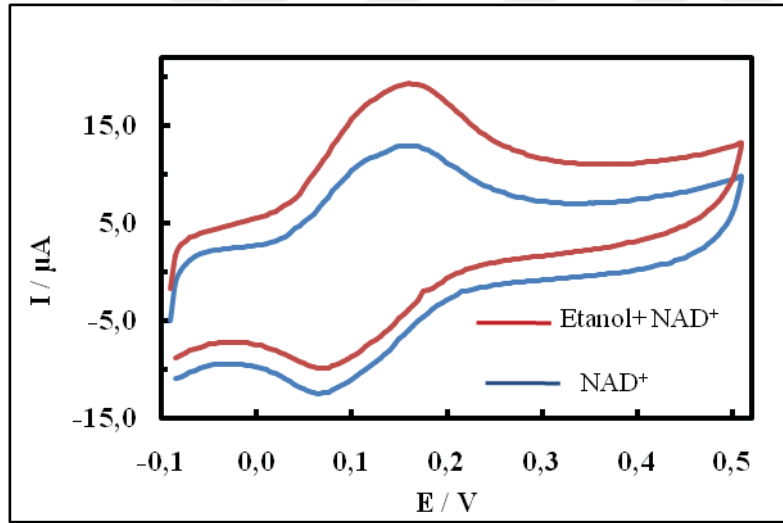
4.5. ADH Temelli Biyosensörlere İlişkin Bulgular

4.5.1. ADH temelli biyosensörlerde NADH'nin yükseltgenmesinin takibi

RA'nın, bir antioksidant olarak NADH'nin elektroyükseltgenmesinde medyatör olarak görev yaptığı, NADH'nin yükseltgenme potansiyelini düşürdüğü ve böylece NADH sensörü geliştirmede rol alabileceği buraya kadar olan çalışmadan anlaşılmıştır. RA'nın bu özelliği dehidrojenaz temelli biyosensörlerde de incelenmiştir. Bu amaçla RA ile modifiye edilmiş depolanmış YBCE yapısına alkoldehidrojenaz enzimi GA çapraz bağlayıcısı yardımıyla dahil edilerek YBCE/RA/ADH/GA biyosensörleri hazırlanmıştır. Hazırlanan alkol biyosensörlerinin etanol tayininde kullanımı ve performans özellikleri incelenmiştir.

4.5.2. ADH temelli biyosensörlerde etanolün tayini

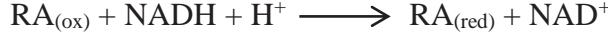
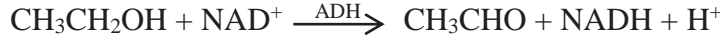
Etanolün tayininde kullanılmak üzere, hazırlanan YBCE/RA/ADH/GA biyosensörlerinin 0,5 mM NAD⁺ içeren pH 7,75 fosfat tamponunda (0,1 M KCl), 0,5 mM etanol varlığında ve yokluğunda, -0,1 - +0,5 V potansiyel aralığında, 50 mV. s⁻¹ tarama hızında döngüsel voltamogramları alınmış ve elde edilen voltamogramlar Şekil 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4.17. YBCE/RA/ADH/GA biyosensörünün -0,1 V ile +0,5 V potansiyel aralığında 0,5 mM NAD⁺ içeren pH 7,75 fosfat tamponunda (0,1 M KCl) 0,5 mM etanolün varlığında ve yokluğunda tarama hızında elde edilen döngüsel voltamogramlar (Tarama hızı: 50 mV. s⁻¹)

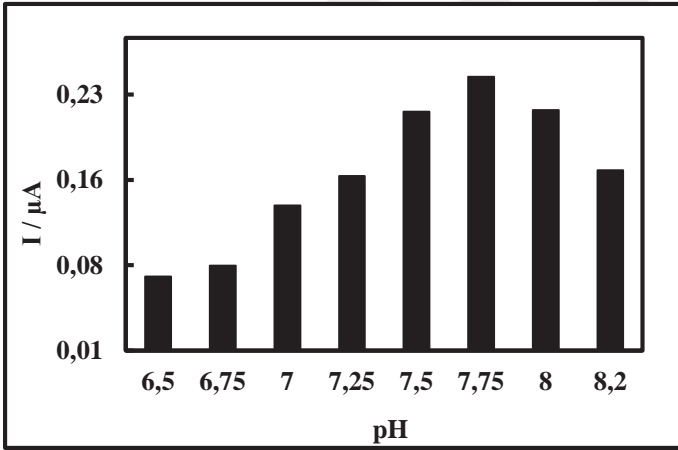
Burada +0,17 V'daki yükseltgenme pik akımının etanol varlığında arttığı görülmektedir. Bu şöyle açıklanabilir: Çözeltideki NAD⁺, analit etanol ile ADH yardımıyla tepkimeye girerek NADH'ye indirgenirken etanol asetaldehite yükseltgenmektedir. Oluşan NADH elektrot yüzeyinde yükseltgenmiş haldeki RA tarafından yeniden NAD⁺'ya yükseltgenirken RA indirgenmiş hale dönmektedir ve oda

daha sonra yeniden yükseltgenmektedir. Bu mekanizma aşağıdaki eşitliklerle formülize edilebilir:



4.5.3. ADH temelli biyosensörlerde pH optimizasyonu

ADH temelli biyosensörlerin etanole karşı olan cevabına pH'nın etkisini incelemek ve optimum pH değerini belirlemek için YBCE/RA/ADH/GA biyosensörlerinin 50 mM derişimde farklı pH'larda (6,5-8,2) hazırlanmış fosfat tampon çözeltileri içerisinde, +0,25 V'da 0,5 mM sabit NAD^+ ve 0,5 mM sabit etanol derişimindeki akımları ölçülmüştür. Ölçülen akım değerlerine karşı pH grafiği çizilmiş ve Şekil 4.18'de verilmiştir. pH 6,5'den 7,75'e arttıkça, pik akımının arttığı, pH 7,75'den sonra ise azaldığı görülmektedir. YBCE/RA/ADH/GA biyosensörünün etanole karşı en yüksek akım değeri, pH 7,75'de gözlenmiş ve bu nedenle de optimum pH 7,75 olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların literatürle de uyumlu olduğu görülmüş ve çalışmanın bundan sonraki kısmında 50 mM pH 7,75 fosfat tamponu kullanılmıştır.

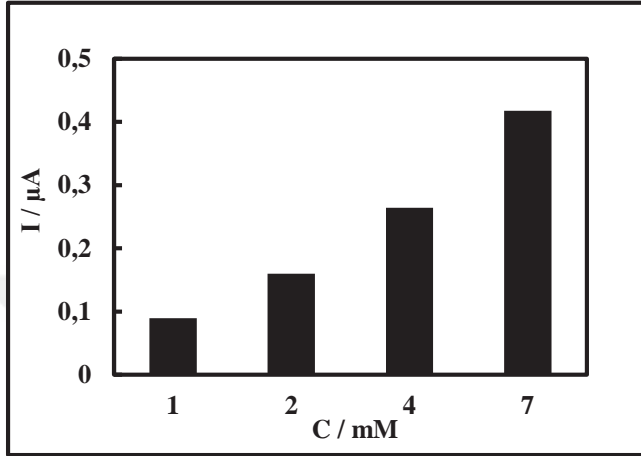


Şekil 4.18. YBCE/RA/ADH/GA biyosensörünün, farklı pH'larda elde edilen akımlara karşı pH grafiği (0,5 mM etanol, 0,5 mM NAD^+ , 0,25 V, 0,1 M KCl)

4.5.4. ADH temelli biyosensörlerde NAD^+ koenziminin miktar optimizasyonu

NAD^+ koenziminin miktarı, enzimatik reaksiyonda üretilen elektronların akseptörü olarak önemli bir rol oynamaktadır. NAD^+ koenzim miktarının, ADH temelli biyosensörlerin etanole karşı olan cevabına etkisini incelemek ve optimum miktarını belirlemek için çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada YBCE/RA/ADH/GA biyosensörleri kullanılarak 1 mM, 2 mM, 4 mM ve 7 mM olmak üzere 4 farklı NAD^+ derişiminde etanolün amperometrik tayini +0,25 V ve 7,75 pH'de gerçekleştirilmiştir. Amperogramlardan elde edilen verilerden yararlanılarak akım-konsantrasyon grafikleri

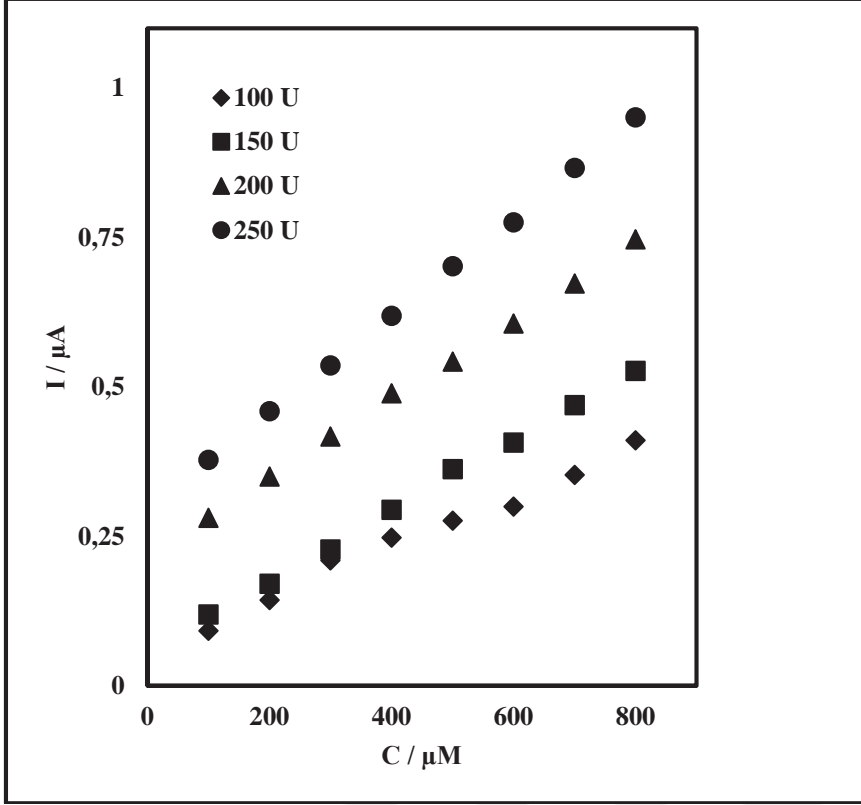
çizilmiş ve Şekil 4.19'da verilmiştir. Buradan YBCE/RA/ADH/GA biyosensörlerinin etanole karşı olan duyarlılığının çalışılan NAD^+ konsantrasyonu aralığında en yüksek değerinin, 7 mM NAD^+ 'da elde edildiği açıkça görülmektedir. Bulunan bu sonuçların literatürle uyumlu olduğu görülmüştür (Bilgi ve Ayrancı 2016). Çalışmanın bundan sonraki kısmında 7 mM NAD^+ kullanılmıştır. 7 mM'ın üzerindeki NAD^+ konsantrasyonlarında amperogramlardaki gürültünün arttığı görüldüğünden daha yüksek NAD^+ konsantrasyonları denenmemiştir.



Şekil 4.19. YBCE/RA/ADH/GA biyosensörünün farklı NAD^+ derişimlerinde elde edilen akımlara karşı NAD^+ derişim grafiği (400 μM etanol, pH 7,75, +0,25 V, 0,1 M KCl)

4.5.5. ADH temelli biyosensörlerde enzim miktarının optimizasyonu

Biyosensörlerin elektrot yüzeyinde bulunan enzim miktarının optimizasyonu, biyoelektrokimyasal reaksiyondaki elektron transfer hızı açısından oldukça önemlidir. Optimizasyon çalışması için, ADH'nin farklı miktarlarında (100 unite, 150 unite, 200 unite ve 250 unite) hazırlanan YBCE/RA/ADH/GA biyosensörleri ile etanolün amperometrik tayini +0,25 V'da pH 7,75'de 7 mM NAD^+ derişiminde gerçekleştirilmiştir. Farklı enzim miktarlarında hazırlanan her bir biyosensör ile yapılan amperometrik tayin sonucu elde edilen amperogramlardan yararlanılarak akım-derişim grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.20). Bu grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri ise Çizelge 4.4'de verilmiştir. Etanole karşı en yüksek duyarlığın 250 unite enzim miktarında elde edildiği hem görsel olarak Şekil 4.20'den hem de sayısal olarak Çizelge 4.4'ten görülmektedir.



Şekil 4.20. Farklı enzim miktarlarında hazırlanmış YBCE/RA/ADH/GA biyosensörlerinin, etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,75, 7 mM NAD⁺, 0,1 M KCl, +0,25 V)

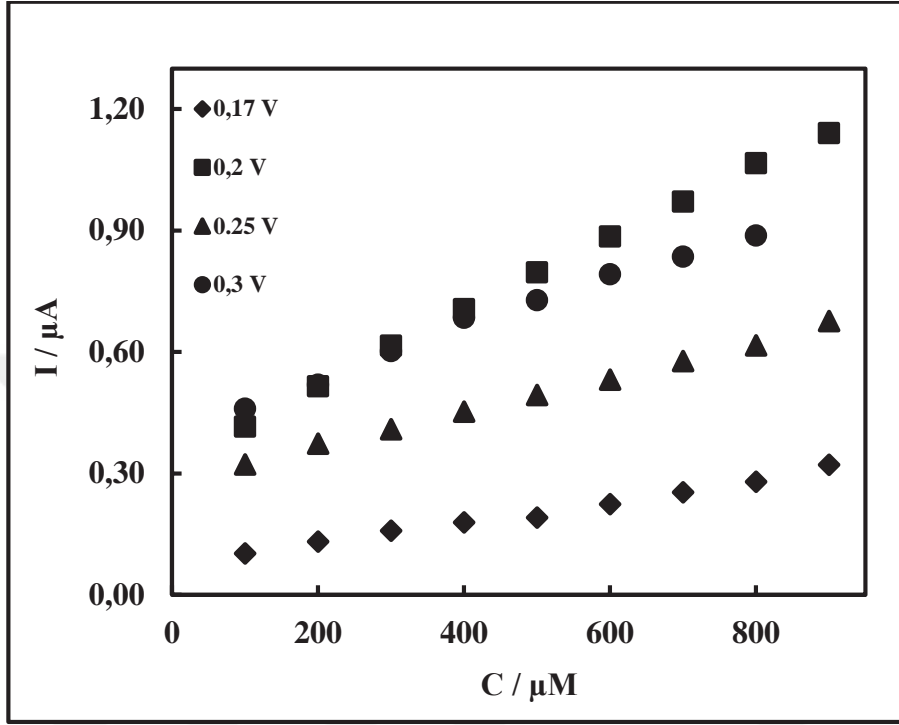
Çizelge 4.4. Şekil 4.20'de verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri

ADH miktarı / (unite)	Duyarlık/ ($\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$)	Korelasyon katsayısı
100	0,426± 0,0086	0,9919
150	0,589± 0,0082	0,9993
200	0,659± 0,0066	0,9995
250	0,815± 0,0022	0,9998

4.5.6. ADH temelli biyosensörlerde çalışma potansiyelinin optimizasyonu

Amperometrik biyosensörlerde çalışma potansiyelinin düşük olması girişim yapan türlerin etkisini azaltmak için istenilen bir durumdur. Amperometrik biyosensörlerdeki elektroaktif analitin redoks potansiyeli genellikle yüksektir. Analit ile aynı ortamda bulunan diğer elektroaktif türler de yüksek çalışma potansiyellerinde reaksiyon gösterebilir. Çalışma potansiyelini düşürmek için, genellikle elektroaktif türe karşı elektrokatalitik etki gösterebilen medyatör, redoks polimeri veya nanoparçacık gibi materyaller kullanılır. RA'nın etanol biyosensörü için medyatör etkisinin, +0,17 V ile +0,30 V arasında olduğu Şekil 4.11'den anlaşılmaktadır. 250 unite enzim miktarında hazırlanan YBCE/RA/ADH/GA biyosensörleri ile etanolün amperometrik tayini 7 mM

NAD⁺ derişiminde, pH 7,75’de farklı çalışma potansiyellerinde (+0,17 V, +0,20 V, +0,25 V ve +0,30 V) yapılmıştır. Elde edilen amperogramlardan faydalanılarak her bir potansiyeldeki akım-etanol konsantrasyonu grafikleri çizilmiş ve Şekil 4.21’de verilmiştir. Bu grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri ise Çizelge 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.21. YBCE/RA/ADH/GA biyosensörünün farklı potansiyellerde, etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,75 fosfat tamponu, 7 mM NAD⁺, 0,1 M KCl, 250 unit ADH)

Çizelge 4.5. Şekil 4.21’de verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri

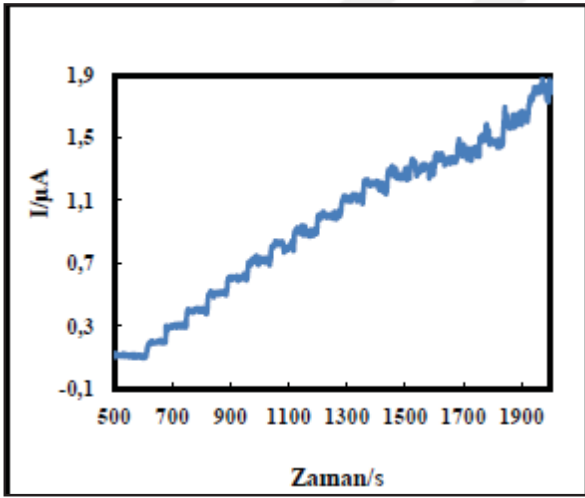
Çalışma potansiyeli / (V)	Duyarlık/ (µA.mM ⁻¹)	Korelasyon katsayısı
+ 0,17	0,259± 0,0114	0,9943
+ 0,20	0,908± 0,0105	0,9995
+ 0,25	0,427± 0,0078	0,9988
+ 0,30	0,618± 0,0258	0,9948

YBCE/RA/ADH/GA biyosensörü ile oldukça düşük bir potansiyel olan +0,17 V’da bile etanole karşı amperometrik yanıt alınmıştır. Bu sonuç, YBCE/RA/ADH/GA elektrodunun NADH’ye karşı yüksek elektrokatalitik etkisini göstermektedir. Elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerlerine bakıldığı zaman, RA’nın etanol biyosensöründe medyatör olarak davrandığı potansiyeller arasında en yüksek akım ve duyarlık değerleri +0,20 V’da elde edildiği için çalışma potansiyeli +0,20 V olarak

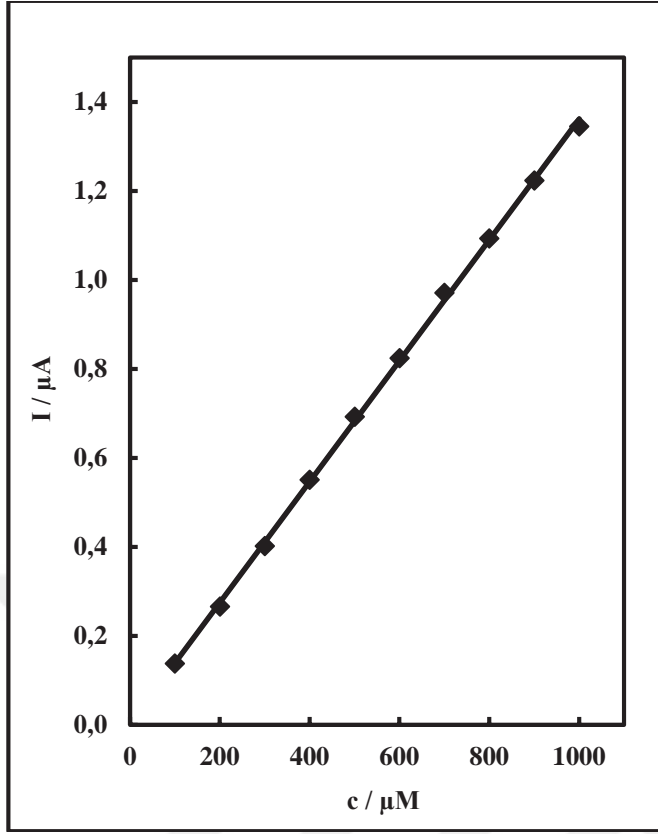
belirlenmiştir. 2007 yılında Manso ve arkadaşları ADH/Au/MWCNT ile modifiye ettikleri carbon elektrodu etanol tayininde kullanmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda, optimum çalışma potansiyelini +0,3 V olarak belirlemişlerdir (Manso vd 2007). Bu sonuçlara bakıldığı zaman bizim çalışmamızda bulunan optimum çalışma potansiyelinin daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durum bize, doğal bir antioksidant olan RA'nın başarılı medyatör etkisi sergilediğini göstermiştir.

4.5.7. Analitiksel karakterizasyon

250 unite enzim miktarında hazırlanan YBCE/RA/ADH/GA biyosensörlerinin analitik karakterizasyonu, içerisinde 7 ml 50 mM pH 7,75 fosfat tamponu ve 1 ml NAD^+ çözeltisi olan bir elektrokimyasal hücrede karıştırma koşulları altında art arda ilave edilen etanolün amperometrik tespiti ile gerçekleştirilmiş ve akım zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilerek kronoamperogramlar elde edilmiştir. Şekil 4.22'de örnek bir kronoamperogram verilmiştir. Akım kararlı hale geldikten sonra 8 μL 100 μM etanol elektrokimyasal hücreye eklenmiştir. Her bir etanol ilavesinden sonra elde edilen sabit akım, konsantrasyonun bir fonksiyonu olarak Şekil 4.23'de olarak çizilmiştir. Etanol ilavesiyle zamanla akımda bir artış olduğu kronoamperogramlardan elde edilen grafikten görülmektedir. Etanol biyosensörünün gözlemlenebilme ve tayin sınırı, duyarlık ve tekrarlanabilirlik gibi analitik karakterizasyon parametreleri Çizelge 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.22. Örnek bir kronoamperogram



Şekil 4.23. YBCE/RA/ADH/GA biyosensörünün 100 µM etanolün ardışık katımı ile elde edilen akım-derişim grafiği

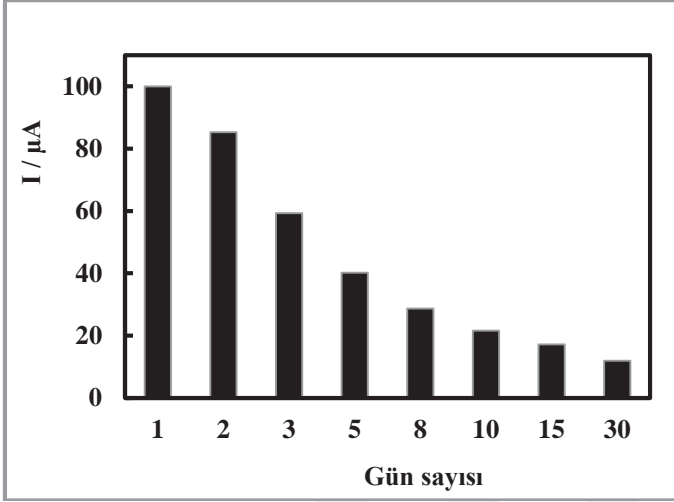
Çizelge 4.6. YBCE/RA/ADH/GA biyosensörleri ile etanolün amperometrik tayini için elde edilen analitiksel parametreler

Tespit limiti	7,1 µM
Tayin sınırı	23,7 µM
Duyarlık	1,36 µA.mM ⁻¹
Tekrarlanabilirlik	RSD % 1,36 (n=10)
Lineer aralık	23,71 µM-1000 µM

YBCE/RA/ADH/GA biyosensörünün +0,20 V'da etanolün amperometrik tayinine karşı tekrarlanabilirliği 400 µM etanol için (n=10) test edilmiş ve bağıl standart sapma (RSD) %1,36 olarak hesaplanmıştır. Bulunan bu değer tekrarlanabilirlik için 10 tekrarlı etanolün amperometrik tayininin iyi olduğunu göstermektedir.

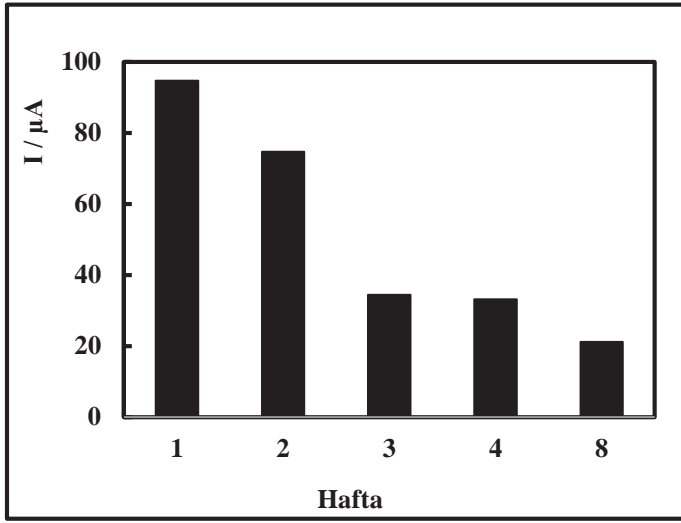
YBCE/RA/ADH/GA biyosensörünün uygulama kararlılığı 400 µM etanol derişimine karşı +0,20 V'da akımların 30 gün boyunca farklı günlerde (günde 3 ölçüm) ölçülmesiyle test edilmiştir. Ölçülen akım-gün sayısı arasındaki ilişki ise Şekil 4.24'de verilmiştir. Şekil incelendiğinde başlangıç amperometrik cevabın, 2. günün sonunda %14,71'inin, 10. günün sonunda %78,44'ünün azaldığı ve 30. günün sonunda ise bu azalışın %88,1'e ulaştığı görülmektedir. En iyi performans ilk iki gün de elde edilmesine rağmen, 30. günde bile hala etanole karşı yanıt alınmıştır. Literatürde Alpat

ve Telefoncu 2010 yılında yaptıkları çalışmada selüloz asetat-toluidin mavisi ile modifiye ettikleri ADH temelli biyosensörün etanol tayini için uygulama kararlılığını test etmişlerdir. Bu biyosensörün uygulama kararlılığının 20 gün sonunda dahi cevap verdiğini bildirmişlerdir (Alpat ve Telefoncu 2010). Bizim çalışmamızdaki sonuçlar literatürler karşılaştırıldığı zaman, YBCE'lerin tek kullanımlık olduğu göz önüne alındığında, geliştirilen bu biyosensörün çoklu ölçümler için 30 günü aşkın sürede gösterdiği cevap umut vericidir. Bu gelişme, elektrot formülasyonunda doğal bir antioksidant olarak RA'nın varlığına atfedilebilir.



Şekil 4.24. YBCE/RA/ADH/GA biyosensörünün 400 μ M etanol derişimine karşı elde edilen akım-gün sayısı grafiği

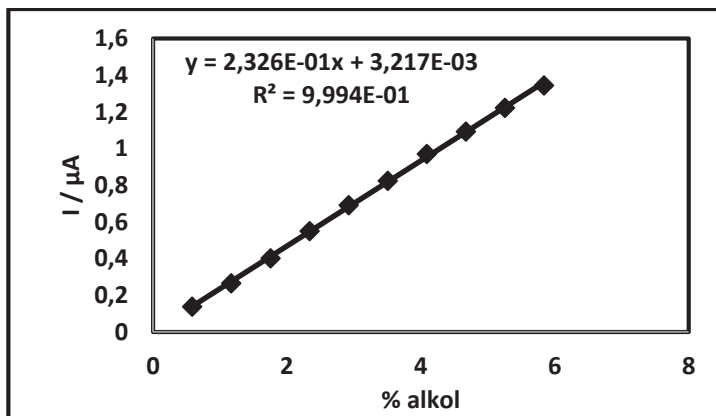
Enzimlerin aktivitesine sıcaklık, nem ve kimyasal maddeler etki edebilir. Enzimler uygun şartlarda saklansalar da, zamanla aktivitelerinde kayıplar meydana gelebilir. Çalışma şartlarında geliştirilen biyosensörün depolama kararlılığını belirlemek için, hazırlanan biyosensörler $+4^{\circ}\text{C}$ 'de sabit nem ortamında bekletilmiştir. Daha sonra bu biyosensörler sırasıyla 8 hafta boyunca $+0,20\text{ V}$ 'da amperometrik etanol tayini yapılmıştır. Amperometrik tayin sonucu elde edilen akım-konsantrasyon grafiği Şekil 4.25'de verilmiştir. YBCE/RA/ADH/GA biyosensörlerinin 8. Haftaya kadar etanole karşı yanıt verdiği görülmektedir. Duyarlık verileri incelendiğinde ise, enzimin aktivitesindeki düşüşten dolayı duyarlık azalış göstermiş olsa da 8. Haftada bile etanole karşı yanıt alınmıştır. Biyosensörün sekizinci haftanın sonunda duyarlılığının % 21,23'ünü koruduğu görülmektedir.



Şekil 4.25. YBCE/RA/ADH/GA biyosensörlerinde 100 µM etanolün ardışık ilavesiyle elde edilen akım-konsantrasyon grafiği

4.5.8. Gerçek numune analizi

Geliştirdiğimiz etanol biyosensörleri gerçek numunelerin analizinde kullanılmıştır. Çeşitli markalardaki rakı, beyaz şarap ve bira örnekleri gerçek numune olarak kullanılmıştır. Rakı numunesi 1:10 oranında, beyaz şarap numunesi 1:2 oranında pH 7,75 fosfat tamponunda seyreltilmiş, bira numunesi ise doğrudan kullanılmıştır. Seyreltilmiş alkol numunelerinin amperometrik tayini +0,20 V'da YBCE/RA/ADH/GA biyosensörleri ile yapılmıştır. Bu tayinde akım-etanol konsantrasyonu (µM) grafiği (Şekil 4.25) akım-etanol yüzdesi grafiğine dönüştürülerek kalibrasyon grafiği olarak kullanılmış ve Şekil 4.26'da verilmiştir. Çizelge 4.7'de seyreltilmiş numunelerin analizi sonucu hesaplanan ve orjinal numune etiketinde var olan alkol yüzdeleri verilmiştir.



Şekil 4.26. YBCE/RA/ADH/GA biyosensörlerinde 100 µM etanolün ardışık ilavesiyle elde edilen akım-alkol yüzdesi grafiği

Çizelge 4.7. Seyreltilmiş numunelerin analizi sonucu hesaplanan alkol yüzdeleri

Alkol numunesi	% Etanol (v/v) etikette verilen	% Etanol (v/v) deneysel hesaplanan	(%) Dönüşüm
Beyaz şarap	11,5	11,28± 0,08	98,09
Bira	4,7	4,64± 0,06	98,72
Rakı	45	44,78 ± 0,03	99,51

5. SONUÇ

Çalışmadan elde edilen sonuçlar şöyledir:

- Döngüsel voltametri tekniği ile RA'nın YBCE üzerine biriktirilmesi sağlanmış ve sonuçlar değerlendirildiğinde, RA'nın geliştirilen NADH sensöründe başarılı bir şekilde medyatör etkisi sergilediği gözlenmiştir.
- YBCE/RA elektrodu ile NADH'nin amperometrik tayini yapılmış ve bu tayin sonucu gözlemlenebilme ve tayin sınırı, duyarlık ve tekrarlanabilirlik gibi analitiksel karakterizasyon parametreleri bulunmuştur. Yüksek duyarlık, düşük gözlemlenebilme değeri ve yüksek tekrarlanabilirliğe sahip düşük potansiyelde girişimsiz tayin yapılabilen yeni NADH sensörü başarıyla geliştirilmiştir.
- YBCE'ler üzerine RA'nın biriktirilmesi başarılı olarak gerçekleştirilmiştir. YBCE üzerinde RA'nın depozisyonunda tarama hızı ve döngü sayısı etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde en iyi sonuçların 20 mV.s^{-1} tarama hızında ve 5 döngü RA uygulaması sonucu elde edilmiştir.
- RA biriktirilmiş yüzey ve YBCE arasındaki görünür yüzey yük aktarım sabiti, k_s , ve elektron transfer katsayısı, α , değerleri hesaplanmıştır. k_s değeri $0,27 \text{ s}^{-1}$ ve α değeride $0,745$ olarak bulunmuştur. Bu değerler değerlendirildiğinde RA'nın biriktirilmesinin yüzey kontrollü bir proses olduğu bulunmuştur.
- RA'nın elektroyükseltgenmesiyle ilgili olarak α ve D değerleri hesaplanmış ve bu değerler sırasıyla $0,283 \text{ s}^{-1}$ ve $1,132 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bu değerler değerlendirildiğinde RA'nın elektroyükseltgenmesinin yüzey kontrollü bir proses olduğu bulunmuştur.
- YBCE/RA elektrodunun RA'nın medyatör etkisi ile YBCE'nin NADH'ye karşı olan yükseltgenme pik potansiyelini 150 mV 'a düşürdüğü gözlenmiştir.
- Geliştirilen NADH sensörü için pH optimizasyonu çalışması yapılmış ve optimum pH $7,25$ olarak bulunmuştur.
- Geliştirilen NADH sensörü için çalışma potansiyeli optimizasyonu çalışması yapılmış ve optimum çalışma potansiyeli $0,25$ olarak bulunmuştur.
- Sensörün uygulama kararlılığı için NADH'nin amperometrik tayin yapılmış ve 30. Günün sonunda dahi NADH'ye amperometrik yanıt alınmıştır.
- Enzimlerin YBCE'ler üzerine kuvvetli tutuklanması ve sonrasında aktivitelerinin korunabilmesi için literatür araştırmaları sonucunda ADH temelli biyosensörler için GA ile çapraz bağlama yapılmıştır.
- ADH temelli biyosensörlerin etanole karşı verdiği cevap incelenmiş ve pik akımlarındaki artıştan dolayı RA medyatörlüğüyle başarılı bir etanol biyosensörü geliştirilmiştir.
- ADH temelli biyosensörlerin optimum çalışma koşulları belirlenmiştir. Optimum pH $7,75$, enzim miktarı 250 Unite ve çalışma potansiyeli ise $0,20 \text{ V}$ olarak bulunmuştur.
- ADH temelli biyosensörlerin tekrarlanabilirliği $400 \mu\text{M}$ etanol ($n=10$) için test edilmiş ve bağıl standart sapma (R.S.D) $\%1,36$ olarak hesaplanmıştır.
- ADH temelli biyosensörlerin uygulama kararlılığı 30 gün boyunca aralıklarla test edilmiş ve 30. Günün sonunda dahi etanole karşı cevap alınmıştır.
- Enzimlerin aktivitesine sıcaklık, nem ve kimyasal maddeler etki edebilir. Enzimler uygun şartlarda saklansalar da, zamanla aktivitelerinde kayıplar meydana gelebilir. Çalışma şartlarında geliştirilen biyosensörün depolama kararlılığını belirlemek

için ADH temelli biyosensörün depolama kararlılığı test edilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde biyosensörün 8.haftada dahi etanole karşı cevap verildiği görülmüştür.



6. KAYNAKLAR

- ALPAT, Ş. ve TELEFONCU, A. 2010. Development of an Alcohol Dehydrogenase Biosensor for Ethanol Determination with Toluidine Blue O Covalently Attached to a Cellulose Acetate Modified Electrode. *Sensors*, 10: 748-764.
- ARSHAK K., MOHAMED, Z., SOUNA, E. ve ANTHONY, T. 2008. Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems. New York: Springer Science and Business Media.
- AZEVEDO, A.M., PRAZERES, D.M.F., CABRAL, J.M.S. ve FONSECA, L.P. 2005. Ethanol biosensors based on alcohol oxidase. *Biosens Bioelectron*, 21: 235-247.
- BAHADIR, E.B. ve SEZGİNTÜRK, M.K., 2015. Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses. *Analytical Biochemistry*, 478: 107-120.
- BARD, A.J. ve FAULKNER, L.R. 2001. Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications, Second Edition, Wiley.
- BHUNIA, A.K. 2008. Biosensors and bio-based methods for the separation and detection of foodborne pathogens. *Adv Food Nutr Res*, 54: 1-44.
- BİLGİ, M. ve AYRANCI, E. 2016. Biosensor application of screen-printed carbon electrodes modified with nanomaterials and a conducting polymer: Ethanol biosensors based on alcohol dehydrogenase, *Sens. Actuators B: Chem*, 237: 849–855.
- BORGMANN, S., SCHULTE, A., NEUGEBAUER, S. ve WOLFGANG, S. 2012. Amperometric Biosensors. ALKIRE, R.C., KOLB, D.M., LIPKOWSKI, J. (Editörler). WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- BRENA, M.B. ve BATISTA-VIERA, F. Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells, J. M. Guisan (Editör), Second Edition, Humana Press Inc., Totowa, NJ
- BRETT, C.M.A., OLIVEIRA-BRETT, A.M. 1993. Electrochemistry. Principles, methods, and applications, Oxford University Press, Oxford.
- CHAUBEY, A. ve MALHOTRA, B.D. 2002. Mediated biosensors. *Biosens Bioelectron*, 17: 441-456.
- CHOI, M.M.F. Progress in Enzyme-Based Biosensors Using Optical Transducers. *Microchimica Acta*. 148: 107-132.
- CLARK, Jr. L. C., ve LYONS C. 1962. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 105: 20-45.
- CORTINA, M., CALAS-BLANCHARD, C. ve MARTY, J.L. 2012. Electrochemical Biosensors for the Determination of the Antioxidant Capacity. *BIOMEM group*, 103-107.
- ÇOĞAL, S., GÜRSOY, S.Ş., ÇOĞAL, G.Ç. ve GÜRSOY, O. 2016. Sütte Laktoz Tayini İçin Biyosensörlerin Kullanımı. *Akademik Gıda*, 14 (1): 33-42.
- DATTA, S., CHRISTINA, L.R. ve RAJARAM, Y.R.S. 2013. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials: Review. *Biotech*, 3: 1-9.
- EGUILAZ, M., GUTIERREZ, F., GONZALEZ-DOMINGUEZ, J.M., MARTINEZ, M.T. ve RIVAS, G. 2016. Single-walled carbon nanotubes covalently functionalized with polytyrosine: A new material for the development of NADH-based biosensors, *Biosensors and bioelectron*. 86: 308-314.
- ENACHE, T.A. ve OLIVEIRA-BRETT, A.M. 2011. Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways. *J Electroanal Chem*, 655: 9-16.

- FANJUL-BOLADO, P., HERANDEZ-SANTOS, D., LAMAS-ARDISANA, P.J., MARTIN-PERNIA, A. ve COSTA-GARCIA, A. 2008. Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes. *Electrochim Acta*, 53: 3635-3642.
- FRANZOIA, A. C., DUPONTB, J., SPINELLI, A. ve VIEIRA, I.C. 2008. Biosensor based on laccase and an ionic liquid for determination of rosmarinic acid in plant extracts. *Talanta*, 77: 1322-1327.
- GAO, Q., CUI, X., YANG, F., MA, Y. ve YANG, X. 2003. Preparation of poly(thionine) modified screen-printed carbon electrode and its application to determine NADH in flow injection analysis system. *Biosensors and Bioelectronics*, 19: 277-282.
- GAO, Q., WANG, W., MA, Y. ve YANG, X. 2004. Electrooxidative polymerization of phenothiazine derivatives on screen-printed carbon electrode and its application to determine NADH in flow injection analysis system. *Talanta*, 62: 477-482.
- GIACOMELLI, C., CKLESS, K., GALATO, D., MIRANDA, F.S. ve SPINELLI, A. 2002. Electrochemistry of Caffeic Acid Aqueous Solutions with pH 2.0 to 8.5. *J Braz Chem Soc*, 13: 332-338.
- GIL, E.S., ENACHE, T.A. ve OLIVEIRA-BRET, A.M. 2013. Redox Behaviour of Verbascoside and Rosmarinic Acid. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 16: 1-6.
- GOLABI, S.M., NEMATOLLAHI, D. 1997. Electrochemical Study of catechol in ethanol: Application to the electro-organic synthesis of 4,5-diethoxy-o-benzoquinone. *Bull Electrochem*, 13: 156-160.
- GOLABI, S.M., NEMATOLLAHI, D. 1997. Electrochemical study of catechol and some 3-substituted catechols in the presence of 4-hydroxy coumarin: Application to the electro-organic synthesis of new coumestan derivatives. *J Electroanal Chem*, 420: 127-134.
- GOLABI, S.M., NEMATOLLAHI, D. 1997. Electrochemical study of 3,4-dihydroxybenzoic acid and 4-tert-butylcatechol in the presence of 4-hydroxycoumarin application to the electro-organic synthesis of coumestan derivatives. *J Electroanal Chem*, 430: 141-146.
- GUILBAULT, G. G. ve MONTALVO, J. 1969. Urea-specific enzyme electrode. *JACS*, 91: 2164-2569.
- GUY, J.E., ISUPOV, M.N. ve LITTLECHILD, J.A. 2003. The Structure of an Alcohol Dehydrogenase from the Hyperthermophilic Archaeon *Aeropyrum pernix*. *Journal of Molecular Biology*, 331: 1041-1051.
- HAPIOT, P., NEUDECK, A., PINSON, J., FULCRAND, H., NETA, P. ve ROLANDO, C. 1996. Oxidation of caffeic acid and related hydroxycinnamic acids. *J Electroanal Chem*, 405: 169-176.
- HARRISON J.A. ve KHAN, Z.A. 1970. The oxidation of hydrazine on platinum in acid solution. *J Electroanal Chem*, 28: 131-138.
- HAYAT, A. ve MARTY, J.L. 2014. Disposable Screen Printed Electrochemical Sensors: Tools for Environmental Monitoring. A Review. *Sensors*, 14: 10432-10453.
- KATAKIS, I. ve DOMINGUEZ, E. 1997. Catalytic electrooxidation of NADH for dehydrogenase amperometric biosensors. *Microchimica Acta*, 126: 11-32.
- KRESS-ROGERS, E. 1998. Instrumentation and Sensors for the Food Industry, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England.

- KUMAR, S.S. ve CHEN, S. 2008. Electroanalysis of NADH using conducting and redox active polymer/carbon nanotubes modified electrodes: A Review. *Sensors*, 8: 739-766.
- KOUNAVES, S.P. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. Chapter 37. 709-725 ss.
- LAVIRON, E.J. 1974. Adsorption, autoinhibition and autocatalysis in polarography and in linear potential sweep voltammetry. *J Electroanal Chem and Interfacial Electrochem*, 52: 355-393.
- LAVIRON, E.J. 1979. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *J Electroanal Chem and Interfacial Electrochem*, 101: 19-28.
- LEE, P.T. ve COMPTON, R.G. 2013. Electrochemical detection of NADH, cysteine, or glutathione using a caffeic acid modified glassy carbon electrode. *Electroanal*, 25: 1613-1620.
- LI, Y.W., CHEN, Y., MA, Y.H., SHI, J.G., WANG, Y.X., QI, C.H., LI, Q.S. 2014. Recent Advances in the Dehydrogenase Biosensors Based on Carbon Nanotube Modified Electrodes. *Chin J Anal Chem*. 42(5): 759-765.
- LINDNER, E., TOTH, K. ve PUNGOR, E., 1986. Definition and determination of response time of ion selective electrodes. *Pure Appl. Chem*. 58 (3): 469-479.
- LOWRY, O.H. ve PASSONNEAU, J.V. 1971. in: O.H. Lowry (Editörler.), A Flexible System of Enzymatic Analysis, Academic Press, New York, pp 11-15.
- MANSO, J., PENA, M.L., YANEZ-SEDENO, P. ve PINGARRON. J.M. 2008. Alcohol dehydrogenase amperometric biosensor based on a colloidal gold-carbon nanotubes composite electrode. *Electrochim Acta*, 53: 4007-4012.
- MELLO, L.D. ve KUBOTA, L.T. 2002. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chem*, 77: 237-256.
- NAMAZIAN, M. ve ZARE, H.R. 2005. Electrochemistry of chlorogenic acid: experimental and theoretical studies. *Electrochim Acta*, 50: 4350-4355.
- NEMATOLLAHI, D. ve GOLABI, S.M. 1996 Electrochemical study of catechol and 4-methylcatechol in methanol. Application to the electro-organic synthesis of 4,5-dimethoxy-and 4-methoxy-5-methyl-o-benzoquinone. *J Electroanal Chem*, 405: 133-140.
- PARIENTE, F., TOBALINA, F., DARDER, M., LORENZO, E. ve ABURINA, H.D. 1996. Electrodeposition of redox-active films of dihydroxybenzaldehydes and related analogs and their electrocatalytic activity toward NADH oxidation. *Anal Chem*, 68: 3135-314
- PETERSEN, M. ve SIMMONDS, M.S.J. 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62: 121-125.
- PICKUP, J. Ve THEVENOT, D.R. 1993. In: Turner, A.P.F. (Editörler), Chemical sensors for in vivo monitoring: advances in biosensors. Supplement, JAI Press, pp. 201.
- RASOOLY, A. 2005. Biosensor technologies. *Methods*, 37: 1-3.
- PETRUCCI, R., ASTOLFI, P., GRECI, L., FIRUZI, O., SASO, L. ve MARROSU, G. 2007. A spectroelectrochemical and chemical study on oxidation of hydroxycinnamic acids in aprotic medium. *Electrochimica Acta*, 52: 2461-2470.
- RODOI, A. ve COMPAGNONE, D. 2009. Recent advances in NADH electrochemical sensing design, *Bioelectrochem*. 76: 126-134.

- RUPASINGHE, H.P.V., ERKAN, N. ve YASMIN, A. 2010. Antioxidant protection of eicosapentaenoic acid and fish oil oxidation by polyphenolic-enriched apple skin extract. *J Agric Food Chem*, 58: 1233–1239.
- SALAS-REYES, M., HERNANDEZ, J., DOMINGUEZ, Z., GONZALEZ, F.J., ASTUDILO, P.D., NAVARRO, R.E., MARTINEZ-BENAVIDEZ, E., VELAZQUEZ-CONTRERASE, C. ve CRUZ-SANCHEZ, S. 2011. Electrochemical Oxidation of Caffeic and Ferulic Acid Derivatives in Aprotic Medium. *J Braz Chem Soc*, 22: 693-701.
- SANTHIAIGO, M., PERALTA, R.A., NEVES A., MICKE, G.A. ve VIEIRA, I.C. 2008. Rosmarinic acid determination using biomimetic sensor based on purple acid phosphatase mimetic. *Anal. Chim. Acta*, 613: 91.
- SANTOS, A.S., FREIRE, R.S. ve KUBOTA, L.T. 2003. Highly stable amperometric biosensor for ethanol based on Meldola's blue adsorbed on silica gel modified with niobium oxide, *Journal of Electroanal. Chem*, 547: 135-142.
- SASSOLAS, A., BLUM, L.J. ve LECA-BOUVIER, B.D. 2012. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol adv*, 30: 489-511.
- SAVARIMUTHU, B. R., RAMASWAMY, S. and PLAPP, B.V. 2014. Yeast Alcohol Dehydrogenase Structure and Catalysis. *Biochem*. 53: 5791-5803.
- SCHELLER, W., HINSTCHE, R., PFEIFFER, D., SCHUBERT, F., ve KİNDSERVATER, R. 1991. Biosensors: Fundamentals, applications and trends. *Sensors Actuators B*, 4: 197 - 206.
- SCOUTEN, W.H., LUONG, J.H.T. ve BROWN, S. 1995. Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design: Review. *Tibtech*, 13: 178-185.
- SHARMA, S.K., SEHGAL, N. ve Kumar, A. 2003. Biomolecules for development of biosensors and their applications. *Current Applied Physics*, 3: 307–316.
- SKOOG, D.A., HOLLER, F.J., NIEMAN, T.A. ve CROUCH, S.R. 2004. Fundamentals of Analytical Chemistry, Eighth edition, Thomson, Chapter 23: Voltammetry, 665 s, Canada.
- SOLOMON, G. Ve FRYHLE, C. 2002. Organik Kimya, Gral Okay ve Yılmaz YILDIRIR (Editörler). Literatr Yayıncılık, 482-483 ss. İstanbul.
- TALEAT, Z., KHOSHROO, A. ve MAZLOUM-ARDAKANI, M. 2014. Screen-printed electrodes for biosensing: A Review. *Microchimica Acta*, 181: 865-891.
- TELEFONCU, A. 2012. Biyosensörlere genel bakış ve biyosensör uygulamalarında son gelişmeler. Telefoncu A. Ve Kılınç A (editörler), Biyosensörler; Metotlar, Uygulamalar ve Son gelişmeler. Ege Üniv. Matbaası, 5-12 ss, İzmir.
- THEVENOT, D.R., TOTH, K., DURST, R.A. ve WILSON, G.S. 2001. Electrochemical biosensors: Recommend definitons and classification. *Biosensor Bioelectron*. 16 (1-2): 121-131.
- TUDORCHE, M. ve BALA, C. 2007. Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis. *Anal Bioanal Chem*, 338: 565-578.
- TURNER, A.P.F., KARUBE, I. ve WILSON, G.S. 1987. Biosensors Fundamentals and Applications. Oxford Univeristy Press, Oxford.
- WANG, J., TIAN, B., NASCIMENTO, V.B. ve ANGNES, L. 1998. Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks. *Electro Chim Acta*, 43: 3459-3465.

- WANG, J. 2004. Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Electroanalysis*, 17: 7-14.
- WASSERMAN, W.J., RUDOLPH, J.R. 2017. Ethanol, *Salem Press Encyclopedia of Science*, 3 ss.
- YILDIRIR, Y. 2011. Organik Kimya “Yaşamın Kalbi”. DIŞLI, A. ve ALTUNDAŞ, A.A. (Yardımcı editörler) Bilim Yayınları, Gazi Üniversitesi. 457-461 ss.
- ZANARDI, C., FERRARI, E., PIGANI, L., ARDUINI, F. ve SEEBER, R. 2015. Development of an Electrochemical Sensor for NADH Determination Based on a Caffeic Acid Redox Mediator Supported on Carbon Black. *Chemosensors*, 3: 118-128.
- ZARE, H.G. ve GOLABI, S.M. 2000. Caffeic acid modified glassy carbon electrode for electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH). *J Solid State Electrochem*, 4: 87-94.
- ZARE, H.R. ve GOLABI, S.M. 1999. Electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) at a chlorogenic acid modified glassy carbon electrode. *J Electroanal Chem*, 464: 14-23.

ÖZGEÇMİŞ



1992 yılında Ankara'da doğmuştur. İlk ve orta öğrenimini Ankara'da, lise öğrenimini Antalya'da tamamlamıştır. 2010 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nden 2014 yılında Kimyager ünvanı alarak, Onur Belgesi ile mezun olmuştur. 2014 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başlamıştır.

