T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOSENSÖR ÇALIŞMALARINDA KULLANILMAK ÜZERE ÜÇ BOYUTLU YAZICI İLE KARBON PASTA ÇALIŞMA ELEKTRODU ÜRETİMİ

BERKAY DİLBAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman: Prof. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN

EDİRNE-2025

Berkay Dilbaz'ın hazırladığı **"Biyosensör Çalışmalarında Kullanılmak Üzere Üç Boyutlu Yazıcı İle Karbon Pasta Çalışma Elektrodu Üretimi"** başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Kimya Anabilim Dalında bir **Yüksek lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	İmza
Tez Danışmanı Prof. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN	……
Jüri 1 Unvan Ad SOYAD	……
Jüri 2 Unvan Ad SOYAD	……

Tez Savunma Tarihi: 24/01/2025

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Prof. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN

Tez Danışmanı ……

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

……

Doç. Dr. Filiz UMAROĞULLARI

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T. Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

24 / 01 / 2025
Berkay DİLBAZ
İmza

Yüksek Lisans Tezi

Biyosensör Çalışmalarında Kullanılmak Üzere Üç Boyutlu Yazıcı İle Karbon Pasta Çalışma Elektrodu Üretimi

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada biyosensör tasarımlarında kullanılmak üzere düşük maliyetli, tek kullanımlık yeni karbon pasta elektrotları üretilmesi ve biyosensör olarak kullanılabilirliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

Literatürde pek çok bileşiğin kantitatif analizi için biyosensör sistemleri geliştirildiği ve bu amaçla çalışma elektrodu olarak katı elektrotlar, karbon pasta elektrotlar, yüzey baskılı elektrotlar, indiyum kalay oksit elektrotlar ve benzeri elektrot türlerinin elektrokimyasal ölçümlerde kullanıldığı belirtilmektedir. Bu elektrotların her birinin kendi içlerinde önemli kullanım handikapları vardır. Özellikle çeşitli enzim ve dokularının biyobileşen olarak kullanıldığı sensörlerde karbon pasta elektrot kullanımı yaygındır. Karbon pasta elektrotların oyuk kısmının her çalışma sonrasında temizlenmesi gerekir, bu temizleme işlemi sonrasında sıklıkla safsızlıklar oyuk içerisinde kalır ve bir sonraki ölçümlere etki eder. Bu çalışma ile yeni tek kullanımlık ve düşük maliyetli karbon pasta çalışma elektrotları üretilerek bu soruna çözüm bulunması amaçlanmıştır.

Bu amaçla, tek kullanımlık karbon pasta elektrotlar SolidWorks yazılımı yardımı ile tasarlandı. Aralarından en iyi tasarım seçilerek, üretimi Formlabs 3+ Üç Boyutlu Yazıcı ile yapıldı. Basılan elektrotların potansiyostat bağlantısı için bakır, altın, kalay kaplı bakır ve platin iletken teller kullanıldı ve her birinin elektrokimyasal davranışları impedans spektroskopisi ile incelendi. Üretilen bu elektrotlar, kateşol tayini için tasarlanan lakkaz tabanlı amperometrik bir biyosensörün tasarımında kullanıldı. Geliştirilen 4 farklı biyosensörün tekrar üretilebilirlikleri ve tekrarlanabilirlik özellikleri

incelendi. Tüm ölçümler, tampon varlığında bir çalışma hücresi içerisinde platin karşıt elektrot, Ag/AgCl referans elektrot ve çalışma elektrodundan oluşan üçlü elektrot sistemini içeren bir potansiyostat/galvanostat ile gerçekleştirildi.

Sonuç olarak bu çalışmada; farklı iletken teller kullanılarak kullanım kolaylığı olan, hızlı ölçüm yapılabilen, duyarlı, tekrarlanabilirliği ve tekrar üretilebilirliği oldukça iyi olan, ucuz ve tek kullanımlık karbon pasta çalışma elektrotları üretildi.

Yıl : 2025

Sayfa Sayısı : 119

Anahtar Kelimeler : Biyosensör, Üç boyutlu yazıcı, Karbon pasta elektrot, Enzim sensörü, Amperometri

Master's Thesis

Production Of Carbon Paste Working Electrode With Three-Dimensional Printer For Use In Biosensor Studies

Trakya University Institute of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

ABSTRACT

In this study, the aim was to produce low-cost, disposable new carbon paste electrodes for use in biosensor designs and to demonstrate their applicability as biosensors.

The literature indicates that biosensor systems have been developed for the quantitative analysis of various compounds, and for this purpose, solid electrodes, carbon paste electrodes, screen-printed electrodes, indium tin oxide electrodes, and similar electrode types have been used in electrochemical measurements. Each of these electrodes has significant usage drawbacks. Particularly in sensors where various enzymes and tissues are used as biocomponents, the use of carbon paste electrodes is common. The cavity of carbon paste electrodes needs to be cleaned after each use; however, impurities often remain in the cavity after cleaning, affecting subsequent measurements. This study aimed to address this issue by producing new disposable and low-cost carbon paste working electrodes.

To achieve this, disposable carbon paste electrodes were designed using SolidWorks software. The best design was selected and manufactured using the Formlabs 3+ 3D Printer. For the potentiostat connection of the printed electrodes, conductive wires made of copper, gold, tin-plated copper, and platinum were used, and their electrochemical behaviors were examined using impedance spectroscopy. The produced electrodes were used in the design of a laccase-based amperometric biosensor for catechol determination. The reproducibility and repeatability characteristics of four different

developed biosensors were evaluated. All measurements were performed using a potentiostat/galvanostat with a three-electrode system consisting of a platinum counter electrode, an Ag/AgCl reference electrode, and a working electrode within a cell containing a buffer solution.

As a result, in this study, low-cost, disposable carbon paste working electrodes were produced that offer ease of use, rapid measurement, high sensitivity, and excellent reproducibility and repeatability with the use of different conductive wires.

Year : 2025

Number of Pages : 119

Keywords : Biosensor, Three-dimensional printer, Carbon paste electrode, Enzyme sensor, Amperometry

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren gerek ders gerek tez çalışmamın her aşamasında yardım, tecrübe ve görüşlerinden yararlanabildiğim, kendisi ile çalışmaktan son derece mutlu olduğum danışmanım Prof. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN'a saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Öğr. Gör. Dr. Alp YÜCEL'e, analizlerimin gerçekleşmesinde çalışmama destek olan Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne ve son olarak tez çalışmam boyunca desteklerini üzerimde hissettiğim sevgili anneme ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Berkay Dilbaz

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv
ABSTRACT vi
TEŞEKKÜR viii
İÇİNDEKİLER ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xii
ŞEKİLLER DİZİNİ xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ xviii
BÖLÜM 1 1
GİRİŞ 1
BÖLÜM 2 3
KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI 3
2.1. Biyosensörler 3
2.2. Biyosensör Çeşitleri 6
2.2.1. Optik biyosensörler 6
2.2.2. Termal biyosensörler 7
2.2.3. Kütle duyarlı biyosensörler 7
2.2.4. Elektrokimyasal biyosensörler 8
2.2.4.1. Dönüştürücünün Çeşidine Göre Elektrokimyasal Biyosensörler 8
2.2.4.1.1. Amperometrik biyosensörler 9
2.2.4.1.2. Potansiyometrik biyosensörler 9
2.2.4.1.3. İmpedimetrik biyosensörler 10
2.2.4.1.4. Voltametrik biyosensörler 10
2.2.4.2. Elektrokimyasal Biyosensörlerin Biyolojik Tanıma Unsuruna Göre Sınıflandırılması 10
2.2.4.2.1. Biyokatalitik biyosensörler 11
2.2.4.2.2 Afinite biyosensörleri 12
2.3. Biyosensörlerde Kullanılan Bazı Elektrokimyasal Ölçüm Yöntemleri 13
2.3.1. Döngüsel Voltametri 13

2.3.2. Kronoamperometri 14
2.3.3. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi 15
2.4. Elektrokimyasal Biyosensörlerde Kullanılan Elektrot Türleri 17
2.4.1. Karşıt elektrotlar 17
2.4.2. Referans elektrotlar 18
2.4.3. Çalışma elektrotları 18
2.4.3.1 Karbon Elektrotlar 19
2.4.3.1.1. Camsı Karbon Elektrot 20
2.4.3.1.2. Yüzey Baskılı Karbon Elektrot 21
2.4.3.1.3. Kalem Grafit Elektrot 21
2.4.3.1.4. Karbon Pasta Elektrot 22
2.4.3.1.4.1. Karbon Pasta Elektrot Biyosensörleri ile İlgili Çalışmalar 25
2.5. Üç Boyutlu Baskı 29
2.5.1. 3D Baskı Üretimi İle İlgili Biyosensör Çalışmaları 32
BÖLÜM 3 35
MATERYAL VE METOD 35
3.1. Materyal 35
3.1.1. Tasarlanan Biyosensörlerin Geliştirilmesinde Kullanılan Materyaller ve Cihazlar 35
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar 36
3.1.3. Tasarlanan Biyosensörlerin Geliştirilmesinde Kullanılan Çözeltiler 37
3.2. Yöntem 38
3.2.1. Üç Boyutlu Yazıcıda Çalışma Elektrodu Başlıklarının Basımı ve Temizlenmesi 38
3.2.2. Biyosensör Tasarımında Kullanılan İletken Tellerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İle Analizi 40
3.2.3. Biyosensör Tasarımında Kullanılan İletken Tellerin Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX) Analizi 40
3.2.4. Grafit Tozunun Elde Edilmesi 40
3.2.5. Karbon Pasta Çalışma Elektrodunun Hazırlanması 41
3.2.6. Tasarlanan Biyosensörlerin Çalışma Prosedürü 42
3.2.7. Tasarlanan Biyosensörlerin Çalışma Koşulları 44
3.2.8. Tasarlanan Biyosensörler İçin Çalışma Potansiyelinin Belirlenmesi 45
3.2.9. Tasarlanan Biyosensörlerin Cevap Süresinin Belirlenmesi 45

3.2.10. Tasarlanan Biyosensörlerin Kalibrasyon Grafiklerinin ve Tayin Sınırlarının Belirlenmesi 45
3.2.11. Tasarlanan Biyosensörlerin Tekrar Üretilebilirliklerinin İncelenmesi 46
3.2.12. Tasarlanan Biyosensörlerin Tekrarlanabilirliklerinin İncelenmesi 46
3.2.13.Tasarlanan Biyosensörlerin İmpedans Analizleri 46
BÖLÜM 4 48
SONUÇLAR ve TARTIŞMA 48
4.1. Biyosensör Tasarımında Kullanılan İletken Tellerin SEM Analizi 48
4.2. Biyosensör Tasarımında Kullanılan İletken Tellerin EDX Analizi 49
4.3. Tasarlanan Biyosensörler İçin Çalışma Potansiyelinin Belirlenmesi 52
4.4. Tasarlanan Biyosensörlerin Cevap Süresinin Belirlenmesi 53
4.5. Kateşol Çözeltisi için Doğrusal Tayin Aralığının Belirlenmesi 55
4.5.1. Tasarlanan Biyosensörlerin Kalibrasyon Grafiklerinin ve Tayin Sınırlarının Belirlenmesi 55
4.6. Tasarlanan Biyosensörlerin Tekrar Üretilebilirliklerinin İncelenmesi 58
4.6.1. Altın tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün tekrar üretilebilirliği 58
4.6.2. Bakır tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün tekrar üretilebilirliği 65
4.6.3. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün tekrar üretilebilirliği 72
4.6.4. Platin tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün tekrar üretilebilirliği 79
4.7. Tasarlanan Biyosensörlerin Tekrarlanabilirlik Çalışması 86
4.8. Tasarlanan Biyosensörlerin İmpedans Analizleri 89
KAYNAKLAR 93
ÖZGEÇMİŞ 101

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AC: Alternatif akım

Ag: Gümüş

AgCl: Gümüş Klorür

Au: Altın

CPE: Karbon Pasta Elektrot

Cu: Bakır

CV: Döngüsel voltametri

DC: Diferansiyel Akım

EDX: Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi

EIS: Elektrokimyasal impedans spektroskopisi

GCE: Camsı Karbon Elektrot

GOD: Glukoz Oksidaz

Hb: Hemoglobin

Hg_2Cl_2: Cıva(I) klorür, kalomel

H_2O_2: Hidrojen peroksit

ITO: İndiyum Kalay Oksit

IUPAC: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği

KCl: Potasyum klorür

KH_2PO_4: Potasyum dihidrojen fosfat

$K_3[Fe(CN)_6]$: Potasyum ferrisiyanür

$K_4[Fe(CN)_6]$: Potasyum ferrosiyanür

LOD: Tayin sınırı

MnO_2: Mangan dioksit

NaCl: Sodyum klorür

NAD^+: Nikotinamid adenin dinükleotit

Na_2HPO_4: Disodyum hidrojen fosfat

PGE: Kalem Grafit Elektrot

Pt: Platin

R^2: Doğrusallık Katsayısı

±S.S.: Standart Sapma

SEM: Taramalı elektron mikroskobu

SiO_2: Silisyum dioksit

Sn: Kalay

SPCE: Yüzey Baskılı Karbon Elektrot

SPR: Yüzey plazmon rezonans biyosensörleri

PET: Polietilentereftalat

TiO_2: Titanyum dioksit

TÜTAGEM: Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Biyosensör çalışma prensibi 4
Şekil 2.2. Dönüştürücünün çeşidine göre elektrokimyasal biyosensörlerin sınıflandırılması 9
Şekil 2.3. Elektrokimyasal biyosensörlerin biyolojik tanıma unsuruna göre sınıflandırılması 11
Şekil 2.4. CV ile elde edilen voltamogram örneği 14
Şekil 2.5. Kronoamperometri ile elde edilen spektrum örneği 15
Şekil 2.6. Randles sanal devresi 16
Şekil 2.7. Nyquist eğrisi 16
Şekil 2.8. Üç elektrotlu elektrokimyasal hücre 17
Şekil 2.9. Elektrokimyasal biyosensörlerde kullanılan çalışma elektrotlarının genel sınıflandırılması 19
Şekil 2.10. Karbon elektrot çeşitleri. (A) Karbon pasta elektrodu (CPE), (B) Kalem grafit elektrot (PGE), (C) Yüzey baskılı karbon elektrot (SPCE), (D) Camsı karbon elektrot (GCE) 20
Şekil 2.11. Camsı karbon elektrot 21
Şekil 2.12. Yüzey baskılı karbon elektrot 21
Şekil 2.13. Kalem grafit elektrot ve grafit elektrodun yüzeyinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmesi 22
Şekil 2.14. Karbon pasta elektrot ve bileşenleri 23
Şekil 2.15. Karbon pasta elektrotların hazırlanmasına ilişkin genel şema 24
Şekil 2.16. Formlabs 3 + üç boyutlu yazıcı 30
Şekil 2.17. Üç boyutlu nesnenin elde edilme aşamaları 31
Şekil 2.18. Üç boyutlu baskının kullanım alanları 32
Şekil 3.1. Üç boyutlu yazıcıda üretilen çalışma elektrodu başlıklarının teknik çizimi 39
Şekil 3.2. Üç boyutlu yazıcıda üretilen çalışma elektrodu başlıkları (A: Üretim öncesi SolidWorks programında tasarımı, B: Üretim sonrası hali 39

Şekil 3.3. Grafit tozunu elde etmek amacıyla kullanılan bilyalı değirmen (VWR ®, Star-Beater; Leuven, Belçika).....41
Şekil 3.4. Çalışmada kullanılan karbon pasta çalışma elektrodunun hazırlanması.....42
Şekil 3.5. Tasarlanan biyosensörler ile yapılan ölçümlerde kullanılan düzenek 43
Şekil 3.6. Üçlü elektrot sistemi 43
Şekil 3.7. Prob redoks çözeltisi içerisindeki üçlü elektrot sistemi.....47
Şekil 4.1. Tasarlanan biyosensördeki karbon pasta çalışma elektrodunun potansiyostat bağlantısını oluşturan tellerin için (SEM) görüntüleri (A: Altın tel, B: Bakır tel, C: Kalay kaplı bakır tel, D: Platin tel).....48
Şekil 4.2. Tasarlanan biyosensördeki karbon pasta çalışma elektrodunun potansiyostat bağlantısını oluşturan altın telin EDX spektrumları ve sonuçları 49
Şekil 4.3. Tasarlanan biyosensördeki karbon pasta çalışma elektrodunun potansiyostat bağlantısını oluşturan bakır telin EDX spektrumları ve sonuçları 50
Şekil 4.4. Tasarlanan biyosensördeki karbon pasta çalışma elektrodunun potansiyostat bağlantısını oluşturan kalay kaplı bakır telin EDX spektrumları ve sonuçları 50
Şekil 4.5. Tasarlanan biyosensördeki karbon pasta çalışma elektrodunun potansiyostat bağlantısını oluşturan platin telin EDX spektrumları ve sonuçları 51
Şekil 4.6. Kateşol varlığı ve yokluğunda elde edilen döngüsel voltamogramlar.....52
Şekil 4.7. Altın tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün kronoamperometri grafiği.....53
Şekil 4.8. Bakır tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün kronoamperometri grafiği 54
Şekil 4.9. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün kronoamperometri grafiği 54
Şekil 4.10. Platin tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün kronoamperometri grafiği..55
Şekil 4.11. Altın tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün kalibrasyon grafiği.....56
Şekil 4.12. Bakır tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün kalibrasyon grafiği 57
Şekil 4.13. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün kalibrasyon grafiği 57
Şekil 4.14. Platin tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün kalibrasyon grafiği.....58
Şekil 4.15. Altın tel kullanılarak hazırlanan 1. biyosensörün kalibrasyon grafiği.....59
Şekil 4.16. Altın tel kullanılarak hazırlanan 2. biyosensörün kalibrasyon grafiği.....59
Şekil 4.17. Altın tel kullanılarak hazırlanan 3. biyosensörün kalibrasyon grafiği.....60
Şekil 4.18. Altın tel kullanılarak hazırlanan 4. biyosensörün kalibrasyon grafiği.....60

Şekil 4.19. Altın tel kullanılarak hazırlanan 5. biyosensörün kalibrasyon grafiği.....61
Şekil 4.20. Altın tel kullanılarak hazırlanan 6. biyosensörün kalibrasyon grafiği.....61
Şekil 4.21. Altın tel kullanılarak hazırlanan 7. biyosensörün kalibrasyon grafiği.....62
Şekil 4.22. Altın tel kullanılarak hazırlanan 8. biyosensörün kalibrasyon grafiği.....62
Şekil 4.23. Altın tel kullanılarak hazırlanan 9. biyosensörün kalibrasyon grafiği.....63
Şekil 4.24. Altın tel kullanılarak hazırlanan 10. biyosensörün kalibrasyon grafiği.....63
Şekil 4.25. Tasarlanan biyosensördeki karbon pasta çalışma elektrodunun potansiyostat bağlantısını oluşturan altın tel ile yapılan 10 farklı çalışmanın tek bir kalibrasyon grafiği üzerinde gösterilmesi 64
Şekil 4.26. Bakır tel kullanılarak hazırlanan 1. biyosensörün kalibrasyon grafiği 66
Şekil 4.27. Bakır tel kullanılarak hazırlanan 2. biyosensörün kalibrasyon grafiği 66
Şekil 4.28. Bakır tel kullanılarak hazırlanan 3. biyosensörün kalibrasyon grafiği 67
Şekil 4.29. Bakır tel kullanılarak hazırlanan 4. biyosensörün kalibrasyon grafiği 67
Şekil 4.30. Bakır tel kullanılarak hazırlanan 5. biyosensörün kalibrasyon grafiği 68
Şekil 4.31. Bakır tel kullanılarak hazırlanan 6. biyosensörün kalibrasyon grafiği 68
Şekil 4.32. Bakır tel kullanılarak hazırlanan 7. biyosensörün kalibrasyon grafiği 69
Şekil 4.33. Bakır tel kullanılarak hazırlanan 8. biyosensörün kalibrasyon grafiği 69
Şekil 4.34. Bakır tel kullanılarak hazırlanan 9. biyosensörün kalibrasyon grafiği 70
Şekil 4.35. Bakır tel kullanılarak hazırlanan 10. biyosensörün kalibrasyon grafiği 70
Şekil 4.36. Tasarlanan biyosensördeki karbon pasta çalışma elektrodunun potansiyostat bağlantısını oluşturan bakır tel ile yapılan 10 farklı çalışmanın tek bir kalibrasyon grafiği üzerinde gösterilmesi 71
Şekil 4.37. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan 1. biyosensörün kalibrasyon grafiği 73
Şekil 4.38. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan 2. biyosensörün kalibrasyon grafiği 73
Şekil 4.39. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan 3. biyosensörün kalibrasyon grafiği 74
Şekil 4.40. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan 4. biyosensörün kalibrasyon grafiği 74
Şekil 4.41. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan 5. biyosensörün kalibrasyon grafiği 75

Şekil 4.42. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan 6. biyosensörün kalibrasyon grafiği 75
Şekil 4.43. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan 7. biyosensörün kalibrasyon grafiği 76
Şekil 4.44. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan 8. biyosensörün kalibrasyon grafiği 76
Şekil 4.45. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan 9. biyosensörün kalibrasyon grafiği 77
Şekil 4.46. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan 10. biyosensörün kalibrasyon grafiği 77
Şekil 4.47. Tasarlanan biyosensördeki karbon pasta çalışma elektrodunun potansiyostat bağlantısını oluşturan kalay kaplı bakır tel ile yapılan 10 farklı çalışmanın tek bir kalibrasyon grafiği üzerinde gösterilmesi 78
Şekil 4.48. Platin tel kullanılarak hazırlanan 1. biyosensörün kalibrasyon grafiği 80
Şekil 4.49. Platin tel kullanılarak hazırlanan 2. biyosensörün kalibrasyon grafiği 80
Şekil 4.50. Platin tel kullanılarak hazırlanan 3. biyosensörün kalibrasyon grafiği 81
Şekil 4.51. Platin tel kullanılarak hazırlanan 4. biyosensörün kalibrasyon grafiği 81
Şekil 4.52. Platin tel kullanılarak hazırlanan 5. biyosensörün kalibrasyon grafiği 82
Şekil 4.53. Platin tel kullanılarak hazırlanan 6. biyosensörün kalibrasyon grafiği 82
Şekil 4.54. Platin tel kullanılarak hazırlanan 7. biyosensörün kalibrasyon grafiği 83
Şekil 4.55. Platin tel kullanılarak hazırlanan 8. biyosensörün kalibrasyon grafiği 83
Şekil 4.56. Platin tel kullanılarak hazırlanan 9. biyosensörün kalibrasyon grafiği 84
Şekil 4.57. Platin tel kullanılarak hazırlanan 10. biyosensörün kalibrasyon grafiği 84
Şekil 4.58. Tasarlanan biyosensördeki karbon pasta çalışma elektrodunun potansiyostat bağlantısını oluşturan platin tel ile yapılan 10 farklı çalışmanın tek bir kalibrasyon grafiği üzerinde gösterilmesi 85
Şekil 4.59. Altın, bakır, kalay kaplı bakır ve platin tel kullanılarak hazırlanan karbon pasta çalışma elektrotlarının impedans analizine ait grafikler (A: Altın tel için, B: Bakır tel için, C: Kalay kaplı bakır için, D: Platin tel için) 89

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Çeşitli karbonhidratların tespiti için karbon pasta çalışma elektrot biyosensörleri 25
Çizelge 2.2. Çeşitli organik bileşiklerin tespiti için karbon pasta çalışma elektrot biyosensörleri 26
Çizelge 2.3. Çeşitli inorganik analitlerin tespiti için kullanılan karbon pasta çalışma elektrot biyosensörleri 28
Çizelge 4.1. Altın tel kullanılarak hazırlanan 10 farklı biyosensörün doğrusallık katsayıları, doğru denklemleri ve tayin aralıkları 65
Çizelge 4.2. Bakır tel kullanılarak hazırlanan 10 farklı biyosensörün doğrusallık katsayıları, doğru denklemleri ve tayin aralıkları 72
Çizelge 4.3. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan 10 farklı biyosensörün doğrusallık katsayıları, doğru denklemleri ve tayin aralıkları 79
Çizelge 4.4. Platin tel kullanılarak hazırlanan 10 farklı biyosensörün doğrusallık katsayıları, doğru denklemleri ve tayin aralıkları 86
Çizelge 4.5. Altın tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün tekrarlanabilirliği 87
Çizelge 4.6. Bakır tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün tekrarlanabilirliği..... 87
Çizelge 4.7. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün tekrarlanabilirliği 88
Çizelge 4.8. Platin tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün tekrarlanabilirliği 88
Çizelge 4.9. Geliştirilen biyosensörlerin literatürde yer alan kateşol tayinine yönelik diğer biyosensörler ile kıyaslanması 91

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Literatürde, kanda, diğer vücut sıvılarında, çeşitli bitkilerde ve gıdalarda bulunan protein, hormon, fenolik bileşik, çeşitli alkoller, pestisitler ve benzeri diğer birçok molekülün tayini için farklı tespit tekniklerine dayanan biyosensörler yer almaktadır. Bu tekniklerden en çok tercih edilenleri amperometri, voltametri ve impedimetri gibi elektrokimyasal yöntemlerdir (Ozcan & Sezginturk, 2015, Wang vd., 2014). Geliştirilecek olan biyosensörde, tespit edilmesi istenilen biyomolekül ve bu molekülün biyosensör ile tayini sırasında oluşan biyokimyasal reaksiyon göz önüne alınarak farklı tipte çalışma elektrotları tercih edilebilir. Katı (altın, camsı karbon, platin vb.) elektrotlar, karbon pasta elektrotlar, yüzey-baskılı elektrotlar, indiyum kalay oksit (ITO) temelli elektrotlar en yaygın olarak kullanılanlara örnektirler (Henao-Escobar vd., 2013, Sezginturk & Uygun, 2012, Tahir vd., 2008).

Katı elektrotlar yüksek tekrarlanabilirliklerinin yanı sıra uzun kullanım ömrü vaat ederlerken, biyosensör hazırlık aşamalarında altın yüzeylerinin mekanik temizlik gerektirmeleri, bu elektrotlarla hazırlanan biyosensörlerin tekrar üretilebilirliklerinde sorunlara sebep olabilmektedir. Bunun dışında katı elektrotlar yüksek maliyetlidir. İndiyum kalay oksit temelli elektrotlar, iyi iletkenlik, iyi optik geçirgenlik ve diğer elektrot türlerine görece düşük maliyetlerinden dolayı biyosensör çalışmalarında sıkça yer almaktadır. Fakat indiyum kalay oksit filmin üzerinde yer aldığı hassas (genellikle polietilentereftalat, PET) platformun şekil verme/kesme esnasında ITO film yüzeyinde bozulmalara/kopmalara sebep olması, bu elektrotlarla üretilen biyosensörlerin tekrar üretilebilirliklerini olumsuz yönde etkilemektedir. Bunun yanı sıra çalışma yüzeyinin ölçüm hücresi içerisine giren kısmından potansiyostata bağlanan kısmına kadar tamamen ITO film ile kaplı olması her ölçüm esnasında tekrarlanabilirlik problemlerini de

beraberinde getirmektedir. Yüzey baskılı elektrotlar, ITO elektrotlarla beraber tek kullanımlık biyosensör çalışmalarında ön sıralarda yer almaktadırlar (Alvarado-Gámez vd., 2014, Huang vd., 2009, Laschi vd., 2008, Noguer vd., 1999). Katı elektrotlara göre daha düşük maliyette olmaları, küçük boyutta olmalarının biyosensör çalışmalarında kullanım kolaylığı sağlaması, birçok türde (altın, karbon, grafen) çalışma yüzeyine sahip çeşitlerinin olması, bazı modellerinde referans elektrot, karşıt elektrot ve çalışma elektrotlarının tek bir yüzey üzerinde beraber bulunmaları yüzey baskılı elektrotların en büyük avantajlarındandır. 50-75 adetlik paketlerde satılan yüzey baskılı elektrotlar, yapılarındaki çalışma yüzeyi materyallerine göre 5-7 $/adet maliyete sahiptirler. Fakat satılan farklı paketler içerisindeki elektrotların çalışma yüzeylerinin birbirleriyle tutarsızlık göstermesi ve çalışma yüzeyleri üzerinde gözle görülemeyecek boyutta çatlaklar/yırtıklar barındırmaları bu elektrotların en önemli dezavantajlarındandır.

Ticari olarak temin edilen karbon pasta elektrotlar ise özellikle enzim ve doku temelli biyosensör tasarımları için tercih edilmekte olup, biyobileşeni içeren dolgu materyali enzim ve dokuların yanı sıra, destek, iletkenlik ve geçirgenlik amacıyla kullanılan bileşenleri de içermektedir. Her çalışmadan sonra bu dolgu materyalinin temizliği bu elektrotların en büyük dezavantajıdır. Temizlik sonrası dolgu maddesinin yer aldığı elektrot boşluğunda safsızlıkların kalması bir sonraki biyosensör hazırlığında sorunlara neden olmakta ve tekrarlanabilir sonuçların elde edilmesini engellemektedir.

Bu çalışma kapsamında, karbon pasta çalışma elektrotlarına alternatif olabilecek çok düşük maliyetli, tek kullanımlık karbon pasta elektrot başlıkları SolidWorks yazılımı ile tasarlandı. Üretilmesine karar verilen en iyi tasarım Formlabs 3+ Üç Boyutlu Yazıcı ile basıldı. Basılan başlıkların potansiyostat bağlantıları altın, platin, bakır ve kalay kaplı bakır teller vasıtasıyla sağlandı ve bu iletken tel çeşitlerinin biyosensörde çalışma elektrodu olarak kullanımları gösterildi.

BÖLÜM 2

KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Biyosensörler

L.C. Clark'ın Cincinnati Hastanesi'nde çalıştığı dönemde (Ohio, ABD) 1950'li yıllarının ortalarında bir ameliyat sırasında kandaki O_2 oranının elektrot yardımıyla gözlenmesiyle ilk biyosensör çalışması ortaya çıkmıştır (Clark, 1956). Clark ve arkadaşı Lyons, 1962 yılında glukoz oksidaz enzimini O_2 elektrodu ile birleştirerek kanın glukoz seviyesini ölçmeyi başarmışlardır (Clark & Lyons 1962).

Biyosensörler, fizikokimyasal dönüştürücüler veya dönüştürücü mikrosistemler ile birleştirilmiş biyolojik bileşenler içeren cihazlardır ve analitik veri sağlamak amacıyla kullanılırlar (Malhotra vd., 2005).

Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC), biyosensörün tanımını "izole enzimleri, bağışıklık sistemlerini, dokuları, organelleri veya tüm hücrelerin aracılık ettiği spesifik biyokimyasal tepkimeleri, genellikle elektriksel, termal veya optik sinyallerle kimyasal bileşikleri tespit etmek için kullanan bir cihaz" olarak yapmaktadır (Griesche & Baeumner, 2020).

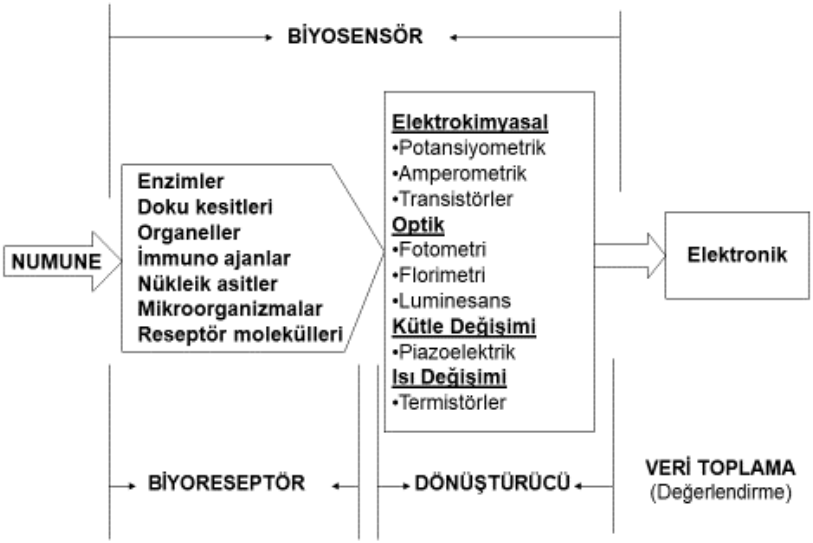
Biyosensörlerin amacı, analiz edilecek madde miktarını elektrik sinyaline dönüştürmektir. Bu cihazlar, yüksek hassasiyet, ekonomik maliyet, düşük enerji gereksinimi ve basitlik gibi avantajlarla, canlı organizmalardaki moleküllerin tespitinde kritik bir rol üstlenirler.

Biyosensörler genel olarak iki kısımdan oluşur;

- Reseptör
- Dönüştürücü

Eğer reseptör olan kısım biyomoleküller yapıda ise biyoreseptör olarak adlandırılır. Biyoreseptörler analitlerin tanıma işlemini yapan biyomoleküllerdir. Çeşitli biyomoleküller biyoreseptör olarak kullanılabilir; ancak en yaygın tercih edilen biyomolekül türleri enzimlerdir. Dönüştürücüler ise, reseptörün analiti tanıma sürecinden sonra ürettiği fiziksel veya kimyasal sinyali elektrik sinyaline dönüştüren yapılardır (Mohanty & Kougianos, 2006).

Örnek veya analiz çözeltisi ile biyolojik bileşen arasında bir biyokimyasal etkileşim meydana gelir. Bu etkileşim sonucunda ortaya çıkan sinyaller, bir dedektör (dönüştürücü) aracılığıyla elektrik sinyaline çevrilir. Elde edilen elektrik sinyali, okunarak kalitatif veya kantitatif analizler gerçekleştirilir. Böylece biyosensörler, spesifik analitleri tespit etmek ya da miktarlarını belirlemek için kullanılabilir (Erol, 2020).



Şekil 2.1. Biyosensör çalışma prensibi (Telefoncu, 2008)

Biyosensörlerde biyoreseptör olarak; enzimler, mikroorganizmalar, reseptörler, bitkisel ve hayvansal dokular, antikorlar ve nükleik asitler gibi farklı bileşenler kullanılabilir. Analit ile etkileşim sonucunda meydana gelen elektrokimyasal, optik, termal ve gravimetrik sinyallerin elektriksel sinyale dönüştürülebilmesi için uygun bir

dönüştürücü, analiz edilecek moleküle uygun bir biyoreseptör seçilmelidir (Durmaz, 2016).

Tüm canlılar, vücutlarında bulunan doğal sensörler ile çevreleriyle sürekli etkileşim halindedir. Canlı vücudunda bulunan organik ve inorganik grupların dengesi bozulduğunda veya vücuda yabancı bir madde girdiğinde çeşitli hastalıklara yol açılabilmektedir. Vücutta bulunan türlerin miktarlarında bir değişiklik meydana geldiğinde, canlı vücudu doğal sensörleriyle bu durumu tespit etmekte ve tepki vermektedir. Bu sebeple canlı vücudunun bütün olarak bir biyosensör işlevinde olduğu görülmektedir (Klonoff, 2005).

Biyosensör çalışmalarının sayısı, her geçen gün hızla artmaktadır. Bu çalışmaların hızla yaygınlaşmasının temel nedenleri, biyosensörlerin küçük boyutlu olmaları, geniş bir uygulama alanına sahip olmaları, kısa sürede doğru sonuçlar verebilmeleri ve maliyetlerinin diğer analitik sistemlere kıyasla düşük olmasıdır (Nice & Catimel, 1999).

İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler vardır. Bu özellikler (Dinçkaya, 1999):

1. Seçimlilik: Biyosensörün en temel özelliklerden biridir. İdeal bir biyosensör, hedef analite karşı yüksek seçimlilik göstermelidir. Doğru analiz sonuçlarının elde edilmesindeki temel şart biyoreseptörün en az sayıda moleküle seçimli davranmasıyla sağlanabilir.

2. Kullanım Ömrü: Biyosensörün kullanım ömrünün azalmasındaki en kritik etken, biyoreseptör ve biyoreseptörün elektroda yerleşimini sağlayan bağlayıcı moleküllerin yapılarının bozulmasıdır. Elektrot yüzeyindeki/içindeki bu bozulmalar biyosensörün kullanım ömrü ile direkt ilişkilidir. Bu durum biyosensörün özellikle tekrarlanabilirlik, kararlılık ve kalibrasyon gibi temel özelliklerini de etkilemektedir.

3. Kalibrasyon Gereksinimi: İdeal bir biyosensörde, kalibrasyon gereksinimine ihtiyaç olmamasına ya da en az biçimde kalibrasyon gereksinimine ihtiyaç olması istenir. Ancak bu durum pratikte gerçekleştirilememiş olup yapılan ölçümler süresince cihazların düzenli olarak kalibre edilmesi gerekmektedir.

4. Tekrarlanabilirlik: İdeal bir biyosensörde, aynı koşullar altında yapılan çok tekrarlı analizlerde benzer sonuçların elde edilmesi yani tekrarlanabilir analit tespiti en önemli unsurlardandır.

5. Yüksek duyarlılık: İdeal bir biyosensörün, en önemli özelliklerinden biridir. Biyoreseptörün tespit edilecek analitin mümkün olan en düşük derişimine karşı bile seçici olmasıdır.

6. Geniş Ölçüm Aralığı: Biyosensör çalışmalarında ölçüm aralığı; biyosensör cevabı-derişim grafiğindeki eğrilerinin doğrusal olduğu derişim aralığıdır. İdeal bir biyosensörde geniş bir tayin aralığı olmalıdır. Bu özellik, biyosensörün çeşitli derişimlerde doğru tepkiler verebilme yeteneğini gösterir.

7. Hızlı Yanıt Zamanı: İdeal bir biyosensörde yanıt süresi ölçüm işleminden sonra biyosensör cevabı-zaman eğrilerinden belirlenir.

8. Hızlı Geriye Dönme Zamanı: İdeal bir biyosensörde geriye dönme zamanı, ilk örnekten ne kadar süre sonra diğer örneğin ölçülebileceğini belirleyerek bulunabilir.

9. Basitlik ve Ucuzluk: İdeal bir biyosensör olması için dizaynı basit ve ucuz, kullanımı ise kolay olmalıdır (Dinçkaya, 1999).

2.2. Biyosensör Çeşitleri

Biyosensörler reseptör ve dönüştürücü türüne göre sınıflandırılabilir. Dönüştürücü türüne göre biyosensörler optik biyosensörler, termal biyosensörler, kütle duyarlı biyosensörler ve elektrokimyasal biyosensörler olarak sınıflandırılabilir.

2.2.1. Optik biyosensörler

Ölçülen ve dönüştürülen sinyal, ışıktır. Optik biyosensörler, floresans, optik difraksiyon veya yüzey plazmon rezonans (SPR) temelli olabilir. Floresans, seçiciliği ve hassasiyeti nedeniyle biyosensörlerde sıkça kullanılır. Floresans tabanlı bir cihaz, elektromanyetik radyasyon emisyonundaki frekans değişimini tespit eder; bu değişim, önceki radyasyon emilimi ve çok kısa süreli bir uyarılmış durumun oluşumu ile meydana gelir (Velasco-Garcia, 2009).

Optik difraksiyon tabanlı cihazlarda kovalent bağlarla kaplanmış bir proteine sahip bir silisyum levha kullanır. Levha, bir foto maskeden UV ışığına maruz kalır ve böylece, maruz kalan bölgelerdeki antikorlar inaktive edilir. Analit içinde inkübe edilen levha parçalarında aktif bölgelerde antijen-antikor bağları oluşur. Bu, lazer veya diğer ışık kaynaklarıyla aydınlatıldığında bir difraksiyon sinyali üreten bir kırınım ağı oluşturulmasını sağlar. Elde edilen sinyal, daha sonra amplifiye edilebilir veya doğrudan ölçülebilir (Mohanty & Kougianos, 2006).

Yüzey plazmon rezonans (SPR) biyosensörleri, çözeltideki bir analit ile SPR sensör yüzeyinde immobilize edilmiş bir biyobileşen arasındaki etkileşimlerini izleyen optik sensörlerdir. Bu tür biyosensörlerin ana uygulama alanı, biyolojik analizler ve biyomoleküler etkileşimlerin analizleridir. SPR biyosensörleri, etiket gerektirmeyen ve gerçek zamanlı analiz teknolojisi avantajı sağlar (Homola, 2003).

2.2.2. Termal biyosensörler

Termal biyosensörler, biyomoleküllerin sıcaklık sensörlerine immobilizasyonu ile oluşturulur. Analit biyobileşenle temas ettiğinde, analit derişimi ile orantılı olan reaksiyon ısısı ölçülür. Üretilen veya absorbe edilen toplam ısı, reaksiyondaki molar entalpiyle ve toplam molekül sayısıyla orantılıdır. Sıcaklık ölçümü, termistör kullanılarak yapılır. Termal biyosensörler, sıklıkla kalibrasyon gerektirmez ve örneğin optik veya elektrokimyasal özelliklerinden etkilenmez (Mohanty & Kougianos, 2006). Termal biyosensörler, gıda, kozmetik, ilaç ve diğer bileşen analizlerinde kullanılmıştır (Antonelli vd., 2008; Bhand vd., 2010; Ramanathan vd., 2001; Vermeir vd., 2007).

2.2.3. Kütle duyarlı biyosensörler

Kütle duyarlı biyosensörlerin bir diğer adı piezoelektrik biyosensörlerdir. Bu biyosensörler, biyobileşenin piezoelektrik bir bileşenle, genellikle altın elektrotlarla kaplı bir kuvars kristali ile birleştirilmesine dayanır. Kuvars, turmalin, lityum niyobat veya tantal, yönlendirilmiş çinko oksit veya alüminyum nitrit gibi bazı maddeler piezoelektrik etki gösterirler (Cooper, 2003). Piezoelektrik dönüştürücüler, moleküllerin etiketsiz olarak tespit edilmesini sağlar (Janshoff vd., 2000). Piezoelektrik malzeme, yüzeydeki kütle değişimine hassastır. Molekül bağlandığında titreşim veya frekansı değişir ve bu değişiklik elektriksel olarak ölçülerek kristalin ek kütlesi (pozitif veya negatif) belirlenir

(Vo-Dinh & Cullum, 2000). Piezoelektrik cihazların uygulamalarına yönelik büyük bir ilgi vardır; gıda, çevre ve klinik analizlerde potansiyel uygulamalara sahiptir (Tombelli vd., 2005).

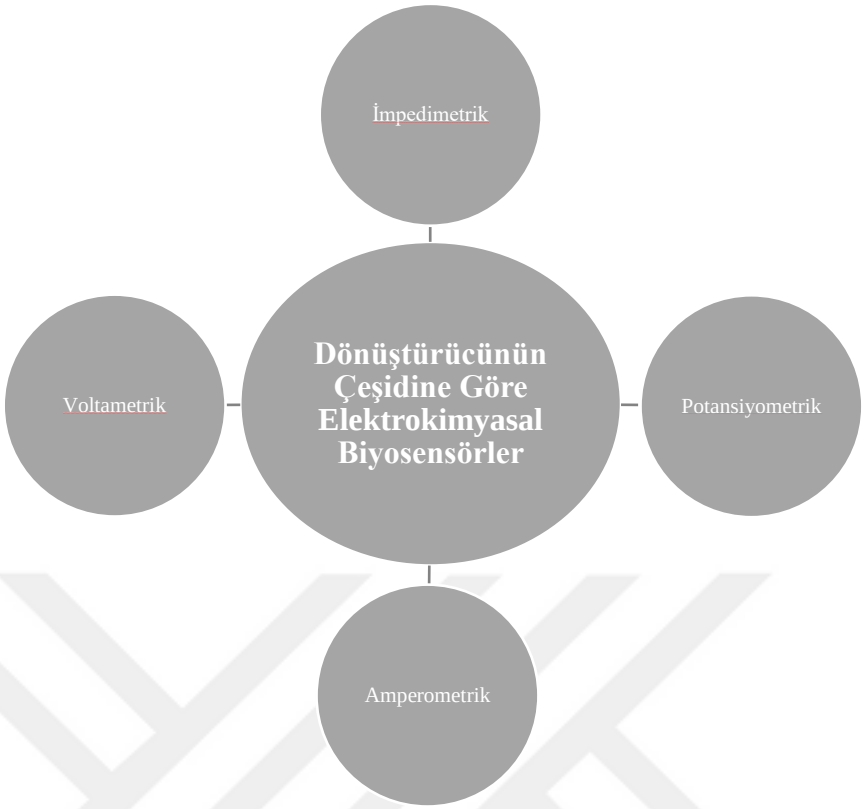
2.2.4. Elektrokimyasal biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler genellikle bir referans elektrot, karşıt elektrot ve çalışma elektrodundan oluşan sistemlerdir. Elektrotların iletkenlik ve kimyasal özelliklerinin kararlı olması gerekmektedir. Bu nedenle altın, platin gibi malzemeler en çok tercih edilen elektrotlar arasında yer alır (Akolpoğlu vd., 2019).

Elektrokimyasal biyosensörler; hızlı, maliyeti düşük, yüksek hassasiyetli ve tekrarlanabilir oldukları için yaygın olarak tercih edilmektedir (Mittal vd., 2017). Elektrokimyasal biyosensörlerin çalışma prensibi, analiti spesifik bir şekilde algılamak ve meydana gelen etkileşim ürününün ölçülebilir bir sinyale dönüşmesini sağlamaktır (Lakshmipriya & Gopinath, 2019).

2.2.4.1. Dönüştürücünün Çeşidine Göre Elektrokimyasal Biyosensörler

Dönüştürücünün çeşidine göre elektrokimyasal biyosensörler 4 grupta incelenebilir. Şekil 2.2'de dönüştürücünün çeşidine göre elektrokimyasal biyosensörlerin türleri gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Dönüştürücünün çeşidine göre elektrokimyasal biyosensörlerin sınıflandırılması

2.2.4.1.1. Amperometrik biyosensörler

Amperometrik biyosensörler, değişen akım miktarına dayalı olarak kesin nicel analiz bilgileri sunan sistemlerdir. Genellikle bu biyosensörlerin, potansiyometrik biyosensörlere benzer reaksiyon süreleri, tayin aralıkları ve hassasiyetleri vardır. Amperometrik biyosensörlerde, sensörün başlangıç ve çıkış akımı tespit edilir ve algılama süreci için kullanılır. Analiz, farklı analit derişimleri için elde edilen akım değerlerinin karşılaştırılmasıyla yapılır (Singh vd., 2021).

2.2.4.1.2. Potansiyometrik biyosensörler

Potansiyometrik biyosensörlerde ölçümler, modifiye edilmiş çalışma elektrodu ile referans elektrodunun arasındaki gerilim farkının ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Bu gerilim farkı, analitin varlığı ve derişiminin belirlenmesi için kullanılır (Özbek & Isildak, 2021). Çalışma elektrodu olarak cam elektrotlar, metal oksit bazlı sensörler ve

iyon seçici elektrotlar kullanılabilir. Ayrıca, son yıllarda bulnlara silikon veya kalın film elektrotlarda eklenmiştir (Koncki, 2007).

2.2.4.1.3. İmpedimetrik biyosensörler

İmpedimetrik biyosensörlerin bir diğer adı kondüktometrik biyosensörlerdir. İmpedimetrik bir biyosensör, biyolojik tanıma elemanlarının bir elektrot yüzeyine immobilize edilmesiyle oluşturulur. Bu sensör, hedeflenen analiti ölçüm ve/veya izleme yoluyla, analit aktivitesiyle orantılı bir elektriksel empedans sinyali çıktısı vererek raporlar. Bu yöntemde en yaygın kullanılan teknik, elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) yöntemidir (Maalouf vd., 2007).

İmpedimetrik biyosensörlerde, elektrot yüzeyinde antikorların bağlanması için amino, karboksil gibi gruplar oluşturmak önemlidir. Bu, biyosensörün kararlılığını ve tekrarlanabilirliğini sağlamak için en kritik adımdır. Bu amaçla nanomalzemeler de kullanılmaktadır. Antijenler kullanılarak antikor tespit edildiğinde, elektron transfer direnci artar ve bu da kapasitansın azalmasına yol açar (Sharma vd., 2021).

2.2.4.1.4. Voltametrik biyosensörler

Voltametrik biyosensörlerde, potansiyelin değiştirilmesi sonucu meydana gelen akımın ölçülmesi ile analit hakkında bilgi elde edilir. Bu biyosensörler, elektrokimyasal özelliklerin belirlenmesi için kullanılır. Döngüsel voltametri, sıklıkla kullanılan voltametrik yöntemlerden biridir. Bu yöntem, analit çözeltilerinin redoks potansiyeli ve elektrokimyasal reaksiyon hızlarının ölçüm sonuçlarını bulmamıza yardımcı olur (Grieshaber vd., 2008; Naresh vd., 2021).

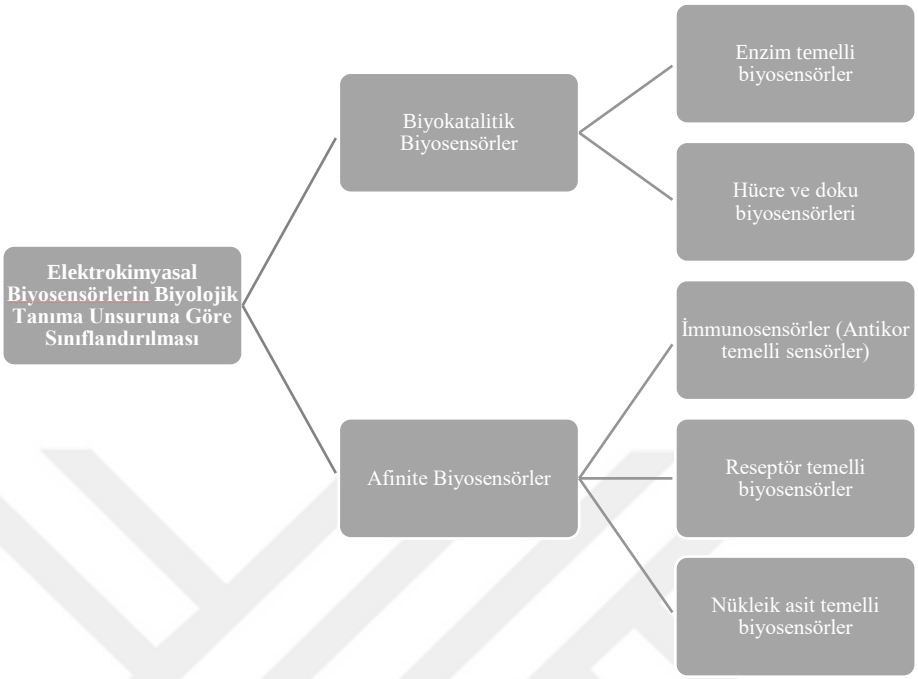
2.2.4.2. Elektrokimyasal Biyosensörlerin Biyolojik Tanıma Unsuruna Göre Sınıflandırılması

Elektrokimyasal biyosensörler biyolojik tanıma unsuruna göre kendi içinde alt sınıflara ayrılan iki ana sınıfa ayrılır:

1-Biyokatalitik biyosensörler

2-Afinite biyosensörleri

Şekil 2.3'te elektrokimyasal biyosensörlerin biyolojik tanıma unsuruna göre sınıflandırılması gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Elektrokimyasal biyosensörlerin biyolojik tanıma unsuruna göre sınıflandırılması

2.2.4.2.1. Biyokatalitik biyosensörler

Biyokatalitik biyosensörlerde reseptör olarak enzimler, bakteriler, hücreler ve dokular gibi biyolojik unsurlar kullanılır. Biyokatalitik biyosensörler, enzim temelli biyosensörler ve hücre/doku biyosensörleri olmak üzere iki gruba ayrılır.

- Enzim temelli biyosensörler:

Enzimler, canlı organizmalarda gerçekleşen kimyasal reaksiyonları katalizleyen moleküllerdir. Bu katalizörler, dönüşüme uğratacağı substratına karşı yüksek aktivitenin yanı sıra yüksek seçicilik özelliğini de taşırlar. Bu sebeple, enzimler birçok farklı uygulama alanında tanıma elemanı olarak kullanılırlar. Enzim temelli biyosensörler, uygun bir çalışma elektrodu yüzeyine enzimlerin immobilize edilmesiyle oluşturulurlar. Uygun elektrodun seçimi, temel olarak biyotanıma elemanı olarak kullanılacak olan

enzimin katalizlediği reaksiyona göre yapılır. Enzim temelli biyosensörlerin kararlılığı, immobilizasyon yöntemiyle direkt ilişkilidir. Enzimin kaçışını engelleyen bir immobilizasyon prosedürü kararlı bir biyosensörün oluşumuna olanak sağlar (Erol, 2020).

- Hücre ve doku biyosensörleri:

Hücre ve doku biyosensörleri; Bazı enzimlerin saf halde bulunmaması, kaynağından izole edilirken aktivitelerinin azalması ve saflaştırma basamaklarının yüksek maliyetli olması nedeniyle, hücre ve çeşitli bitkisel, hayvansal dokular kullanılarak hazırlanan biyosensör sistemleridir. Bu tür hücre ve doku temelli biyosensörler, enzim temelli biyosensörlerle benzer özellikler taşır. Enzim temelli biyosensörlere göre en önemli avantajı enzimin doğal ortamıyla beraber elektrot yüzeyine immobilize edilmesine olanak tanımasıdır. Hücrede bulunan enzimler, belirlenecek olan türü ya tüketebilir ya da üretebilir. Örneğin, muz dokuları genellikle polifenol oksidaz enzimi açısından zengindir ve karbon pasta matrisine karıştırılarak elektrot yüzeyine immobilize edilir. Böylece biyosensör uygulamaları için uygun biyolojik tanıma elemanı sağlanmış olur (Erol, 2020).

2.2.4.2.2 Afinite biyosensörleri

Afinite biyosensörleri, belirli biyomoleküllerin hedef analite seçici olarak bağlanması için kullanılır ve hedef analitin bağlanma sürecinin sonunda meydana gelen elektrokimyasal sinyal değişimlerini ölçer. Afinite biyosensörleri, yüksek seçiciliği ve duyarlılığı olan sistemleri tasarlamaya olanak sağlar (Şiranlı, 2016).

İmmünosensörler (antikor temelli sensörler), reseptör temelli biyosensörler ve nükleik asit temelli biyosensörler olmak üzere üç gruba ayrılırlar:

- İmmunosensörler:

İmmünosensörler (anitkor temelli sensörler), bağlanma ya da yer değiştirme olayının sonucunda meydana gelen antikor/antijen kompleksindeki doğrudan değişikliğin kaydedilmesi temeline dayanır. İmmünosensörler genellikle tersinmez hal değişiminde olup maliyetleri yüksektir (Şiranlı, 2016).

-Reseptör temelli biyosensörler:

Reseptörler, protein yapısına sahip biyolojik makromoleküllerdir. Hücre membranında, hedef analiti bağlayıcı olarak görev yaparlar. Bu bağlanma olayının sonucunda, membranda oluşan iletkenliğin değişimi ölçülerek analizler gerçekleştirilir (Şiranlı, 2016).

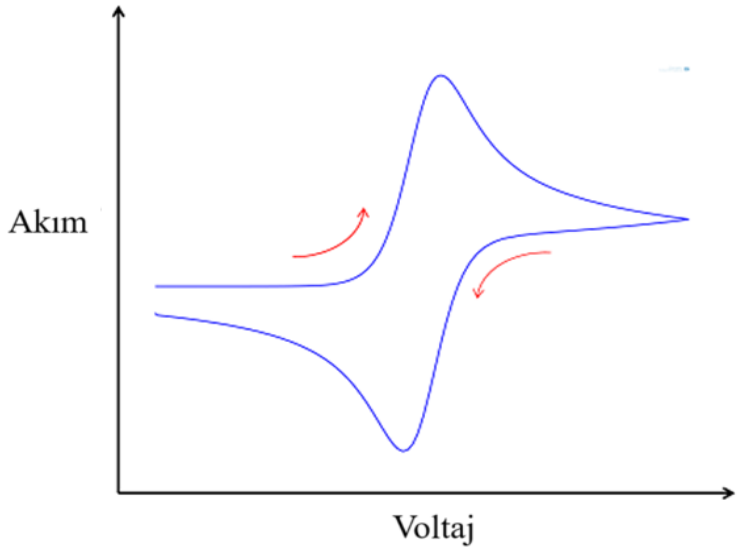
-Nükleik asit temelli biyosensörler:

Nükleik asitler, elektrokimyasal bir dönüştürücü ile birleştirilerek afinite biyosensörlerin yeni bir türünü oluştururlar. Nükleik asit temelli biyosensörler, RNA ve DNA tabanlı olup geleneksel yöntemlerle kıyaslandırıldıklarında daha hızlı ve ekonomiktirler. Bu analizler sayesinde genetik bilgilerin tespitinde önemli bir rol oynamaktadır (Thevenot vd., 1999; Wang, 2002; Stradiotto vd., 2003).

2.3. Biyosensörlerde Kullanılan Bazı Elektrokimyasal Ölçüm Yöntemleri

2.3.1. Döngüsel Voltametri

Döngüsel voltametri (CV), bir tür potansiyodinamik elektrokimyasal bir sistemdir. CV'de çalışma elektrodu potansiyeli zamana karşı doğrusal olarak değiştirilir, belirli potansiyele ulaştığında çalışma elektrodunun potansiyel rampası tersine çevrilir. Bu ters çevirme, belirli bir döngü sayısı elde edilene kadar tek bir deney sırasında birden çok kez tekrar edilir. Çalışma elektrodundaki akımın uygulanan voltaja karşı değişimi, reaksiyonun döngüsel voltamogramını verir. CV bir çözeltideki bir analitin elektrokimyasal özelliklerini incelemenin genel bir yoludur (Bard & Faulkner, 2000; Nicholson & Shain, 1964; Heinze, 1984). Şekil 2.4'te klasik bir döngüsel voltamogram gösterilmiştir.



Şekil 2.4. CV ile elde edilen voltamogram örneği

2.3.2. Kronoamperometri

Çalışma elektroduna bir potansiyel uygulanır ve akım zamana bağlı olarak ölçülür. Çözelti ortamı ile elektrot yüzeyi arasında bir difüzyon tabakası vardır. Difüzyon tabakası kavramı Nernst tarafından ortaya atılmıştır. Difüzyon, analitin daha yüksek derişimli çözeltiden elektroda transferini kontrol eder. Bu nedenle çözelti ortamından elektrot yüzeyine bir derişim gradyanı oluşur. Cottrell denklemi bu durumu bir elektrotta doğrusal difüzyon kontrolü için akım-zaman bağımlılığını tanımlayarak açılar (Koyun vd., 2012).

$$I=nFAc_0\sqrt{\frac{D}{\pi t}}$$

I: Akım

F: Faraday sabiti

n: Her molekül için transfer edilen elektron sayısı

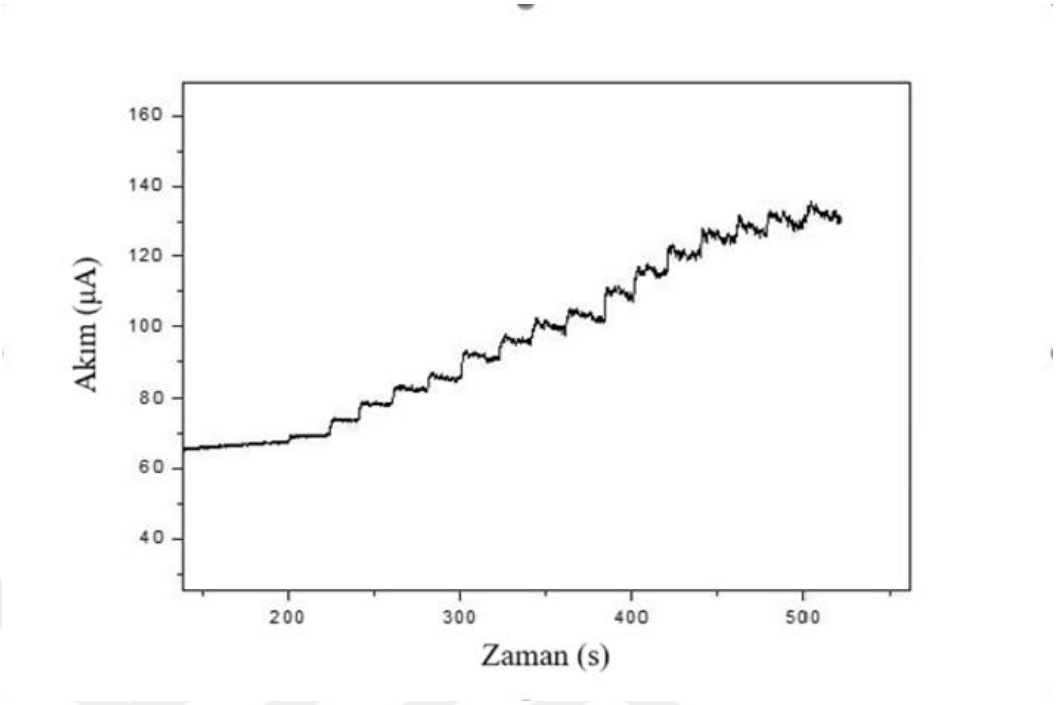
A: Elektrot alanı

c_0: Analit derişimi

D: Difüzyon katsayısı ve zaman

t: Zaman

Şekil 2.5'te klasik bir kronoamperomektik ölçüm spektrumu gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Kronoamperometri ile elde edilen spektrum örneği

2.3.3. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi

Elektriksel direnç, bir devre elemanının elektrik akımının akışına direnme yeteneği olarak açıklanabilir. Ohm yasasıyla tanımlanır:

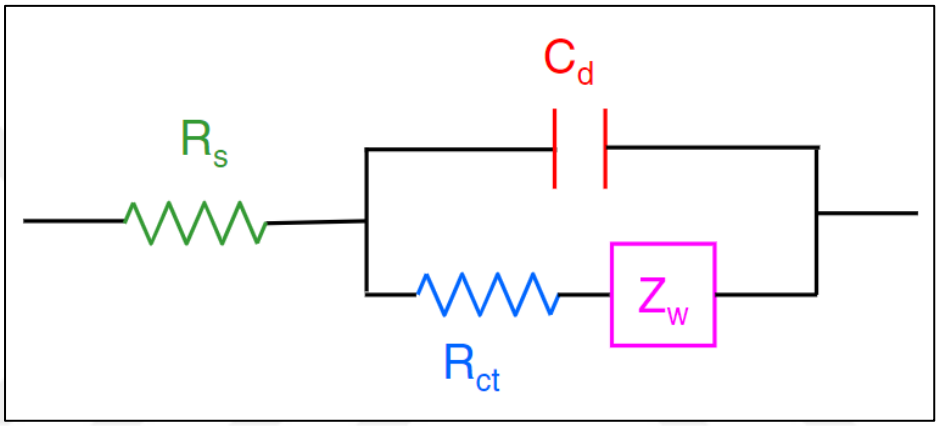
Diferansiyel Akım (DC) koşulları için E=IxR

Bu iyi bilinen bir denklem olmasına rağmen, kullanımı yalnızca ideal dirençle sınırlıdır. İdeal bir direnç, tüm akım ve voltaj seviyelerinde Ohm Yasasına uyar ve direnç değeri frekanstan bağımsızdır.

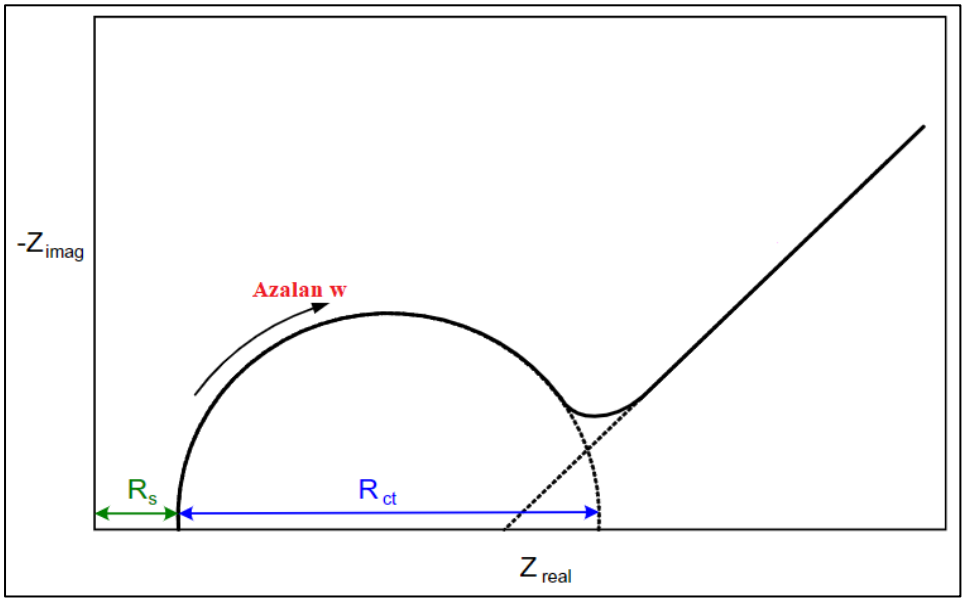
Empedans, direnç gibi bir devrenin elektrik akımının akışına direnme yeteneğinin bir ölçüsüdür, ancak elektrokimyasal empedans genellikle bir elektrokimyasal hücreye bir alternatif akım (AC) potansiyeli uygulanarak ve ardından hücreden geçen akım ölçülerek belirlenebilir. Sinüzoidal bir potansiyel uygulandığında, bu potansiyele verilen yanıt bir AC akım sinyalidir.

Bu akım sinyali, sinüzoidal fonksiyonların bir toplamı olarak düşünülebilir. AC koşulları için: E=IxZ olur, burada Z sistemin empedansıdır. Empedans, giriş potansiyelini ayarlayarak ve indüklenen akımı ölçerek hesaplanabilir (Koyun vd., 2012).

Modifiye edilmiş çalışma elektrotlarının elektriksel özelliklerini incelemek için elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) etkili bir yöntemdir. Oluşturulan deneysel sistem eşdeğer devre modellerine uygulanarak impedans spektrumlarının yorumlanması yapılabilir. Bu modelleri en çok kullanılanlarından biri Şekil 2.6'da gösterilen Randles eş değer devre modelidir (Randles, 1947). Sistem Randles sanal devresine uygulandığında Şekil 2.7'de gösterilen Nyquist eğrisi elde edilir. Burada Zw, kütle transfer sınırlamalarından kaynaklanan Warburg empedansını, Rct, yük transfer direncini, Rs, çözelti fazı direncini ve Cd, çift katmanlı kapasitansı ifade eder (Suni, 2008; Yücel, 2023).



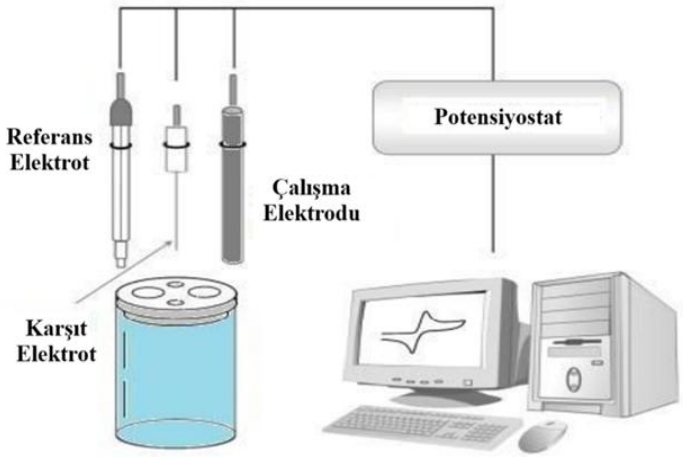
Şekil 2.6. Randles sanal devresi



Şekil 2.7. Nyquist eğrisi

2.4. Elektrokimyasal Biyosensörlerde Kullanılan Elektrot Türleri

Elektrokimyasal biyosensörlerde genellikle üç elektrotlu sistemler kullanılmaktadır. Bu sistem, referans elektrot, karşıt elektrot ve çalışma elektrodu elemanlarından oluşur. Şekil 2.8'de üç elektrotlu elektrokimyasal hücre sistemi gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Üç elektrotlu elektrokimyasal hücre

2.4.1. Karşıt elektrotlar

Çalışma ve karşıt elektrotlar arasında sabit bir akım veya potansiyel uygulandığında diğer değişkenler ölçülebilir. Karşıt elektrot, çalışma elektrodu anot olarak çalıştığında katot işlevi görür ve tam tersi de geçerlidir. Karşıt elektrodun yüzey alanı genellikle çalışma elektrodunun yüzey alanından çok daha büyüktür. Karşıt elektrottaki yarı-reaksiyon, çalışma elektrodundaki süreci sınırlamayacak kadar hızlı gerçekleşmelidir. Karşıt elektrodun potansiyeli, referans elektroda göre ölçülmez, ancak çalışma elektrodunda gerçekleşen reaksiyonu dengeleyecek şekilde ayarlanır. Bu yapılandırma, çalışma elektrodunun potansiyelinin bilinen bir referans elektroda göre ölçülmesine olanak tanır. Karşıt elektrot, genellikle altın, platin veya karbon gibi elektrokimyasal olarak inert malzemelerden üretilir (Koyun vd., 2012).

2.4.2. Referans elektrotlar

Hücredeki diğer elektrotlar bu elektroda göre referanslanır. Referans elektrot türleri şunlardır:

- Hidrojen elektrodu
- Kalomel elektrodu
- Cam elektrotlar

Hidrojen referans elektrot, bir tür standart hidrojen elektrodudur. Hidrojen potansiyel olarak patlayıcıdır ve hidrojen gazı içeren bir elektrodun rutin ölçümler için kullanımı çok uygun değildir. Bu nedenle yaygın olarak kullanılan ve ticari olarak temin edilebilen iki referans elektrot türü bulunmaktadır:

Ag/AgCl Elektrodu: AgCl ile kaplanmış bir Ag (gümüş) teli, NaCl çözeltisine daldırılır.

$AgCl + e^- \rightarrow Ag + Cl^-$ (E0 = +0.22V)

Doymuş Kalomel Elektrodu: Kalomel, cıva(II) klorürün (Hg_2Cl_2) diğer adıdır.

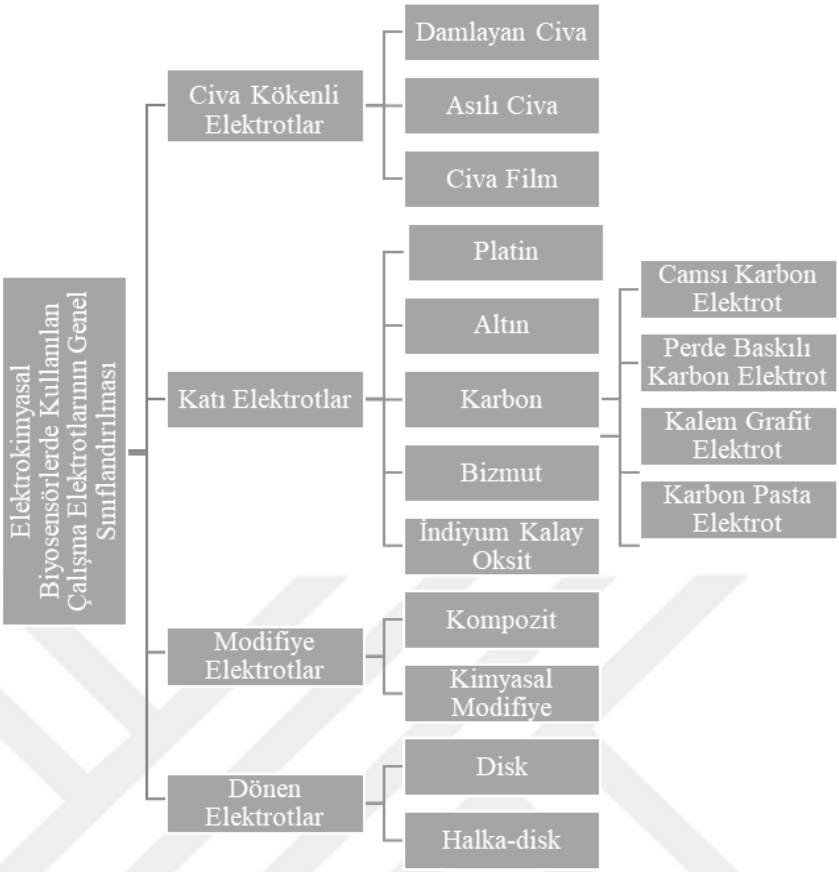
$Hg_2Cl_2 + 2e^- \rightarrow 2Hg + 2Cl^2$ (E0 = +0.24V)

Kalomel elektrodu; cıva, pasta (cıva(II) klorür tozu ve potasyum klorür karışımı) ve doymuş potasyum klorür çözeltisinden oluşur (Koyun vd., 2012).

2.4.3. Çalışma elektrotları

Elektrokimyasal sistemde biyobileşenin immobilize edildiği reaksiyonun gerçekleştiği elektrot, çalışma elektrodu olarak adlandırılır. Çalışma elektrotları, potansiyeli değişen elektrot ya da indikatör elektrotlar olarak da bilinmektedir ve kendine özgü potansiyel çalışma aralıkları vardır. Bu aralık değeri, çözücü türüne, pH değerine ve elektrot türüne bağlıdır. Çalışma elektrodunun türü, yüzey modifikasyonu veya boyutları elektrokimyasal biyosensörün tespit yeteneğini etkiler (Tural vd., 2006; Koyun vd., 2012).

Şekil 2.9'da elektrokimyasal biyosensörlerde kullanılan çalışma elektrotlarının sınıflandırılması verilmiştir.



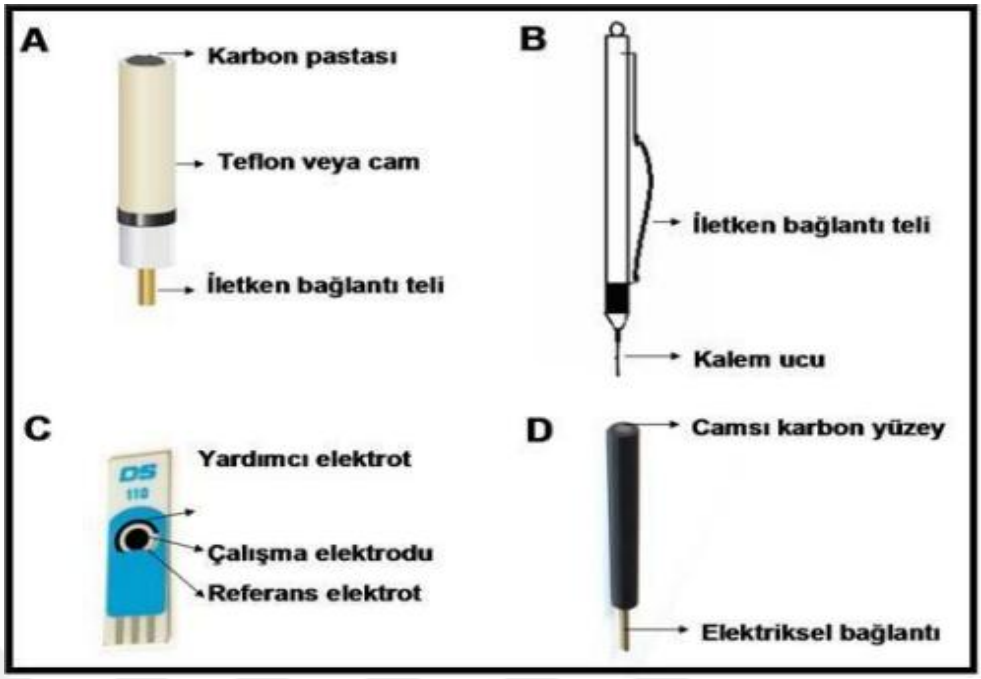
Şekil 2.9. Elektrokimyasal biyosensörlerde kullanılan çalışma elektrotlarının genel sınıflandırılması

2.4.3.1 Karbon Elektrotlar

Karbon elektrotlar, elektrokimyasal çalışmalarda yaygın olarak kullanılan katı elektrot türlerinden biridir. Bunun en önemli sebebi karbon elektrotların geniş bir anodik çalışma aralığına sahip olması ve maliyetlerinin düşük olmasıdır. Ayrıca, karbon elektrotlar hızlı yanıt verme özelliğine sahiptirler ve farklı boyutlarda kolayca üretilebilirler (Wang, 2002).

Karbon elektrotlar genellikle dört sınıfa ayrılır:

- Camsı karbon elektrot
- Yüzey baskılı karbon elektrot
- Kalem grafit elektrot
- Karbon pasta elektrot



Şekil 2.10. Karbon elektrot çeşitleri. (A) Karbon pasta elektrodu (CPE), (B) Kalem grafit elektrot (PGE), (C) Yüzey baskılı karbon elektrot (SPCE), (D) Camsı karbon elektrot (GCE)

2.4.3.1.1. Camsı Karbon Elektrot

Camsı karbon, camsı veya polimerik karbon olarak da bilinir, seçilmiş polimer reçinelerinin termal bozunmasıyla üretilir. Aromatik şerit moleküllerinden oluşur ve bu moleküller rastgele bir şekilde hizalanmış ve karmaşık bir biçimde birbirine dolanmıştır. Cam karbon elektrodunun yüzeyi, eğilmiş karbon düzlemlerinin karışık ve ayrık fragmanlarından oluşan taban düzlemi ve kenar düzleminin bir karışımından oluşur. Camsı karbon elektrotlar, elektrokimyasal analizlerde sıklıkla tercih edilmektedir. Tercih edilmelerindeki nedenler arasında, üstün mekanik ve elektriksel özelliklere sahip olmaları gelir. Ayrıca, geniş bir gerilim çalışma aralığına, kimyasal olarak inertlik ve yüksek tekrarlanabilirlik özelliklerine sahip olmaları da camsı karbon elektrotların kullanımını cazip kılmaktadır. Bu nitelikler, camsı karbon elektrotları hem endüstriyel hem de araştırma uygulamalarında sıklıkla kullanılan bir seçim haline getirir (Wang, 2002; Şahinçi, 2005).



Şekil 2.11. Camsı karbon elektrot

2.4.3.1.2. Yüzey Baskılı Karbon Elektrot

Yüzey baskılı karbon elektrotlar, çeşitli mürekkeplerin poliester esnek film, plastik ya da seramik malzemeler üzerine baskılanmasıyla üretilir. Yüzey baskılı karbon elektrotlar, çalışma elektrodu için karbon ve karşıt elektrot için platin kullanılarak üretilirken, referans elektrot için ise gümüş tercih edilir (Taleat vd., 2014).

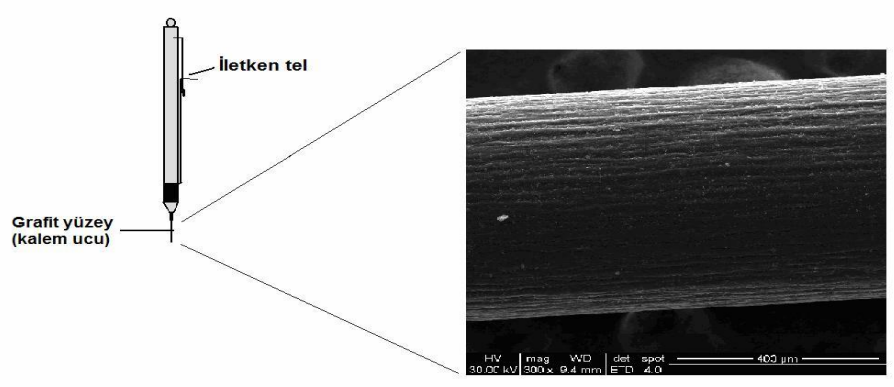


Şekil 2.12. Yüzey baskılı karbon elektrot

2.4.3.1.3. Kalem Grafit Elektrot

Elektrot olarak, mekanik kurşun kalem uçları kullanılır. Kurşun kalem uçları farklı sertlik ve çaplara sahiptirler. Bu kurşun kalem uçları, grafit tozunun kil ve balmumu karışımı içinde dağıtılmasından sonra ısıtılarak şekillendirilmesiyle üretilir. Kalem grafit

elektrotlar, karbon pasta elektrotları kadar kırılgan değildirler fakat camsı karbon elektrotlar kadar da sert değillerdir (Wang vd., 2000; Wang & Kawde, 2001).



Şekil 2.13. Kalem grafit elektrot ve grafit elektrodun yüzeyinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmesi

2.4.3.1.4. Karbon Pasta Elektrot

Karbon pasta elektrotlar, Ralph Norman Adams'ın 1958'de Kansas Üniversitesi'nde yaptığı keşfinden bu yana en yaygın kullanılan elektrot materyallerinden biri haline gelmiştir (Adams, 1958).

Bazı araştırmacılar, karbon pasta elektrotların gelişimini zaman içinde şu aşamalara ayırmışlardır:

- 1959-1963: Karbon pastanın ilk uygulamaları
- 1964-1965: Karbon pasta için ilk modifikasyonlar
- 1974: Elektrolitik bağlayıcılı karbon pastanın ilk kullanımı
- 1981-1990: Kimyasal olarak modifiye edilmiş karbon pasta dönemi
- 1988: Biyolojik olarak modifiye edilmiş karbon pasta elektrotlarının geliştirilmesi
- 1991: Karbon pasta yapımında daha dayanıklı materyallerin kullanılmasıyla birlikte yüzey baskılı karbon elektrotların geliştirilmesi (Svancara vd., 2001).

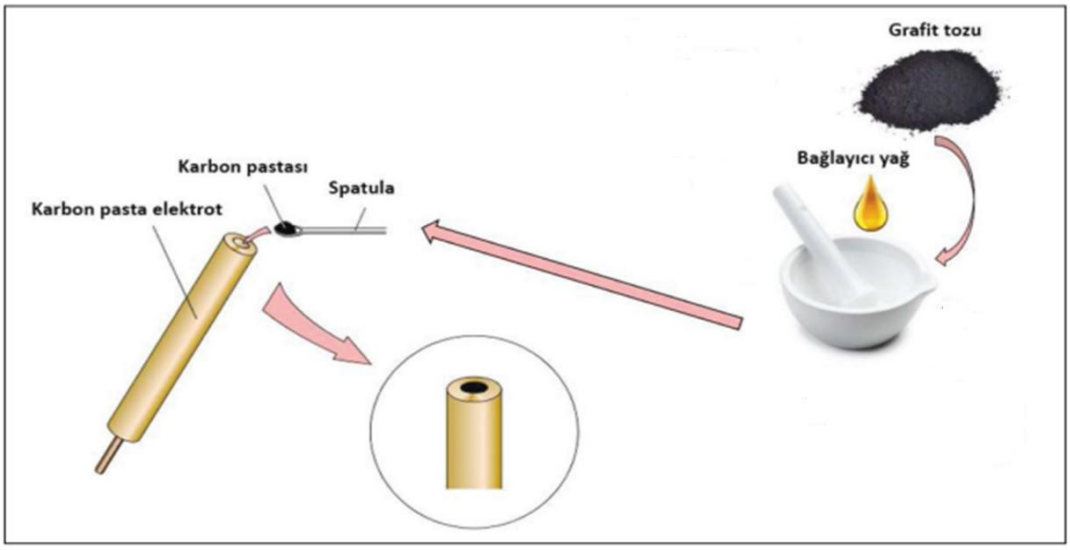
Karbon pasta elektrotlarda, grafit tozunun ana bileşimlerinden olan karbon atomları düzlemsel ve aromatik halkalar şeklinde dizilmişlerdir. Bu tabakalar, zayıf π bağları ile birbirine bağlı şekildedir ve tabakalar arasında hızlı bir elektron alışverişi gerçekleşebilmektedir.

Karbon pasta elektrotlar en çok tercih edilen elektrot türlerinden biridir. Tercih edilme nedenleri kolay ve hızlı hazırlanması, yüzey yenilenmelerinin kolay olması, maliyetinin düşük olması, çeşitli biyosensör materyalini aynı anda içerebilmesi ve yüzeylerinin katalizör ya da enzimlerle modifikasyona karşı elverişli olmasıdır (Kökbaş vd., 2013).



Şekil 2.14. Karbon pasta elektrot ve bileşenleri

Karbon pasta elektrotlarda karbon pastası denilen kısım, grafit tozunun suda çözünmeyen çeşitli organik bağlayıcılarla (mineral yağ, parafin yağı, silikon yağı, bromonaftalin) karıştırılması ile hazırlanır. Bu karışım cam, teflon ya da çeşitli yalıtkan polimerlerden yapılmış elektrot gövdesi içerisine sıkıştırılır. Aynı zamanda iletken bir tel gövdenin 2/3'ne kadar yerleştirilerek iletkenlik sağlanmış olur. Şekil 2.14'te karbon pasta elektrot ve bileşenleri, Şekil 2.15'te karbon pasta elektrotların hazırlanmasına ilişkin genel şema gösterilmiştir.



Şekil 2.15. Karbon pasta elektrotların hazırlanmasına ilişkin genel şema

Karbon pasta içeriği, elektrodun aktifliğini fazlasıyla etkilemektedir. Karbon pasta için organik bağlayıcılardan mineral yağı ile grafit karışımının birleşimi en iyi performansı verir. Karbon pasta elektrot geniş bir gerilim aralığında çalışmaya olanak sağlar. Bununla birlikte kısa sürede ve kolay hazırlanan bir elektrottur. Karbon pasta elektrotların dezavantajları arasında diğer elektrotlara göre tekrar edilebilirliğinin biraz düşük olduğu söylenebilir. Ayrıca, kullanılan çözelti yüksek bir oranda organik çözücü içeriyorsa, karbon pastası çözeltide dağılabilmektedir (Wang, 2002; Polatoğlu, 2018).

Karbon pasta elektrotların farklı şekillerde modifikasyonu gerçekleştirilebilir;

- Biyobileşenin yüzeye kovalent bağlanması veya elektrot yüzeyinde adsorplanması,
- Çözünmeyen ya da az çözünen biyobileşenin karbon pasta gibi iletken bir matriks içine katılması,
- Biyobileşenin polimerle beraber ince bir film şeklinde elektrot yüzeyine kaplanması gibi yöntemlerle modifikasyon işlemleri yapılabilir (Kökbaş vd., 2013; Erdem, 2012).

2.4.3.1.4.1. Karbon Pasta Elektrot Biyosensörleri ile İlgili Çalışmalar

Karbon pasta çalışma elektrotları, biyosensör çalışmalarında çok çeşitli analitlerin tayini için sıklıkla kullanılan elektrotlardandır. Literatürde çok fazla sayıda çalışma yer almakta ve kullanım alanları oldukça geniştir. Çizelge 2.1'de çeşitli karbonhidratların tespiti, Çizelge 2.2'de çeşitli organik bileşiklerin tespiti ve Çizelge 2.3'te çeşitli inorganik bileşiklerin tespiti için karbon pasta çalışma elektrotları ile hazırlanan biyosensörler uygulama örnekleri verilmiştir (Kalcher vd., 2009).

Çizelge 2.1. Çeşitli karbonhidratların tespiti için karbon pasta çalışma elektrot biyosensörleri

Analit	Değiştirici	Teknik	Prensip	Doğrusal Aralık	Örnekler
Glukoz	MnO_2+glukoz oksidaz	Akış enjeksiyon analizi-Amperometri tespiti	H_2O_2'nin oksidasyonu	20-500 mgl^{-1} (10mgl^{-1})	Beyaz şarap
Fruktoz	Pirolokinolinki non-fruktoz dehidrojenaz+ poli(etilenimin)	Akış enjeksiyon analizi-Amperometri tespiti		0.075-10mM	Bal
Laktoz	Oligosakkarit dehidrojenaz+ p-benzokinon diyaliz membranı	Akış enjeksiyon analizi-Amperometri tespiti			Süt
Galaktoz	Rodinleşmiş C+ galaktoz oksidaz	Amperometri		250-4,000 mgl^{-1}(45 mgl^{-1} glukoz 98 mgl^{-1} galaktoz)	Süt ürünleri
Pektin	Alkol oksidaz+ pektinesteraz (portakal kabuğu)	Akış enjeksiyon analizi-Amperometri tespiti		0.1-0.9 mgl^{-1}	Portakal kabuğu

Çizelge 2.1'de çeşitli karbonhidratların tespitinde kullanılan karbon pasta çalışma elektrot biyosensörlerinin uygulamaları özetlenmiştir. Örnek olarak beyaz şarap, bal,

portakal kabuğu, süt ve süt ürünlerinde bulunan glukoz, fruktoz, laktoz, galaktoz ve pektin analitlerinin tayinleri amperometri tekniği kullanılarak yapılmış ve doğrusal tayin aralıkları belirlenmiştir.

Çizelge 2.2. Çeşitli organik bileşiklerin tespiti için karbon pasta çalışma elektrot biyosensörleri

Analit	Değiştirici	Teknik	Prensip	Doğrusal Aralık	Örnekler
Etanol	Karbon nanotüp pastası+ Meldola mavisi+alkolde hidrojenaz	Amperometri	NADH'nin oksidasyonu	10^{-7}–$4x10^{-6}$ M (10^{-7}M)	Alkollü içecekler
Gliserol	NAD^++ gliserol dehidrojenaz+ poli(o-fenilendiamin)	Amperometri		10^{-6}–10^{-4} M ($4.3x10^{-7}$M)	Bitki özü şurubu
L-Laktat	Yaban turpu oksidoksidaz+ laktat oksidaz+ ferrosen	Akış enjeksiyon analizi-Amperometri tespiti	Kapsüllü Streptococcus thermophilus ile reaktör		Süt mayası
D-Laktat	D-Laktasyonlu hidrojenaz + arabulucu polimer	Akış enjeksiyon analizi-Amperometri tespiti		0.05–5 mM (30µM)	Fermantasyon kontrolü
Glutamat	NAD^+-dehidrojenaz+ poli (o-fenilendiamin)	Amperometri		0.4-10mM (0.1mM)	Tavuk bulyon küpleri
Oksalat	Oksalat oksidaz+ yaban turpu peroksidaz + SiO_2/TiO_2/tolui din mavisi	Amperometri		0.1–2mM (0.09mM)	Ispanak
Hipoksantin	Ksantin oksidaz (hareketsizleşti rilmiş)+ Au nanopartiküller	Amperometri	H_2O_2'nin Tespiti	($2.2x10^{-7}$M)	Sardalya, tavuk eti

Fenoller	Yaban turpu oksidasıdaz mı+ ferrosen+ membran	Amperometri	Fenol tarafından tüketilen H_2O_2'nin azalması	15 µM'ye kadar + kateşin (0.3µM + kateşin)	Şarap, çay
Flavonoidler	c/Nujol	Adsorptif sıyırma voltametresi		10^{-8}–10^{-7}M (flavonlar)	Multivitamin
Flavonoller	Elma dokusu (polifenol oksidaz)	Amperometri			Bira
Akrilamid	Hemoglobin Hb	Amperometri	Fe^{III} ile kompleksleştirme	($1.2x10^{-10}$M)	Patates cipsi
DNA	Stearik asit (bağlayıcı)+ ssDNA (hareketsizleştirilmiş)	Diferansiyel puls voltametrisi	İndikatör olarak metilen mavi ile hibridizasyon		Genetik modifiyeli bitkiler

Çizelge 2.2'de çeşitli organik bileşiklerin tespitinde kullanılan karbon pasta çalışma elektrot biyosensörlerinin uygulamaları özetlenmiştir. Genel olarak alkollü içecekler, bitki özü şurubu, süt mayası, tavuk bilyon küpleri, ıspanak, sardalya, tavuk eti, çay, patates cipsi, multivitamin, genetik modifiyeli bitkilerde bulunan etanol, gliserol, L-laktat, D-laktat, glutamat, oksalat, hipoksantin, fenoller, flavonoidler, flavonoller, akrilamid ve DNA gibi organik yapılı analitlerinin tayinleri yapılmıştır. Bu analitlerin tayinlerinde akış enjeksiyon analizi, adsorptif sıyırma voltametresi, diferansiyel puls voltametrisi ve amperometri gibi elektrokimyasal teknikler kullanılmış ve doğrusal aralıkları belirlenmiştir.

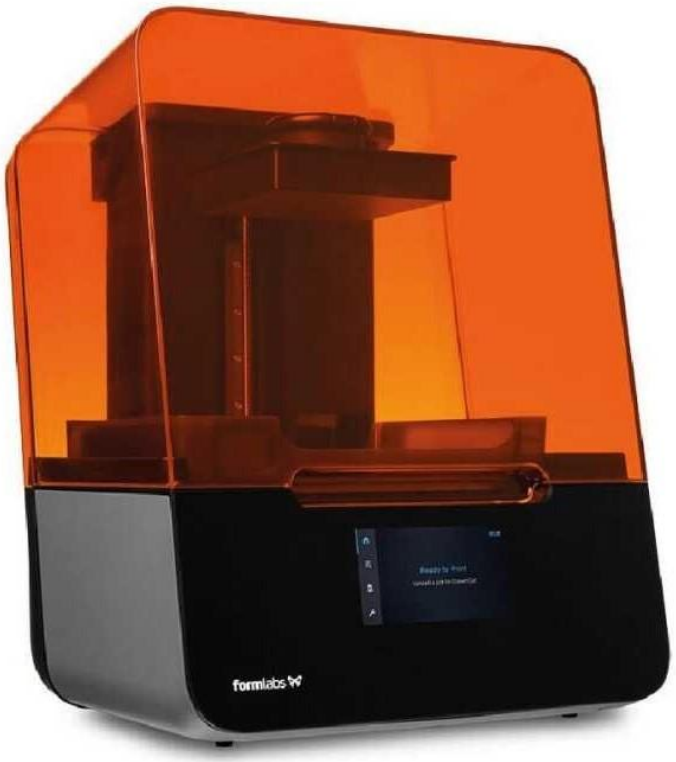
Çizelge 2.3. Çeşitli inorganik analitlerin tespiti için kullanılan karbon pasta çalışma elektrot biyosensörleri

Analit	Değiştirici	Teknik	Prensip	Doğrusal Aralık	Örnekler
Ag^{+}	Heptan sülfonik asit	Diferansiyel puls anodik sıyırma voltametrisi	İyon eşleştirme	$3x10^{-12}$–$2x10^{-5}$M (<1 pM,120dk)	Su
Cd^{2+}	Oksin+ gliserol	Katodik sıyırma voltametrisi	Kompleks Oluşturma	$9x10^{-8}$–10^{-5}M ($5x10^{-8}$M)	Su
Co^{2+}	1-(2-Piridilazo)-2-naftol	Diferansiyel puls katodik sıyırma voltametrisi	Kompleks Oluşturma	10^{-8}–10^{-6}M (6x 10^{-9}M, 3dk)	Ispanak, domuz ciğeri
Cu^{2+}	Karbon nanotüp+ DNA	Kare dalga katodik sıyırma voltametrisi	Kompleks Oluşturma	($6.3x10^{-12}$M Cu, $1.9x10^{-12}$M Pb)	Balık dokusu
Fe^{3+}	Kitin	Döngüsel voltametri, Diferansiyel puls voltametrisi	İyon değişimi	$2x10^{-6}$–$7x10^{-6}$M	Su
Hg^{2+}	L-Spartein	Diferansiyel puls voltametrisi	Kompleks Oluşturma	$5x10^{-7}$–$2x10^{-6}$M	Su
Pb^{2+}	Ditizon	Diferansiyel puls katodik sıyırma voltametrisi	Kompleks Oluşturma	20–520µg l^{-1} (17µg l^{-1}, 6dk)	Su
Sn^{2+}	Bromopirogalol kırmızı	Anodik sıyırma voltametrisi	Adsorptif kompleksleşme	0.1–50µg l^{-1} (0,06µg l^{-1})	Konserve yiyecekler

Çizelge 2.3'te çeşitli inorganik bileşiklerin tespitinde kullanılan karbon pasta çalışma elektrot biyosensörlerinin uygulamaları özetlenmiştir. Genel olarak su, ıspanak, domuz ciğeri, balık dokusu ve konserve yiyeceklerde bulunan gümüş, kadmiyum, kobalt, bakır, demir, civa, kurşun ve kalay analitlerinin tayinleri yapılmıştır. Bu analitlerin tayinlerini yaparken diferansiyel puls anodik sıyırma voltametrisi, katodik sıyırma voltametresi, diferansiyel puls katodik sıyırma voltametrisi, kare dalga katodik sıyırma voltametresi, döngüsel voltametri, diferansiyel puls voltametrisi ve anodik sıyırma voltametrisi tekniklerini kullanılmış ve doğrusal aralıkları belirlenmiştir.

2.5. Üç Boyutlu Baskı

Üç boyutlu (3D) baskı, hızlı prototipleme ve eklemeli imalat olarak da isimlendirilir. 3D baskı imalat teknolojisinin üretim yaklaşımlarından biridir. Genellikle metal, plastik, seramik ve elastomer gibi ham maddelerin fiziki yapıda ürünlere dönüştürülmesinde kullanılan bir imalat tekniğidir. 3D baskı, malzemelerin katmanların üst üste bindirildiği katmanlı imalat prensibine dayandırılır. Bu teknoloji, bilgisayar kontrolü altında yapılmış olan taramalara göre genellikle katı modelleme kullanarak bileşenlerin hızlı bir biçimde üretimini sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Kısaca 3D baskı, karmaşık üç boyutlu yapıları bilgisayar aracılığı ile oluşturan, katmanların üst üste eklenmesi ilkesi ile fiziki objelere dönüşümünü sağlamaktır (Yan, 2018). İşlem için 3D baskı makineleri kullanılır. Şekil 2.16'da bu çalışmada kullanılan Formlabs 3 + üç boyutlu yazıcı gösterilmiştir.



Şekil 2.16. Formlabs 3 + üç boyutlu yazıcı

Üç boyutlu yazıcılarda üretim süreci belli kriterlerden oluşmaktadır. Bu kriterler genel olarak (Aydın & Küçük, 2015; Campbell vd., 2011):

- Modelleme

- Dilimleme

- Yazdırma

- Sonlandırma (Tamamlama) olarak tanımlanabilir.

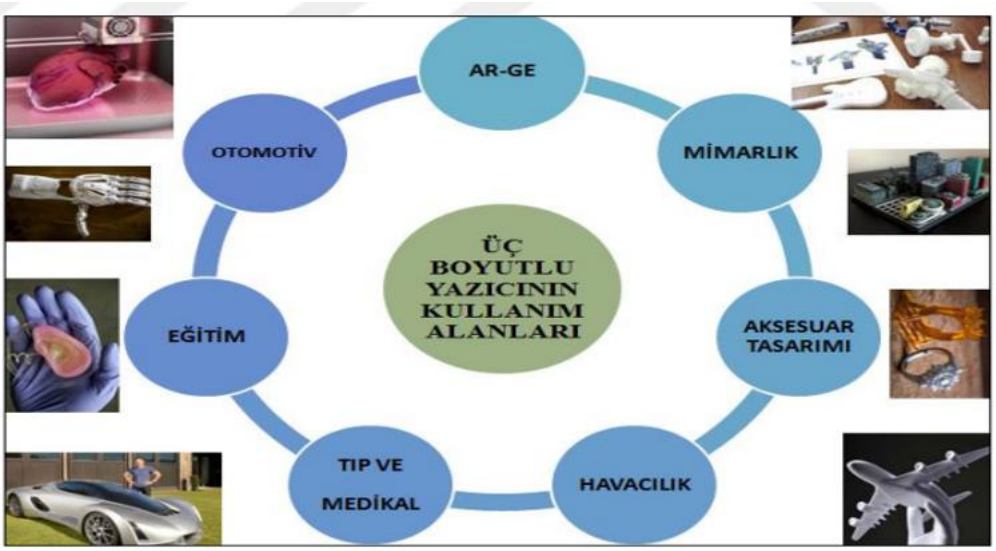
Şekil 2.17'de 3D yazıcı ile üç boyutlu bir nesnenin üretim aşamaları gösterilmiştir.



Şekil 2.17. Üç boyutlu nesnenin elde edilme aşamaları

Üç boyutlu yazıcıların üretimlerinde en çok kullanılan malzemeler plastik ve metal gruplarıdır. Ayrıca seramik ve seramik - metal hibritleri gibi çeşitli kompozit ham maddeler de tercih edilmektedir (Wohler, 2015).

3D baskı, geleneksel üretim yöntemlerinin aksine uygun maliyetli, özelleştirebilir olması, ham maddede oluşan fazlalıkların yani israfın önlenmesinde ve belirlenen özelliklerde nesnelerin kolayca üretilebilmesi gibi pek çok avantaj sunmaktadır. Ancak geleneksel üretime kıyasla düşük mukavemet, üretim hacminin maliyet artışı ve baskı sonrasında yapılması gereken ek işlemler gibi dezavantajları da vardır. Tüm bu dezavantajlara rağmen 3D baskı işleminin çok yönlülüğü sayesinde havacılık, otomotiv, sağlık, tıp, gıda, mimarlık, inşaat, tekstil, elektrik ve elektronik gibi birçok endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır (Shahrubudin vd., 2019). Şekil 2.18'de üç boyutlu baskının kullanım alanları gösterilmiştir.



Şekil 2.18. Üç boyutlu baskının kullanım alanları

2.5.1. 3D Baskı Üretimi İle İlgili Biyosensör Çalışmaları

Biyosensör çalışmalarında, tek kullanımlık olmayan elektrotların temizlenmesi ve ön işlemler sonrasında tekrar tekrar kullanılabilir halde olması en önemli kriterlerden biridir. Bununla beraber rutin ölçümler için ön işlemler gerektirmeyen tek kullanımlık elektrotlar tercih edilmeye başlanmıştır. Karbon temelli elektrotlar, maliyetinin diğer elektrot türlerine göre düşük olması nedeniyle tek kullanımlık elektrotlar olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Lin vd., 2004). Tek kullanımlık elektrot üretimi için 3D yazıcıların kullanımı son yıllarda artış göstermiştir. 3D yazıcı teknolojisindeki ilerlemelerle birlikte biyosensörlerde kullanılan ekipmanların (Elektrot ve yardımcı materyal) üretilmesine yönelik kullanımları giderek artmaya başlamıştır (Palenzuela & Pumera, 2018; Elbadawi vd., 2021). 3D yazıcılar sadece elektrot tasarımında değil aynı zamanda yardımcı ekipmanların da basılmasında kullanımının giderek artığı literatürde bu alanda yer alan çalışmaların sayısındaki artıştan anlaşılmaktadır.

Roda ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada 3D yazıcılarla akıllı telefona uyumlu olacak şekilde çalışan bir biyosensör aparatının üretimi gerçekleştirmişlerdir. Özel bir haznesi olan üretilen aparatın üzerine biyosensör yerleştirilir. Böylece biyosensör analizleri akıllı bir telefon kullanılarak yapılmaktadır (Roda vd., 2014).

Gowers ve arkadaşları, subkutanöz insan mikrodializatının analizinde yararlanabilmek için kullanılacak biyosensördeki iğne tutucu aparatları 3D yazıcı ile üretimini sağlamışlardır (Gowers vd., 2015).

Dias ve arkadaşları, kağıt endüstrisinde kullanılan enzimler ile glukoz analizlerini yapacak bir biyosensör üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmada biyosensörün seri enjeksiyon analizinde kullanılacak hücrelerin üretimi 3D yazıcı ile sağlanmıştır. 3D yazıcı ile üretilen bu hücrelerin yapım maliyetlerinin oldukça düşük olduğu ve üretim süresinin dört saat civarında olduğu rapor edilmiştir. 3D yazıcı ile üretilen hücreler ile geleneksel metotlarla üretilen hücreler arasında deneysel bir karşılaştırma yapılmış ve bunun sonucunda aralarında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Dias vd., 2016).

Finny ve arkadaşları, 3D baskı yöntemi yardımıyla ilk kez, kolorimetrik olarak UV radyasyonu takibi yapabilen taşınabilir, sağlam ve ucuz, hidrojel tabanlı sensör yapısı geliştirmişlerdir. Sensörler, organik boyaları oksidatif olarak parçalamak için TiO_2 nanoparçacıklarının fotokatalitik özelliğini kullanmış, boyayı ve fotokatalitik nanoparçacıkları şeffaf bir hidrojel matrisi içinde stabilize ederek hazırlamıştırlar. Hidrojel, nanopartikülleri ve boyaları stabilize etmek için mükemmel bir ortam sağlayan aljinat ve jelatin biyopolimerlerinden yapmışlardır. Hidrojel bileşimi, oda sıcaklığında jelleşmeyi sağlamak ve mekanik olarak kararlı, sağlam ve tekrar üretilebilir yapıların 3D baskısını kolaylaştırmak için optimize etmişlerdir. Tamamen 3D baskı ile yapılan sensör tasarımı, biyouyumlu giyilebilir sensörler gelişimi için amaçlanmıştır (Finny vd., 2020).

Loo ve arkadaşları, helezon şeklinde paslanmaz çelik elektrotlar ile elektrokimyasal DNA biyosensörü tasarlamış ve geliştirilmiştir. Bu 3D elektrotların, Konsept Lazer yazıcısı ile seçici lazer eritme (SLM) yöntemiyle basıldığı ve yüzeylerin daha sonra altınla kaplandığı bildirilmiştir. Tiyol'a bağlı DNA probunun elektrot yüzeyine bağlanmasından sonra hibridizasyon gerçekleştirilmiştir. Redoks aktif bir indikatör olan metilen mavisi, diferansiyel darbe voltametri tekniği ile DNA hibridizasyonunun belirlenmesi için kullanılmıştır (Loo vd., 2017).

Damiati ve arkadaşları tarafından dijital ışık işleme tekniği kullanılarak 3D yazıcı ile bir akış hücresi geliştirilmiştir ve meme kanseri hücre hattında (MCF-7) ve insan karaciğer kanseri hücre hattında (HepG2) hepatik oval hücrelerin tespiti için uygulanmıştır. Bu çalışmada çok duvarlı karbon nanotüp/yüzey baskılı elektrot yüzeyini

kitosan ile modifiye edilmiştir. Glutaraldehit, kitosan film tabakasında çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Anti-OV6 antikorları aktive edilmiş yüzey üzerine immobilize edilmiştir. Elektrot yüzeyi sığır serum albümini ile bloke edildikten sonra, geliştirilen elektrot 3 boyutlu yazdırılmış akış hücresine gömülmüştür. Hepatik ovalin hücrelerin, voltametrik yöntemlerle birlikte bu geliştirilen biyosensör tarafından belirlendiğini bildirmişlerdir (Damiati vd., 2018).

Kuntawong ve arkadaşları, insan terinde laktat tespiti için 3D yazıcı ile basılmış amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Bu biyosensörde, sığır serum albümini, glutaraldehit ve laktat oksidaz enzimi ile modifiye edilmiş 3D yazıcı ile basılmış iletken bir filament kullanılmış ve laktat seviyeleri kronoamperometri yöntemi ile ölçülmüş, elde edilen veriler bir cep telefonuna işlenmiştir (Kuntawong vd., 2022).

Alachkar ve arkadaşları, dopamin tayini için 3D yazıcı ile basılmış mikroakışkan şırınga tipi bir cihaza entegre edilmiş kalem grafitleri kullanarak bir biyosensör sistemi geliştirmişler ve fare beyin omurilik sıvısında dopamin tayininin uygulanması göstermişlerdir (Alachkar vd., 2022).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Tasarlanan Biyosensörlerin Geliştirilmesinde Kullanılan Materyaller ve Cihazlar

Biyosensör çalışmalarında yapılan elektrokimyasal ölçümlerde, üçlü elektrot sistemi kullanıldı. Üçlü elektrot sisteminde, referans elektrot olarak, 3 M KCl ile doyurulmuş Ag/AgCl referans elektrot; IBAS, Warwickshire, UK'den satın alınarak kullanıldı. Karşıt elektrot olarak, platin tel karşıt elektrot; IBAS, Warwickshire, UK'den satın alınarak kullanıldı. Çalışma elektrodu olarak, karbon pasta çalışma elektrodu; TÜTAGEM'de bulunan Formlabs 3+ Üç boyutlu yazıcı ile basıldıktan sonra hazırlanarak kullanıldı.

Tasarlanan biyosensör çalışmasında döngüsel voltametri, amperometri, elektrokimyasal impedans spektroskopisi ve EDX analizi yöntemleri uygulandı. EDX analizlerinde taramalı elektron mikroskobu & enerji dağılımlı x-ışını spektroskopisi, Zeiss Evo LS10 (Stuttgart, Almanya) cihazı kullanıldı. Bu çalışmada gerçekleşen döngüsel voltametri, amperometri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi ölçümleri, Gamry Framework yazılımı içeren, bilgisayar destekli Gamry potansiyostat/galvanostat, Interface 1010 E (Gamry Instruments, Warminster, USA) cihazı ile gerçekleştirildi. Ölçümde elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde Gamry Echem Analyst programı kullanıldı.

Bu çalışmada biyosensörlerin tasarımı için her biri 30 mm uzunluğunda ve 0,6 mm çapında olan altın (Metrohm Dropsense, ABD), bakır (Bölgesel bir elektrikçiden),

kalay kaplı bakır (Bölgesel bir elektrikçiden) ve platin teller (Metrohm Dropsense, ABD) kullanıldı.

Çalışmamızda kullanılan tüm cihazlar; Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (TÜTAGEM)'nde mevcut olarak bulunan cihazlardır. Deneysel kısımda kullanılan tüm cihazların listesi;

- Ultra saf su cihazı (ELGA Purelab Option DV25; Paris, Fransa)
- Ultrasonik su banyo (Daihan WiseClean; Wonju, Gangwon, Güney Kore)
- Mikro pipetler (Eppendorf; Hamburg, Almanya)
- pH Metre (Mettler Toledo Seven Contact; Columbus, Ohio, ABD)
- Hassas terazi (Shimadzu AUW220D; Kyoto, Japonya)
- Manyetik karıştırıcı (Biosan magnetic stirrer, MSH 300)
- Buzdolabı (Arçelik, ev tipi)
- Dış sirkülasyonlu su banyosu (Nuve BM 302)
- Üç boyutlu yazıcı (Formlabs 3+; Somerville, Massachusetts, ABD)
- Potansiyostat/galvanostat (Gamry Instruments Interface 1010 E; Warminster, ABD)
- Taramalı elektron mikroskobu & Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi, Zeiss Evo LS10 (Stuttgart, Almanya)
- Bilyalı değirmen (VWR ®, Star-Beater; Leuven, Belçika)

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

- Grafit tozu (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA)
- Jelatin (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA)
- Mineral yağ (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA)
- Lakkaz enzimi (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA)
- Kateşol (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA)
- Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) (Merck KGaA, Darmstdat, Almanya)
- Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (Merck KGaA, Darmstdat, Almanya)
- Potasyum ferrosiyanür ($K_4[Fe(CN)_6]$) (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA)

- Potasyum ferrisiyanür ($K_3[Fe(CN)_6]$) (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA)
- Potasyum klorür (KCl) (Merck KGaA, Darmstdat, Almanya)
- Izo propenol (Merck KGaA, Darmstdat, Almanya)

3.1.3. Tasarlanan Biyosensörlerin Geliştirilmesinde Kullanılan Çözeltiler

Tampon Çözeltileri

50 mM pH:6,0 Fosfat Tampon Çözeltisi: İlk olarak 1,775 g Na_2HPO_4 250 mL'lik balon jojede saf su ile çözeltisi hazırlandı. Sonra 1,70075 g KH_2PO_4 250 ml saf suda balon jojenin içinde çözüldü. Hazırlanan bu stok çözeltiler, tamponun pH değeri 6,0 olacak şekilde belirli oranlarda karıştırılarak fosfat tampon çözeltisi elde edildi. Tampon çözeltisi dolap içinde saklandı.

Enzim Çözeltisi

Trametes versicolor lakkaz enzimi (EC 1.10.3.2) (13,6 U/mg) Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)'dan satın alınarak kullanıldı. Yaptığımız çalışmada kullanılacak enzim çözeltileri, 50 mM pH:6,0 fosfat tampon çözeltisinde 1,25 U/5,0 µL'lik porsiyonlar halinde hazırlandı. Hazırlanan enzim porsiyonları, -20ºC'de buzdolabında saklandı.

Substrat Çözeltisi

4 mM Kateşol çözeltisi: Kateşol çözeltisinin hazırlanması için, 11,011 mg kateşol tartılıp 25 mL tampon çözeltide balon jojenin içinde çözüldü. Elde edilen çözelti, stok kateşol çözeltisi olarak kullanıldı. Her çalışma için günlük olarak hazırlandı.

Redoks Prob Çözeltisi

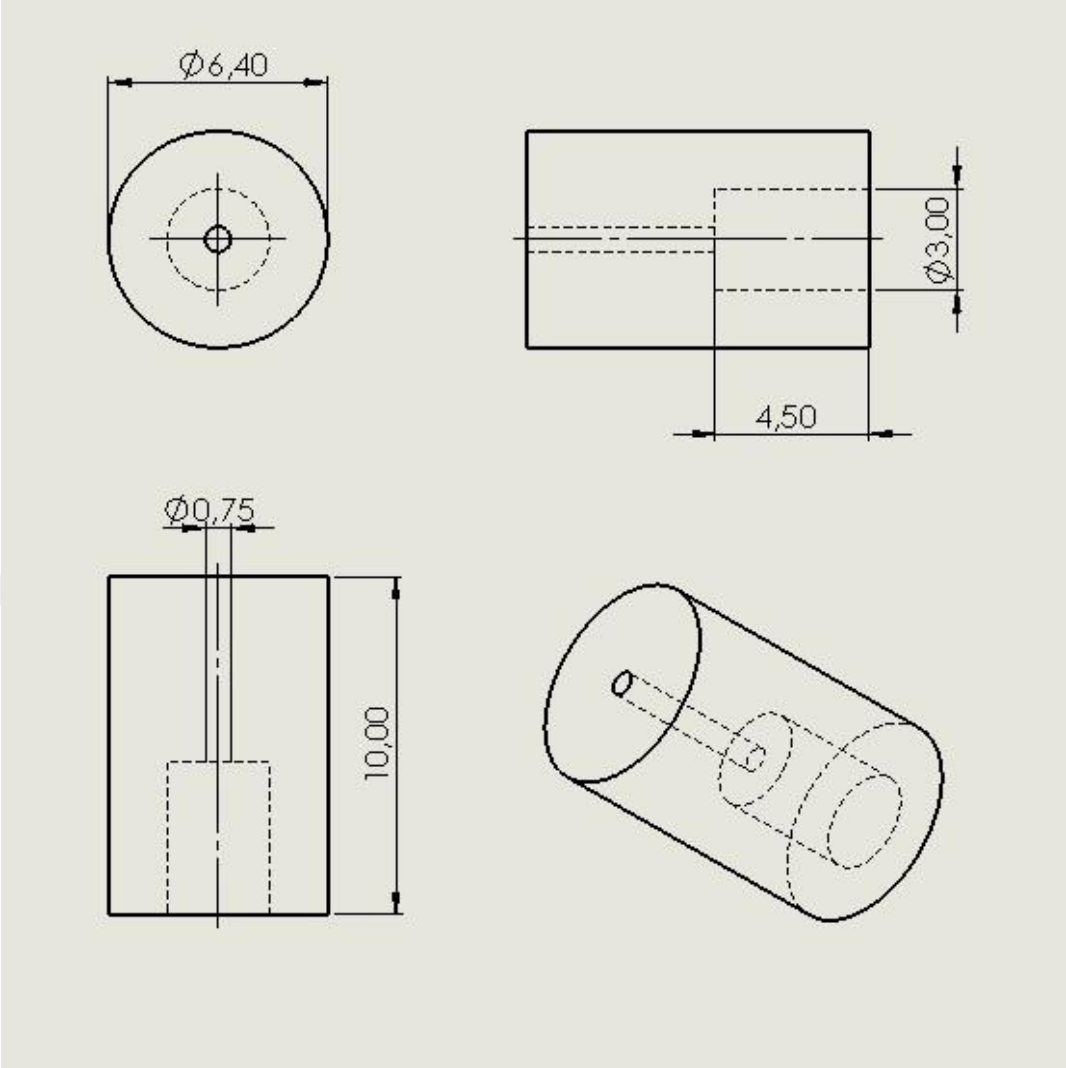
0,4115 g potasyum ferrisiyanür ($K_3[Fe(CN)_6]$), 0,528 g potasyum ferrosiyanür ($K_4[Fe(CN)_6]$) ve 1,86 g potasyum klorür (KCl) tartılıp 250 mL'lik balon joje içerisinde 50 mM, pH: 6,0 fosfat tamponunda çözüldü. Redoks prob çözeltisi dolap içinde saklandı.

3.2. Yöntem

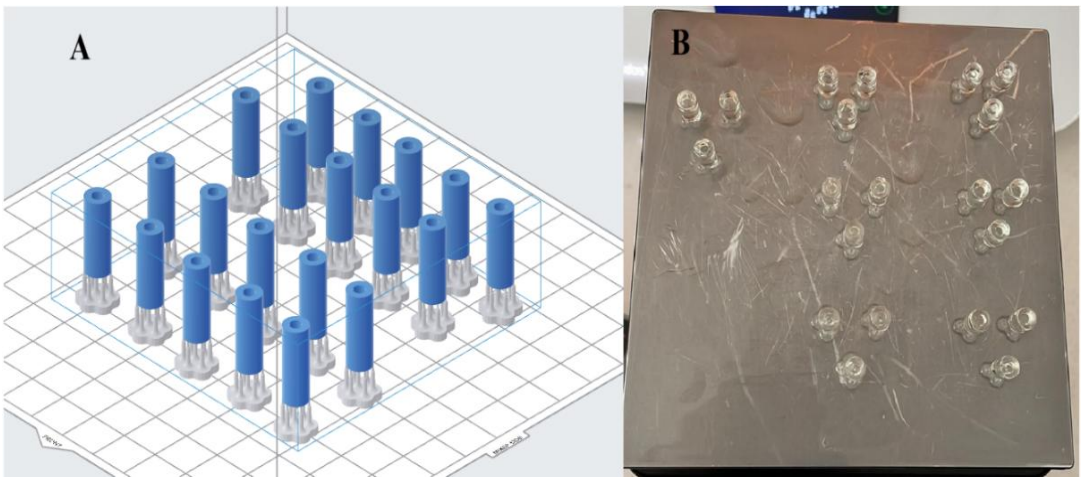
3.2.1. Üç Boyutlu Yazıcıda Çalışma Elektrodu Başlıklarının Basımı ve Temizlenmesi

Geliştirilecek biyosensörlerin çalışma elektrodu üretimi Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (TÜTAGEM)'nde yapıldı.

Geliştirilecek biyosensörlerin karbon pasta temelli tek kullanımlık biyosensörler olması planlandı. Bu amaçla kullanılacak olan karbon pasta karışımının yerleştirileceği çalışma elektrodu başlıklarının üretimi Formlabs 3+ Üç Boyutlu Yazıcı ile yapıldı. Üç boyutlu yazıcı ile üretilen fotopolimer reçine temelli başlığın üretim aşamasında; ilk olarak elektrokimyasal ölçümlerin gerçekleştirileceği çalışma hücresi içerisinde kullanıma uygun boyutlarda başlıklar SolidWorks programı ile çizildi ve bunlar arasından elektrot yüzeyi 6,40 mm çap ve yüksekliği 10 mm, potansiyostat bağlantısının çapı 0,75 mm, karbon pastanın doldurulduğu kısmın iç çapı 3,0 mm ve derinliği 4,50 mm olan elektrotlar seçildi. Şekil 3.1'de üç boyutlu yazıcıda üretilen çalışma elektrodu başlığının SolidWorks çizimi ve boyutları gösterildi. Seçilen tasarımın 3D Yazıcı ile üretim süreci sonrası başlığını üretildiği gibi kullanmak reçineden dolayı safsızlıklara yol açar. Bu da ölçüm sonuçlarına etki edebileceğinden dolayı temizleme işlemi yapıldı. Temizleme işlemi, basılan başlıkların izo propenol alkol ile yıkanması ile gerçekleştirildi. Başlıklar, kurutma sonrası hazır hale getirildi. Şekil 3.2'de tasarlanan çalışma elektrodu başlıklarının üretimden önceki 3D çizimi ve üretimden sonraki hali gösterildi. Son olarak çalışma elektrodu tasarımına boyutları 30 mm uzunluğunda ve 0,6 mm çapında altın, bakır, kalay kaplı bakır ve platin teller ile potansiyostat bağlantısı kazandırılarak biyosensör çalışmalarında kullanıma hazır hale getirildi.



Şekil 3.1. Üç boyutlu yazıcıda üretilen çalışma elektrodu başlıklarının teknik çizimi



Şekil 3.2. Üç boyutlu yazıcıda üretilen çalışma elektrodu başlıkları (A: Üretim öncesi SolidWorks programında tasarımı, B: Üretim sonrası hali)

3.2.2. Biyosensör Tasarımında Kullanılan İletken Tellerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İle Analizi

Tasarlanan biyosensördeki karbon pasta çalışma elektrodunun potansiyostat bağlantısını oluşturan altın, bakır, kalay kaplı bakır ve platin telleri için taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi yapılarak tel numunelerinin yüzey görüntüleri elde edildi. Tellerin yüzeyine ait SEM görüntülerinin elde edilmesi için hızlanma gerilimi 5 kV olarak kullanıldı.

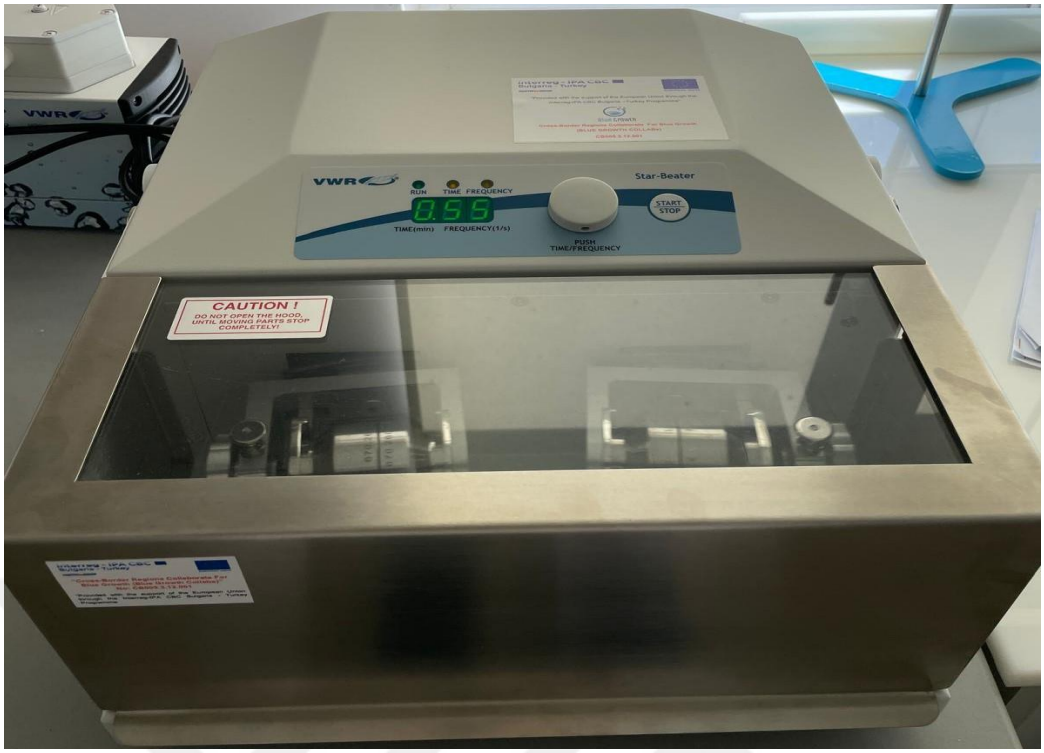
3.2.3. Biyosensör Tasarımında Kullanılan İletken Tellerin Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX) Analizi

Tasarlanan biyosensördeki karbon pasta çalışma elektrodunun potansiyostat bağlantısını oluşturan altın, bakır, kalay kaplı bakır ve platin telleri için tek tek Edx analizi yapılarak tel numunelerinin element içeriği belirlendi.

3.2.4. Grafit Tozunun Elde Edilmesi

Grafit tozunu elde etmek amacıyla Şekil 3.3'te gösterilen Bilyalı değirmen (VWR ®, Star-Beater; Leuven, Belçika) kullanıldı.

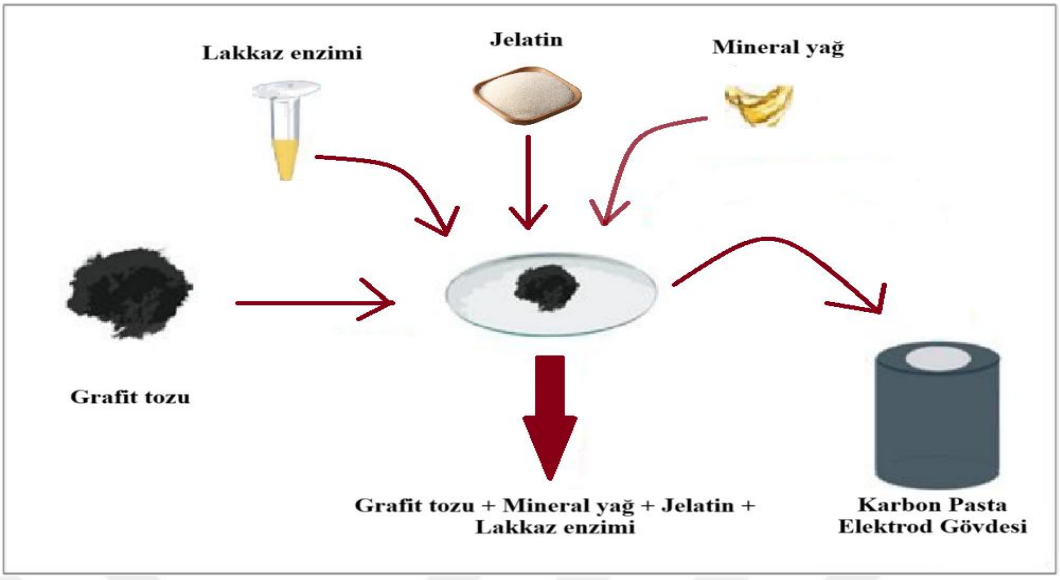
Bu amaçla 5 g grafit tozu, bilyalı değirmenin kaplarına yerleştirildi. Cihaz sallanma hızı 20 frekans (1/s) ve öğütme süresi 15 dakika olacak şekilde ayarlandı ve çalışmalarda kullanılan öğütülmüş grafit tozu haline getirildi.



Şekil 3.3. Grafit tozunu elde etmek amacıyla kullanılan bilyalı değirmen (VWR ®, Star-Beater; Leuven, Belçika)

3.2.5. Karbon Pasta Çalışma Elektrodunun Hazırlanması

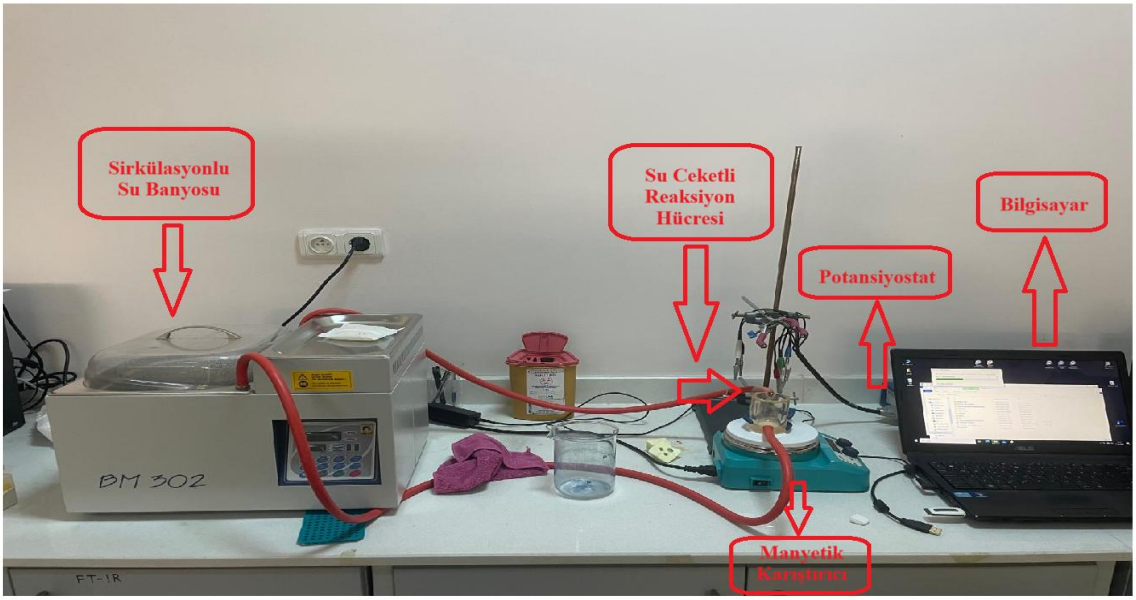
Geliştirilen biyosensörde karbon pasta karışımının hazırlanması için, önce saat camında spatül yardımıyla Bölüm 3.2.4'te tarif edildiği gibi öğütülen grafit tozundan 30 mg, jelatinden 4 mg ve mineral yağından 30 µL eklenerek 5 dk süre ile karıştırıldı. Sonra karışıma 5,0 U/20,0 µL'lik lakkaz enzimi eklenerek 5 dk daha karıştırıldı. Daha sonra Bölüm 3.2.1'de tarif edildiği şekilde üretilen karbon pasta karışımının yer alacağı çalışma elektrodu başlığına altın, bakır, kalay kaplı bakır veya platin bir tel ile potansiyostat bağlantısı kazandırıldı. Son aşamada, karışım spatül yardımıyla elektroda doldurulduu ve biyoaktif tabakanın pürüzsüz hale getirilmesi için parafin kağıdı üzerinde sinterleme işlemi gerçekleştirildi. Sinterleme işleminden sonra karbon pasta çalışma elektrodu kullanılmaya hazır hale geldi. Şekil 3.4'te çalışmalarda kullanılan karbon pasta çalışma elektrodunun hazırlanması şematik olarak gösterilmiştir.



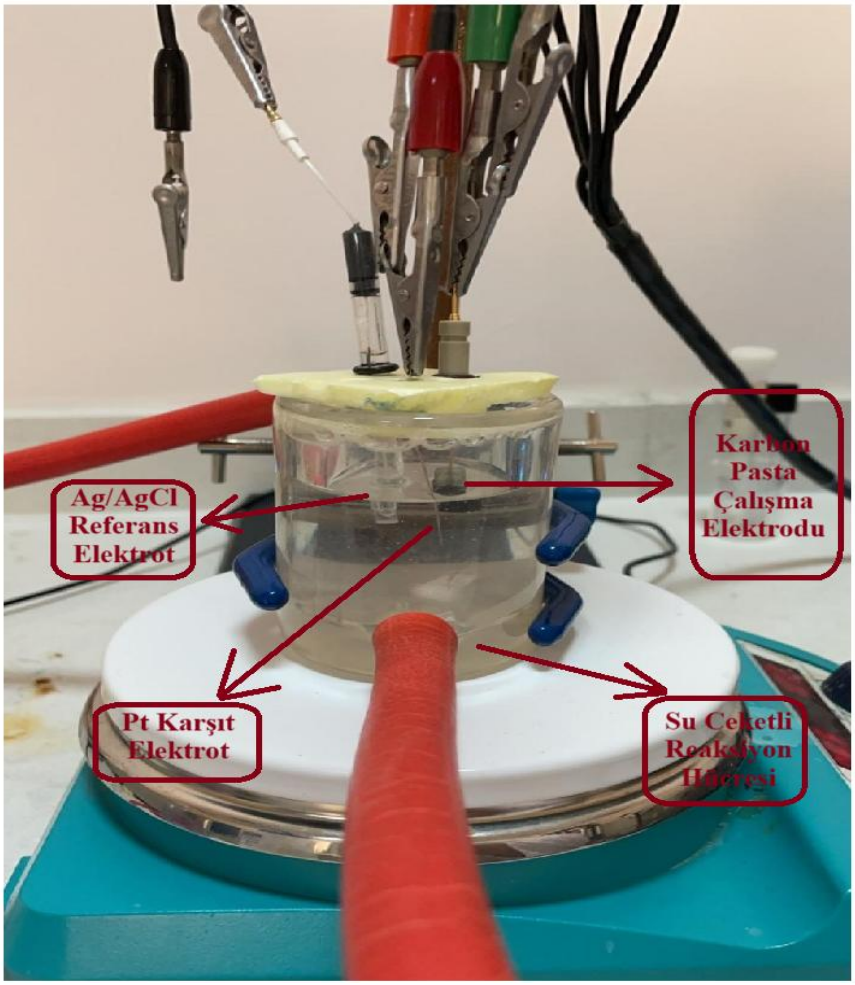
Şekil 3.4. Çalışmada kullanılan karbon pasta çalışma elektrodunun hazırlanması

3.2.6. Tasarlanan Biyosensörlerin Çalışma Prosedürü

Tasarlanan biyosensörün hazırlanması için ilk önce Bölüm 3.2.1'de tarif edildiği gibi üretilen karbon pasta çalışma elektrodu başlığına Bölüm 3.2.5'teki prosedür uygulandı. Hazırlanan biyosensörde yapılacak olan ölçümler, amperometrik ölçüm prensibine uygun olarak yapıldı. Yapılan ölçümler için Şekil 3.5'te verilen deney düzeneği hazırlandı. Hazırlanan karbon pasta çalışma elektrodu, Ag/AgCl referans ve Pt karşıt elektrotlarından oluşan üçlü elektrot sistemi reaksiyon hücresine yerleştirildi. Şekil 3.6'da reaksiyon hücresine yerleştirilen üçlü elektrot sistemi gösterilmektedir. Sirkülasyonlu su banyosunun sıcaklığı 40ºC olarak ayarlandı. Reaksiyonun gerçekleşeceği yer olan su ceketli reaksiyon hücresine mezür yardımıyla 40 mL, 50 mM pH: 6,0 fosfat tamponu çözeltisi konuldu (Tuncay & Ergene, 2024). Sonra manyetik karıştırıcı yardımı ile reaksiyon hücresi için sabit bir karıştırma hızı ayarlandı ve Gamry Instruments Interface 1010 E potansiyostatı açıldı, potansiyel +0,7 V olarak belirlenerek sabitlendi. Devreden geçen akımın dengelenmesi için 5 dk bekletildi ve ardından reaksiyon hücresine belirli derişimde kateşol çözeltisi eklendi. Reaksiyon tamamlandığında, devreden geçen akım miktarı kaydedildi. Ölçümde elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde Gamry Echem Analyst programı kullanıldı.



Şekil 3.5. Tasarlanan biyosensörler ile yapılan ölçümlerde kullanılan düzenek



Şekil 3.6. Üçlü elektrot sistemi

3.2.7. Tasarlanan Biyosensörlerin Çalışma Koşulları

pH ve Sıcaklık Koşulları

Literatürde; Sarika ve arkadaşları, Clark tipi oksijen elektrodu kullanarak amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Biyosensörde 5,0 U *T. versicolor* lakkazını 2,5 mg jelatin ile karıştırarak naylon membran yüzeyine tutuklamışlardır. 0,2 M fosfat tamponu, pH 6,8 ortamında, 45°C sıcaklıkta 2,6-dimetoksifenol için amperometrik ölçümler yaptıklarını bildirmişlerdir (Sarika vd., 2016).

Sezginturk ve arkadaşları, Clark tipi oksijen elektrodu kullanarak amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Biyosensörde, 4,0 U *T. Versicolor* lakkazını 10 mg jelatin ile karıştırarak yüzey baskılı elektrot yüzeyine tutuklamışlardır. 50 mM fosfat tamponu, pH 7,5 ortamında 38°C sıcaklıkta 2,4-diklorofenoksiasetik asit için amperometrik ve kronoamperometrik ölçümler yaptıklarını bildirmişlerdir (Sezginturk vd., 2010).

Moradpour ve arkadaşları, dopamin tespiti için immobilize edilmiş lakkaz türevi bir biyosensör geliştirmişlerdir. Biyosensörde, 2,5 U *T. versicolor* lakkazını karbon pasta elektrodunun yüzeyine tutuklamışlardır. 25 mM fosfat tamponu, pH 6,0 ortamında, 40°C sıcaklıkta dopamin için amperometrik ölçümler yaptıklarını bildirmişlerdir (Moradpour vd., 2024)

Asav, lakkaz aktivitesi belirlenen mantar türlerinden, aktivitesi en yüksek olan mantar türünün biyosensör sistemlerine uygulanabilirliğini incelemek amacıyla doku homojenatı temelli bir biyosensör geliştirilmiştir. Biyosensörde, mantar doku homojenatını karbon pasta elektrodunun yüzeyine tutuklamışlardır. 100 mM fosfat tamponu, pH 7,0 ortamında, 35°C sabit sıcaklıkta amperometrik ölçümler yaptığını bildirmiştir (Asav, 2021).

Tuncay ve Ergene, geliştirdiği lakkaz temelli biyosensörde, optimum çalışma sıcaklığını belirlenmesi için, 25-50°C arasındaki sıcaklık değerleri aralığında düşük sıcaklıktan yüksek sıcaklığa doğru amperometrik ölçümler gerçekleştirmiştir. Optimum koşulları pH 6,0 50 mM fosfat tamponu ve 40°C olarak rapor etmiştirlerdir (Tuncay & Ergene, 2024).

Bu çalışmada tasarlanan biyosensörler ile yapılan ölçümlerde çalışma sıcaklığı ve pH değerleri literatür ile uyumlu olacak şekilde; 50 mM pH 6,0 fosfat tampon ve sıcaklığı 40ºC olarak belirlendi ve tüm denemeler belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

3.2.8. Tasarlanan Biyosensörler İçin Çalışma Potansiyelinin Belirlenmesi

Tasarlanan biyosensör ile pH 6,0 ortamında 50 mM fosfat tamponu kullanılarak, 40°C sıcaklıkta, -1,0 - 1,0 V potansiyel aralığında, 50 mV/s tarama hızında çalışma potansiyelinin belirlenmesi için döngüsel voltametri yöntemi ile voltametrik ölçümler alındı ve sonuçlar değerlendirildi.

3.2.9. Tasarlanan Biyosensörlerin Cevap Süresinin Belirlenmesi

Tasarlanan biyosensörün cevap süresinin belirlenmesi için, 5-95 µM kateşol derişimlerinde, pH 6,0 50 mM fosfat tamponu kullanılarak, 40°C sıcaklıktaki çalışma koşullarında +0,7 V sabit potansiyelde ölçümler gerçekleştirildi. Kateşol çözeltisinin reaksiyon ortamına eklenmesi ve reaksiyonun sonlanması ile devreden geçen akım farkı değişiminin tekrar dengelendiği zaman aralığı (s), hazırlanan biyosensörün cevap süresi olarak kabul edildi.

3.2.10. Tasarlanan Biyosensörlerin Kalibrasyon Grafiklerinin ve Tayin Sınırlarının Belirlenmesi

Altın, bakır, kalay kaplı bakır ve platin tel kullanılarak tasarlanan biyosensörler ile 5-95 µM kateşol derişimlerinde, pH 6,0 50 mM fosfat tamponu kullanılarak, 40°C sıcaklıktaki çalışma koşullarında +0,7 V sabit potansiyelde amperometrik ölçümler alındı. Ölçümler, Gamry Framework yazılımı içeren, bilgisayar destekli Gamry potansiyostat/galvanostat, Interface 1010 E (Gamry Instruments, Warminster, USA) cihazı ile gerçekleştirildi. Ölçümlerde elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde Gamry Echem Analyst programı kullanıldı. Kalibrasyon grafiği, reaksiyon ortamına eklenen kateşol çözeltisinin derişimine karşı (µM) ölçülen akım değişimlerinin (ΔI,mA) grafiğe geçirilmesi ile elde edildi. Grafiklerden elde edilen doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları hesaplandı.

Tasarlanan biyosensörlerin tayin sınırlarını (LOD) belirlemek için, 50 mM fosfat tamponunda (pH 6,0), 40°C'de +0,7 V sabit potansiyelde 5-95 µM kateşol derişimlerinde

ölçümler gerçekleştirildi. Kateşol derişimlerine karşı ölçülen akım değişimlerinin kullanılmasıyla hazırlanan kalibrasyon grafiklerinin eğimi (m) ve bu verilerin regresyon analizi ile elde edilen standart hata (S) değerleri kullanılarak [(3,3xS)/m] formülüyle her bir biyosensör için LOD değerleri hesaplandı. Regresyon analizleri Microsoft Excel® yazılımı ile yapıldı.

3.2.11. Tasarlanan Biyosensörlerin Tekrar Üretilebilirliklerinin İncelenmesi

Altın, bakır, kalay kaplı bakır ve platin tel kullanılarak tasarlanan biyosensörlerin tekrar üretilebilirliğinin incelenmesi amacıyla herbir farklı tel ile 10'ar farklı biyosensör hazırlandı ve 5-95 µM kateşol derişimlerinde, pH 6,0 50 mM fosfat tamponu kullanılarak, 40°C sıcaklıktaki çalışma koşullarında +0,7 V sabit potansiyelde ölçümler alındı. Sonuçlar ve kalibrasyon grafiklerinden yararlanılarak, doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları hesaplandı ve tasarlanan biyosensörlerin tekrar üretilebilirliği test edildi.

3.2.12. Tasarlanan Biyosensörlerin Tekrarlanabilirliklerinin İncelenmesi

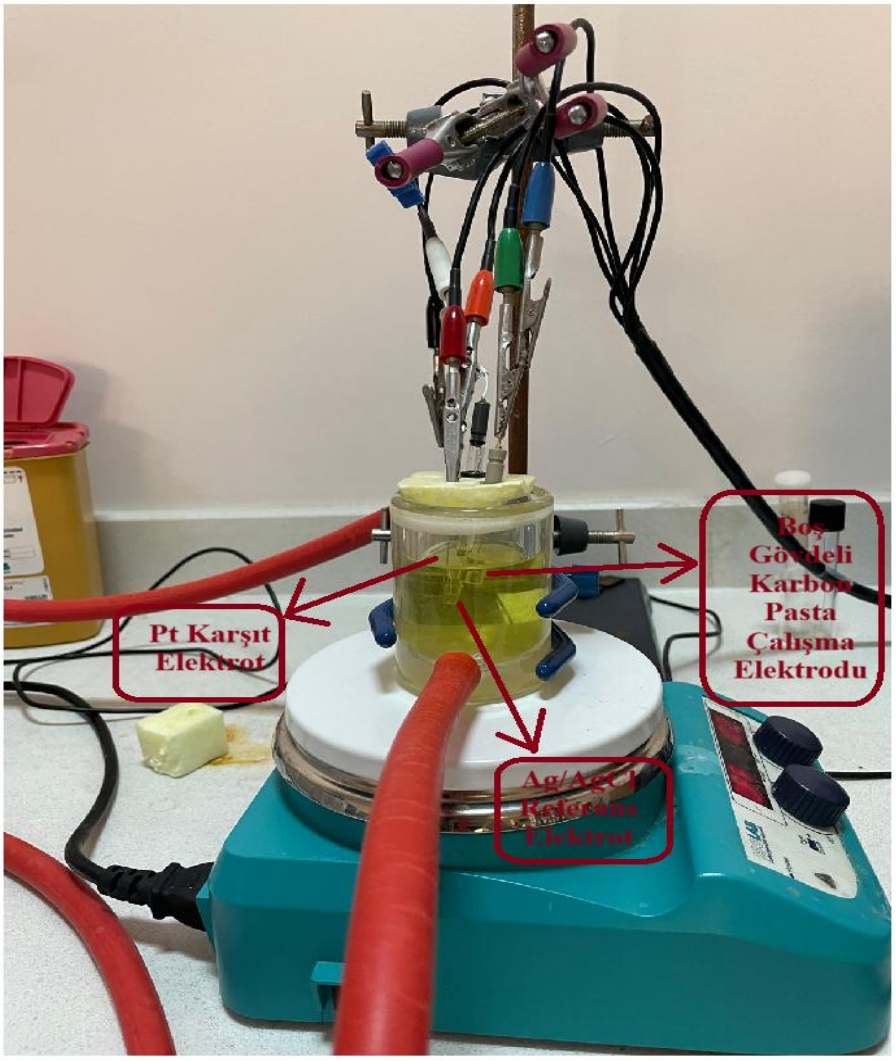
Altın, bakır, kalay kaplı bakır ve platin tel kullanılarak tasarlanan biyosensörler ile belirli sabit kateşol derişimlerinde yapılan ölçümlerin tekrarlanabilirliğini incelemek amacıyla 5, 15, 25, 45, 65 ve 95 µM kateşol derişimlerinde, pH 6,0 50 mM fosfat tamponu kullanılarak, 40°C sıcaklıktaki çalışma koşullarında ve +0,7 V sabit potansiyelde her bir biyosensör için 10'ar ölçüm alındı. Sonuçlar ve kalibrasyon grafiklerinden yararlanılarak ortalama değer, standart sapma (±S.S.) ve geri kazanım yüzdeleri (%) belirlendi.

3.2.13.Tasarlanan Biyosensörlerin İmpedans Analizleri

Altın, bakır, kalay kaplı bakır ve platin tel kullanılarak tasarlanan biyosensörlerin impedimetrik davranışlarının incelenmesi Gamry Framework yazılımı içeren, bilgisayar destekli Gamry potansiyostat/galvanostat, Interface 1010 E (Gamry Instruments, Warminster, USA) cihazı ile yapıldı. Ölçümde elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde Gamry Echem Analyst programı kullanıldı.

Bu amaçla 20 mL $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ redoks probu Şekil 3.7'de reaksiyon hücresine eklendi. Ag/AgCl referans ve Pt karşıt elektrot olarak kullanıldı. Ölçümler 50.000 Hz – 0,05 Hz frekans aralığı ve 10 mV alternatif akımda gerçekleştirildi. Her bir

tel için karbon pasta elektrodu gövdesi bir dolu bir boş olacak şekilde impedans ölçümleri alındı.



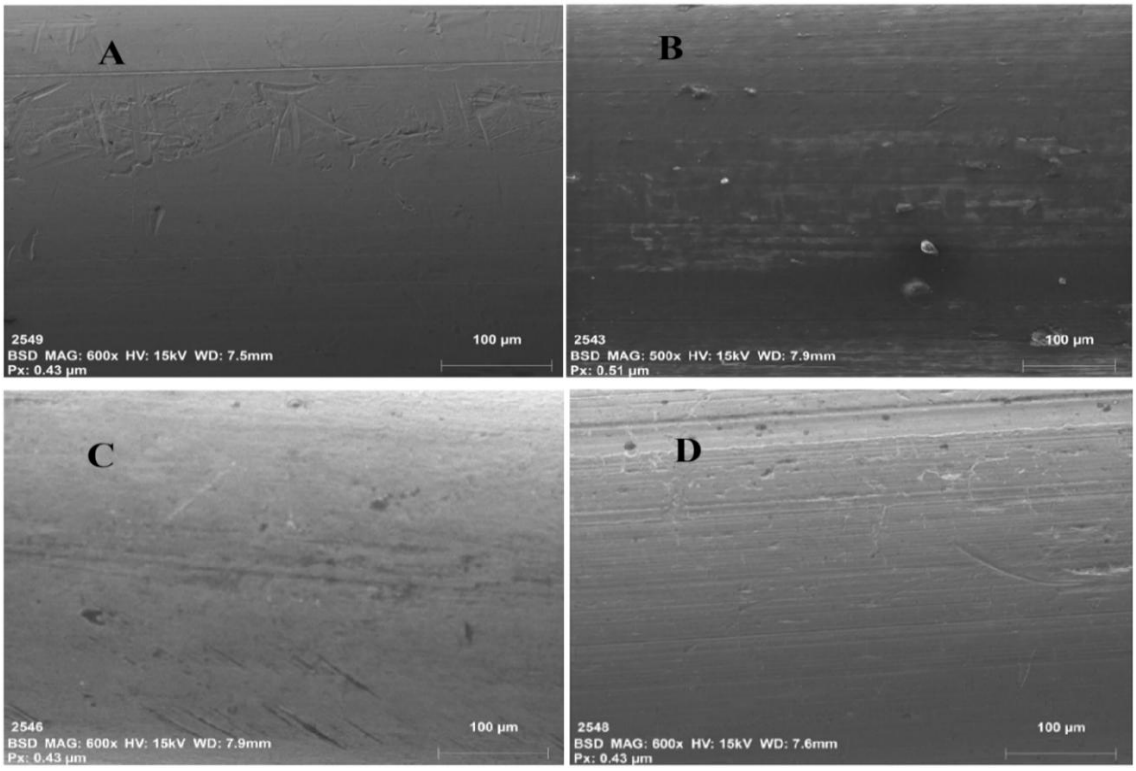
Şekil 3.7. Prob redoks çözeltisi içerisindeki üçlü elektrot sistemi

BÖLÜM 4

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

4.1. Biyosensör Tasarımında Kullanılan İletken Tellerin SEM Analizi

Tasarlanan biyosensördeki karbon pasta çalışma elektrodunun potansiyostat bağlantısını oluşturan altın, bakır, kalay kaplı bakır ve platin telleri için taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi yapılarak tel numunelerinin yüzey görüntüleri elde edilmiştir.

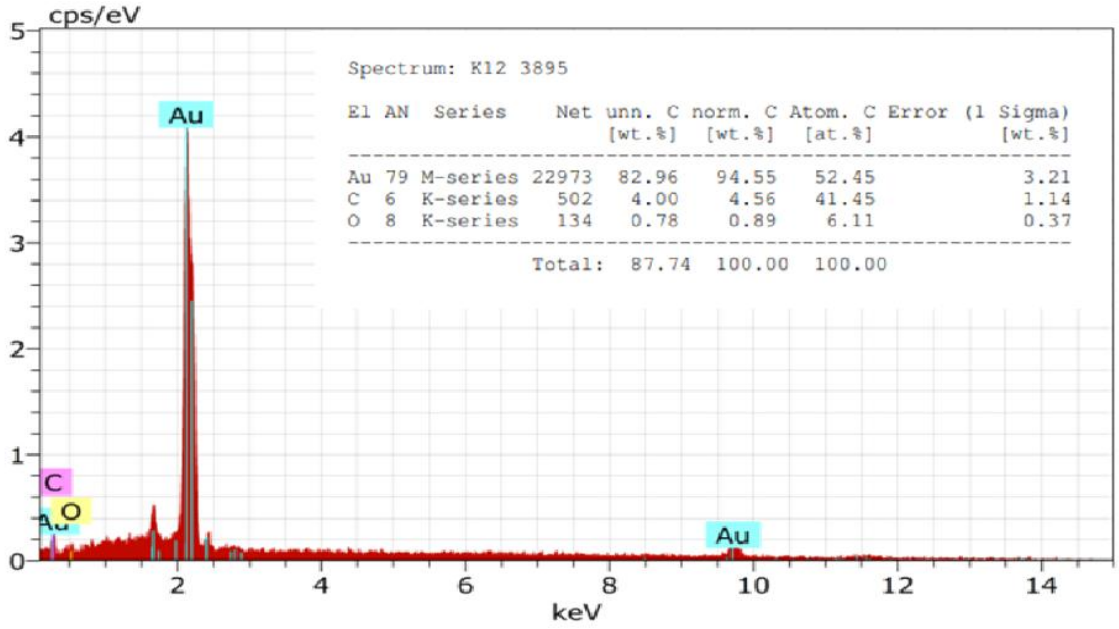


Şekil 4.1. Tasarlanan biyosensördeki karbon pasta çalışma elektrodunun potansiyostat bağlantısını oluşturan tellerin için (SEM) görüntüleri (A: Altın tel, B: Bakır tel, C: Kalay kaplı bakır tel, D: Platin tel)

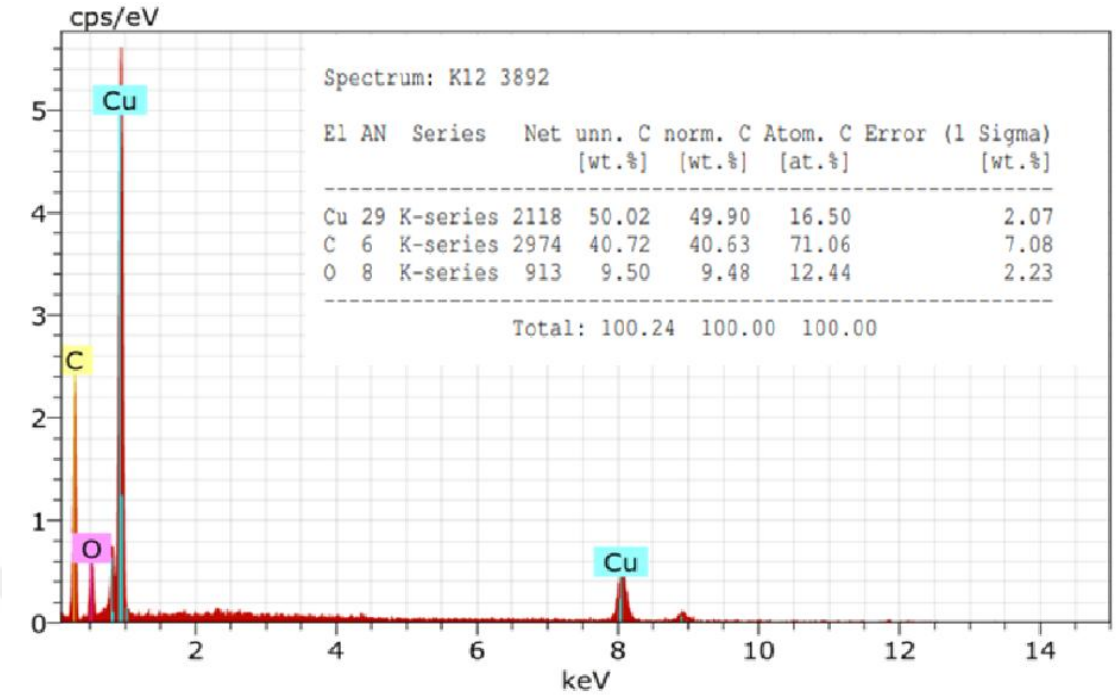
Şekil 4.1 (A)'da tasarlanan biyosensörde kullanılan altın telin, taramalı elektron mikroskobu (SEM) yardımıyla yüzey görüntüsünü göstermektedir. Şekil 4.1 (B)'deki resim SEM yardımıyla bakır telin yüzey görüntüsünü göstermektedir. Şekil 4.1 (C)' deki resim SEM yardımıyla kalay kaplı bakır telin yüzey görüntüsünü göstermektedir. Son olarak Şekil 4.1 (D)'deki resimde platin telin SEM yardımıyla yüzey görüntüsünü göstermektedir. Her bir telin farklı elementlerden oluşmasından dolayı görüntü farklılıkları gözlemlenmiştir.

4.2. Biyosensör Tasarımında Kullanılan İletken Tellerin EDX Analizi

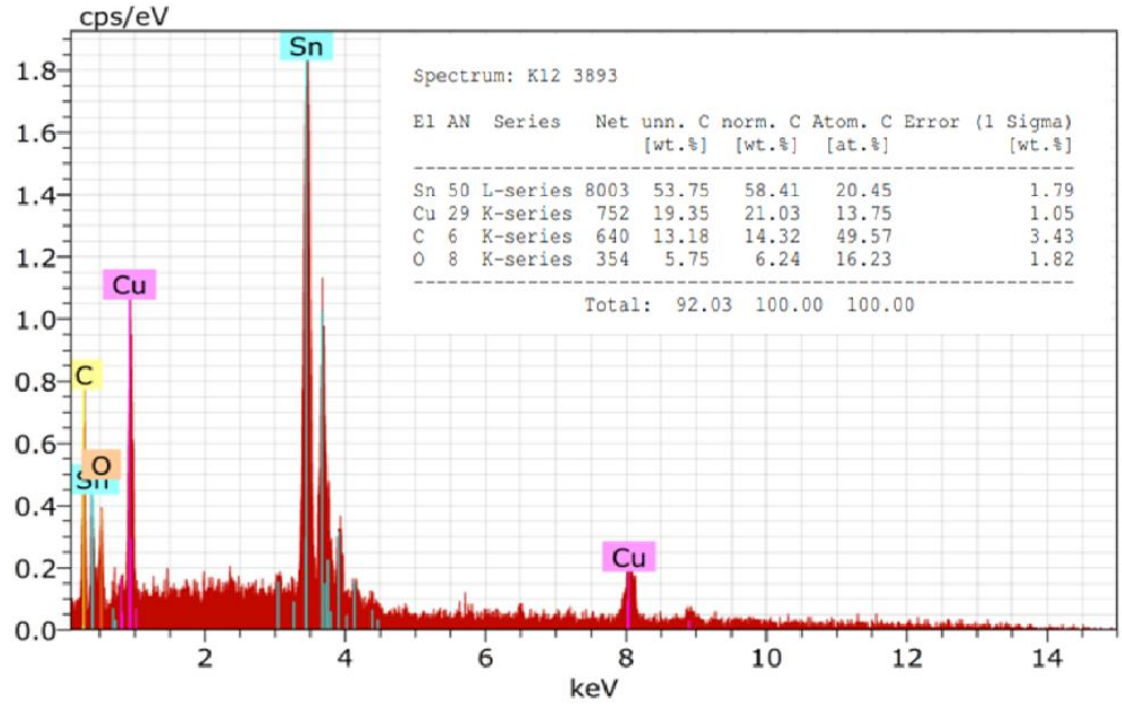
Biyosensör tasarımında kullanılan iletken tellerin element içeriğini belirlemek için EDX analizleri gerçekleştirildi. Şekil 4.2'de altın telin yüzeyindeki elementel dağılımını gösteren EDX spektrumları ve sonuçları, Şekil 4.3'te bakır telin yüzeyindeki elementel dağılımını gösteren EDX spektrumları ve sonuçları, Şekil 4.4'te kalay kaplı bakır telin yüzeyindeki elementel dağılımını gösteren EDX spektrumları ve sonuçları ve Şekil 4.5'te platin telin yüzeyindeki elementel dağılımını gösteren EDX spektrumları ve sonuçları verilmiştir.



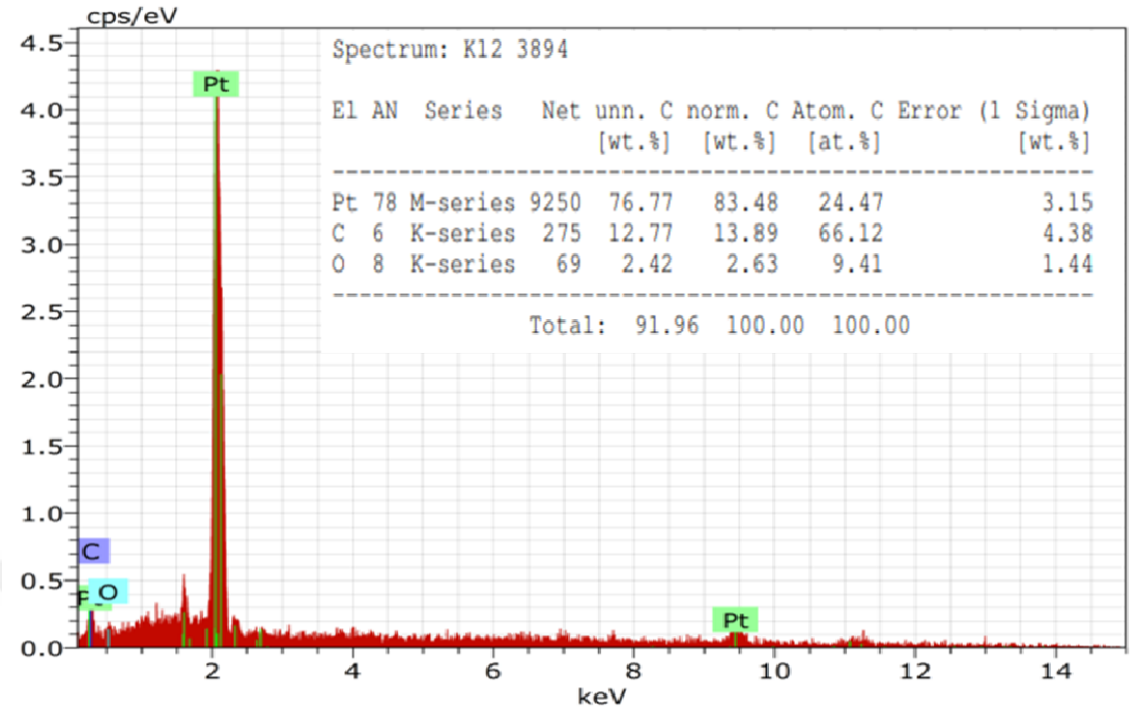
Şekil 4.2. Tasarlanan biyosensördeki karbon pasta çalışma elektrodunun potansiyostat bağlantısını oluşturan altın telin EDX spektrumları ve sonuçları



Şekil 4.3. Tasarlanan biyosensördeki karbon pasta çalışma elektrodunun potansiyostat bağlantısını oluşturan bakır telin EDX spektrumları ve sonuçları



Şekil 4.4. Tasarlanan biyosensördeki karbon pasta çalışma elektrodunun potansiyostat bağlantısını oluşturan kalay kaplı bakır telin EDX spektrumları ve sonuçları

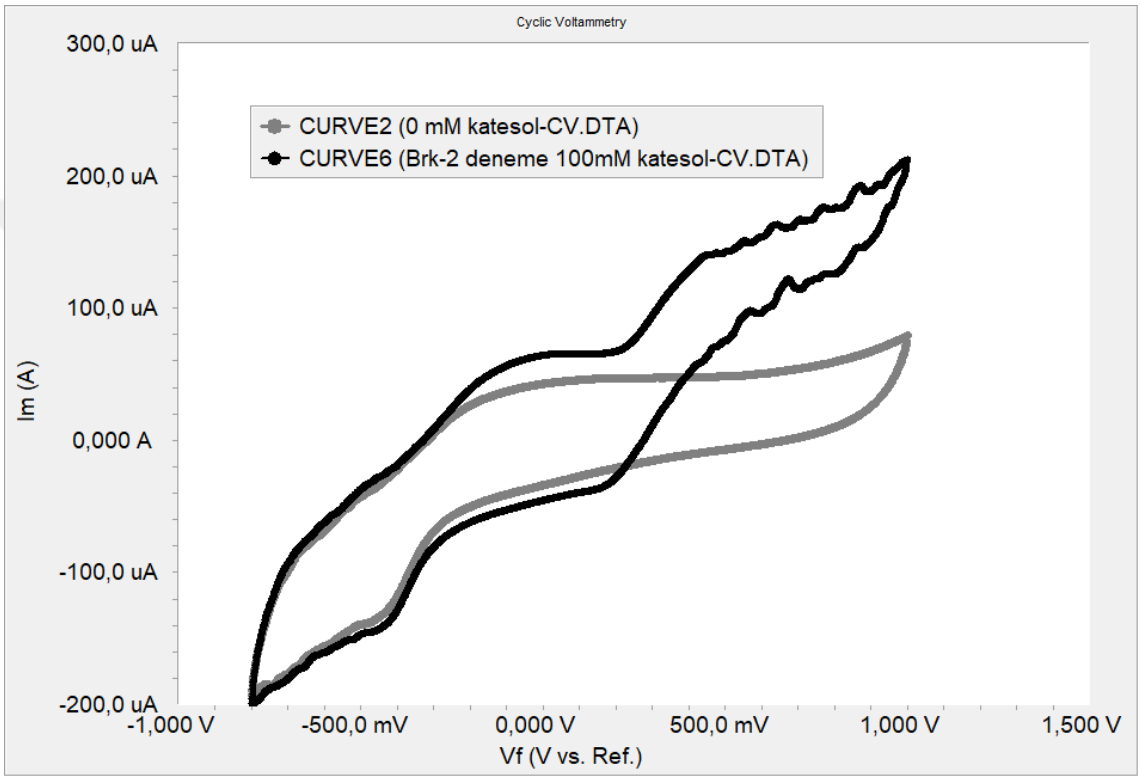


Şekil 4.5. Tasarlanan biyosensördeki karbon pasta çalışma elektrodunun potansiyostat bağlantısını oluşturan platin telin EDX spektrumları ve sonuçları

Şekil 4.2'de gösterilen spektrum ve sonuçlar incelendiğinde kullanılan altın telin % 94,55 oranında altın elementi içerdiği tespit edildi. Spektrumda görülen karbon pikinin altın telin üretim aşamasından kaynaklandığı, oksijen elementine ait pikin ise vakum ortamından kaynaklandığı düşünülebilir. Şekil 4.3'te verilen spektrum ve sonuçlar incelendiğinde kullanılan bakır telin % 49,9 bakır, % 40,63 C ve % 9,48 O elementlerini içerdiği tespit edildi. Spektrumda görülen karbon pikinin bakır telin üretim aşamasından kaynaklandığı, oksijen elementine ait pikin ise bakırın oksidasyonundan kaynaklandığı düşünülebilir. Şekil 4.4'te verilen spektrum ve sonuçlar incelendiğinde kullanılan kalay kaplı bakır telin % 58,41 Sn, % 21,03 Cu, % 14,32 C ve % 6,24 O elementlerini içerdiği tespit edildi. Spektrumda görülen karbon pikinin kalay kaplı bakır telin üretim aşamasından kaynaklandığı, oksijen elementine ait pikin ise bakırın ve kalayın oksidasyonundan kaynaklandığı düşünülebilir. Son olarak Şekil 4.5'te verilen spektrum ve sonuçlar incelendiğinde kullanılan platin % 83,48 oranında platin elementi içerdiği tespit edildi. Spektrumda görülen karbon pikinin platin telin üretim aşamasından kaynaklandığı, oksijen elementine ait pikin ise vakum ortamınından kaynaklandığı düşünülebilir.

4.3. Tasarlanan Biyosensörler İçin Çalışma Potansiyelinin Belirlenmesi

Tasarlanan biyosensörler ile kateşolün amperometrik analizinde kullanılacak olan çalışma potansiyelinin belirlenmesi için; pH 6,0 50 mM fosfat tamponu kullanılarak, 40°C sıcaklıkta 50 mV/s tarama hızında -1,0 - 1,0 V potansiyel aralığında CV taramaları gerçekleştirildi ve kateşol varlığına bağlı olarak döngüsel voltamogramlarındaki değişimler gözlendi (Şekil 4.6).

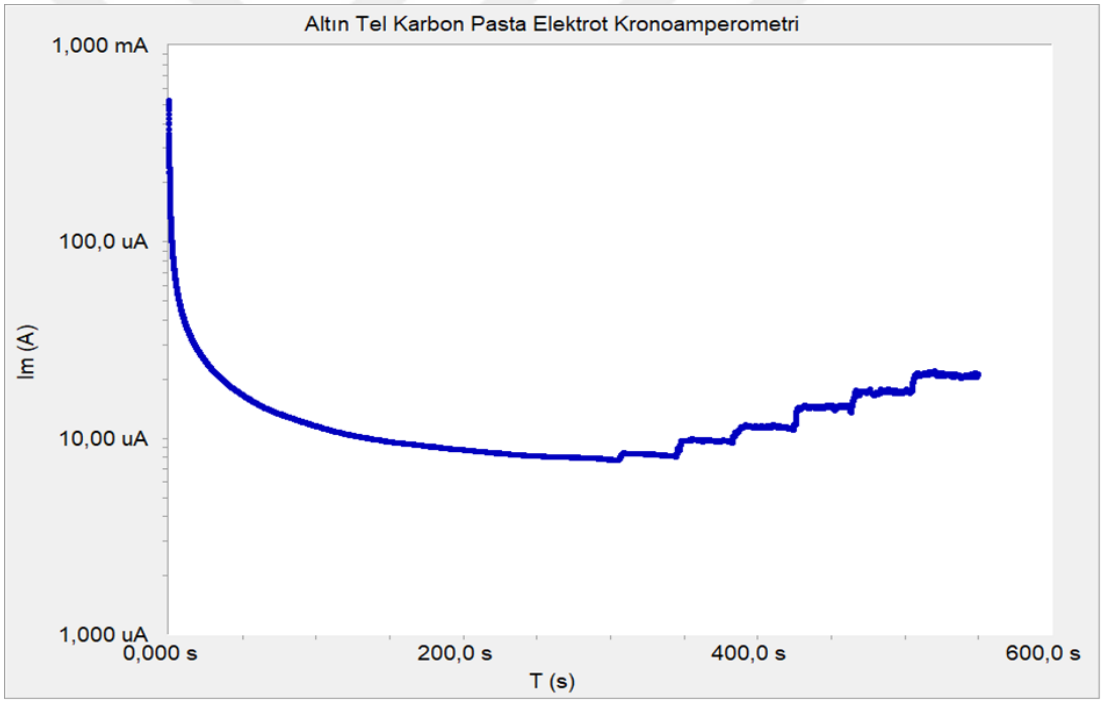


Şekil 4.6. Kateşol varlığı ve yokluğunda elde edilen döngüsel voltamogramlar

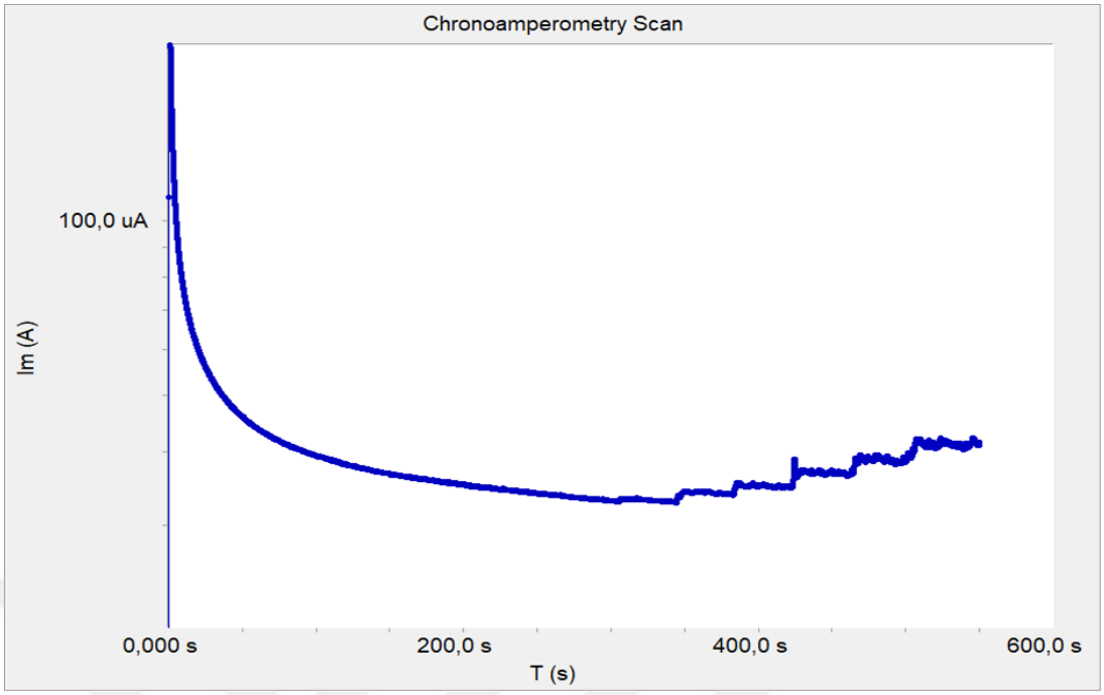
Şekil 4.6'deki döngüsel voltamogramlar incelendiğinde, reaksiyon ortamına eklenen kateşol çözeltisi ile birlikte -0,3 – 1,0 V potansiyel aralığında katodik akımda yükselmeler olduğu akım yükselmelerinin 0,2 – 1,0 V potansiyel aralığında çok belirgin olduğu gözlendi. Bu durum, tasarlanan biyosensörün ortamdaki kateşol varlığına cevap verdiğini kanıtlamaktadır. Elde edilen sonuçlar ve literatür incelemesi sonucunda çalışma potansiyeli +0,7 V olarak seçildi.

4.4. Tasarlanan Biyosensörlerin Cevap Süresinin Belirlenmesi

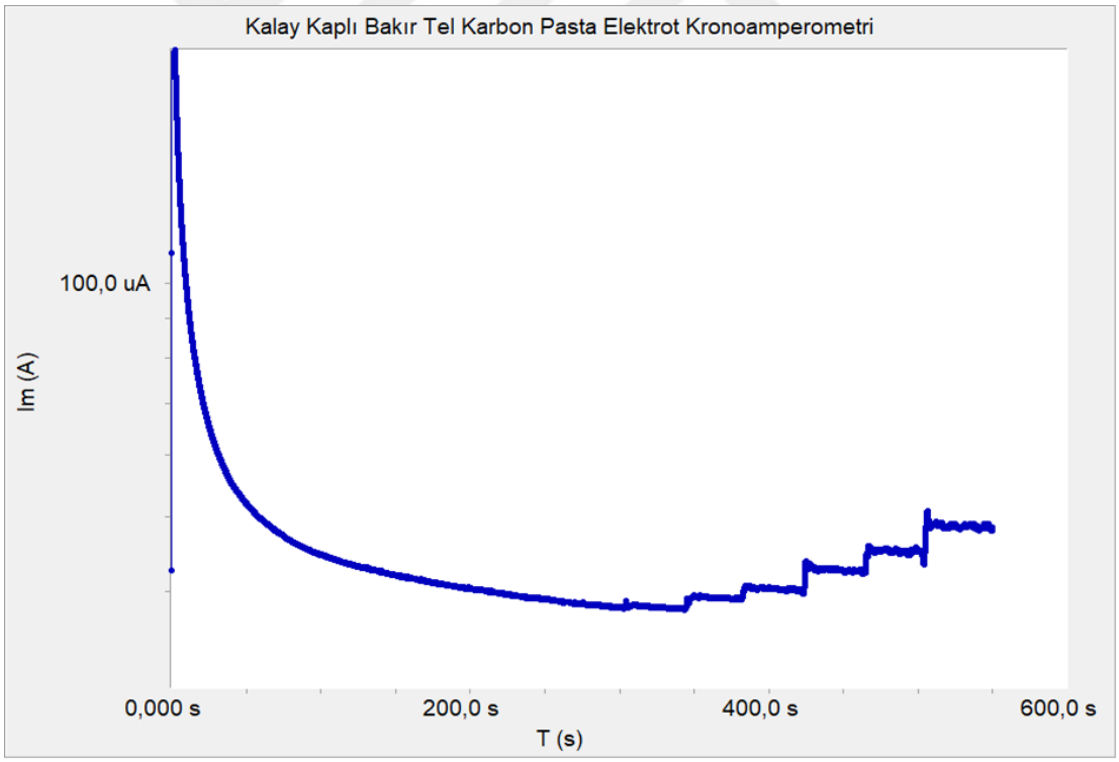
Tasarlanan biyosensörlerin cevap süresi, biyosensörlerin doğrusal tayin aralığı için gerçekleştirilen çalışmalarla belirlendi. Şekil 4.7'de altın tel, Şekil 4.8'de bakır tel, Şekil 4.9'da kalay kaplı bakır tel ve Şekil 4.10'da platin tel kullanılarak hazırlanan biyosensörler ile 5-95 µM kateşol derişimi aralığında elde edilen kronoamperometri grafikleri verildi. Bu grafikler incelendiğinde, +0,7 V sabit potansiyelde devreden geçen akım sabitlendikten sonra, reaksiyon hücresine kateşol çözeltisinin eklenmesi ile devreden geçen akımın değiştiği görüldü. Devreden geçen akımın sabitlenmesinden sonra kateşol ilavesi - akımın tekrar sabitlenmesi arasında geçen süre biyosensörün cevap süresi olarak kabul edildi. 4 farklı biyosensörle yapılan 24 ölçüm ortalaması alınarak çalışmada tasarlanan tüm biyosensörler için ortalama cevap süresi 40 sn olarak belirlendi.



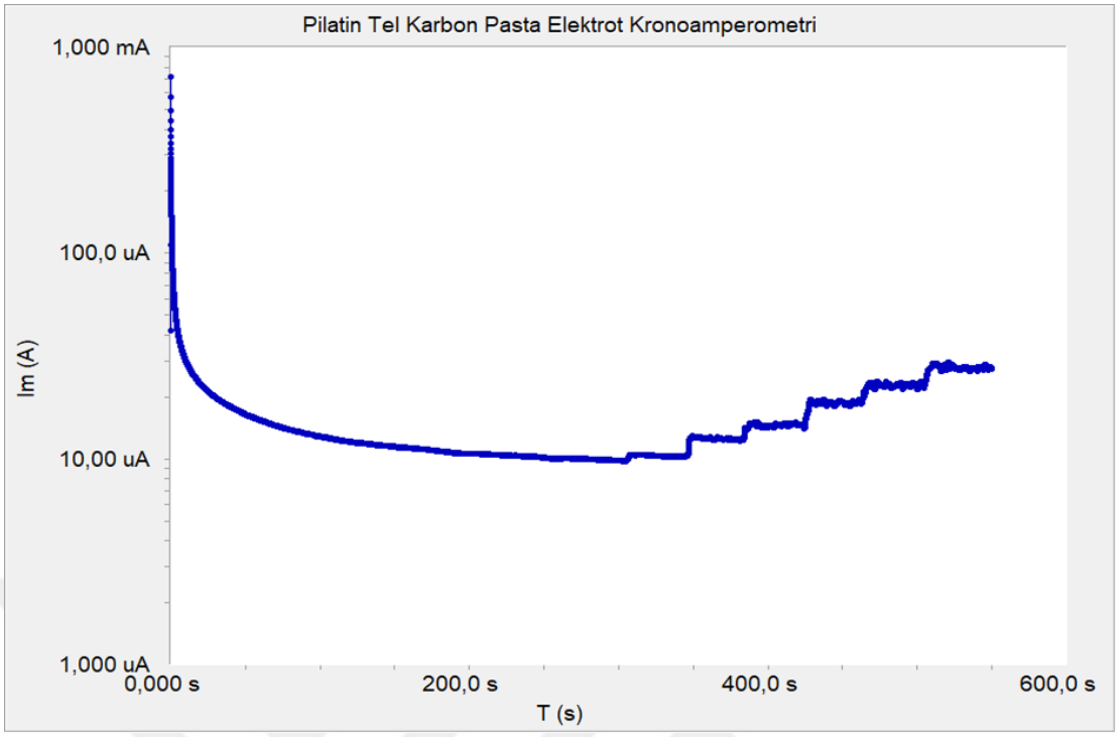
Şekil 4.7. Altın tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün kronoamperometri grafiği



Şekil 4.8. Bakır tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün kronoamperometri grafiği



Şekil 4.9. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün kronoamperometri grafiği



Şekil 4.10. Platin tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün kronoamperometri grafiği

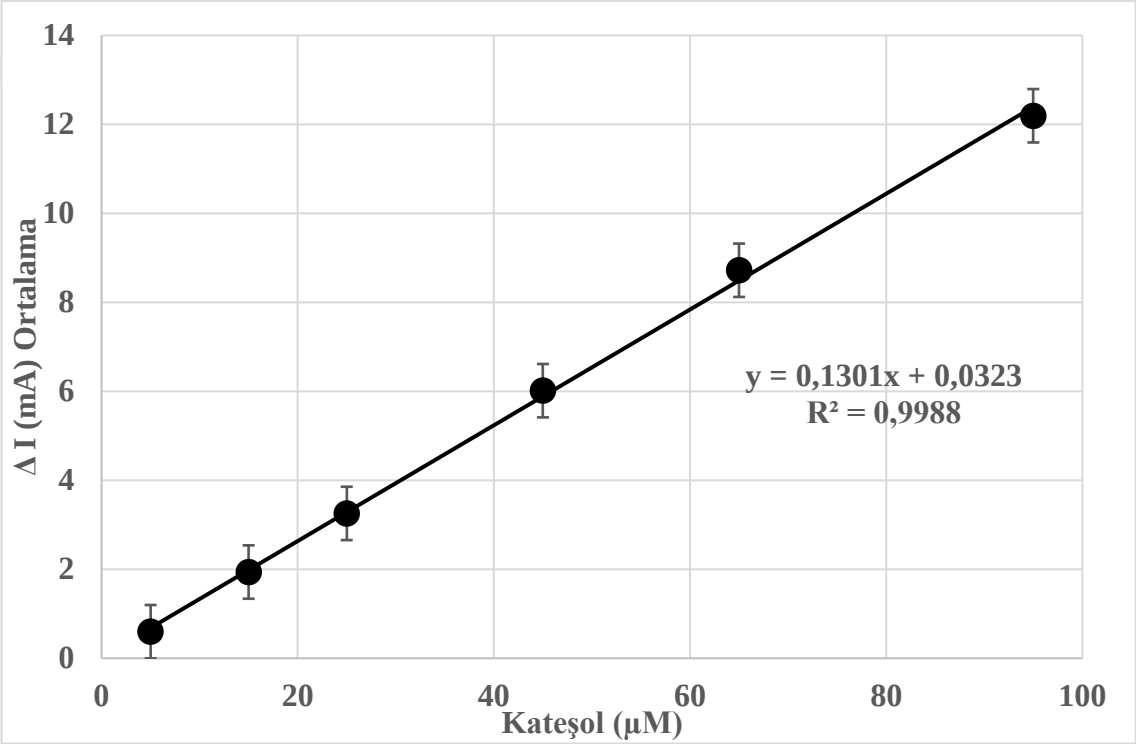
4.5. Kateşol Çözeltisi için Doğrusal Tayin Aralığının Belirlenmesi

Biyosensörler ile gerçekleştirilen ölçümler için doğrusal tayin aralığı, belirli bir varyasyona bağlı olarak çalışılan substrat için elektrot duyarlılığının sabit kaldığı derişim aralığı olarak tanımlanmaktadır. Bu bağlamda biyosensör ile yapılacak olan ölçümlerin, cihazın doğru ve güvenilir bir şekilde sonuç verebilmesi için, bu belirlenen doğrusal derişim aralığında yer alması son derece önemlidir. Özellikle, biyosensörlerin performansı ve ölçüm hassasiyeti, hedef analit derişiminin bu aralık içinde olmasına bağlıdır. Dolayısıyla, biyosensörün doğru çalışabilmesi için, çalışılacak derişim değerleri titizlikle seçilmeli ve bu doğrusal tayin aralığına uygun olmalıdır (Nejem, 2004).

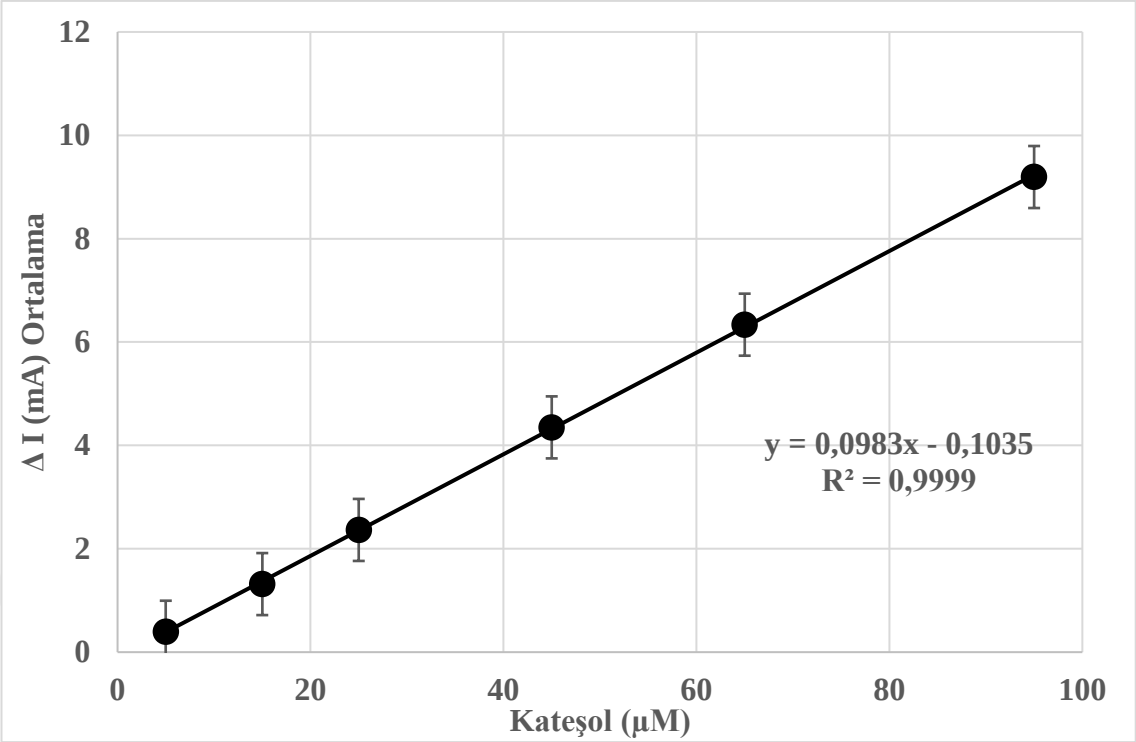
4.5.1. Tasarlanan Biyosensörlerin Kalibrasyon Grafiklerinin ve Tayin Sınırlarının Belirlenmesi

Altın, bakır, kalay kaplı bakır ve platin tel kullanılarak her bir tel için hazırlanan 10'ar farklı biyosensör ile 5-95 µM kateşol derişim aralığında 6 farklı kateşol derişiminde ölçümler gerçekleştirildi. Kateşol çözelti derişimleri (x ekseni) ve her bir kateşol derişimi

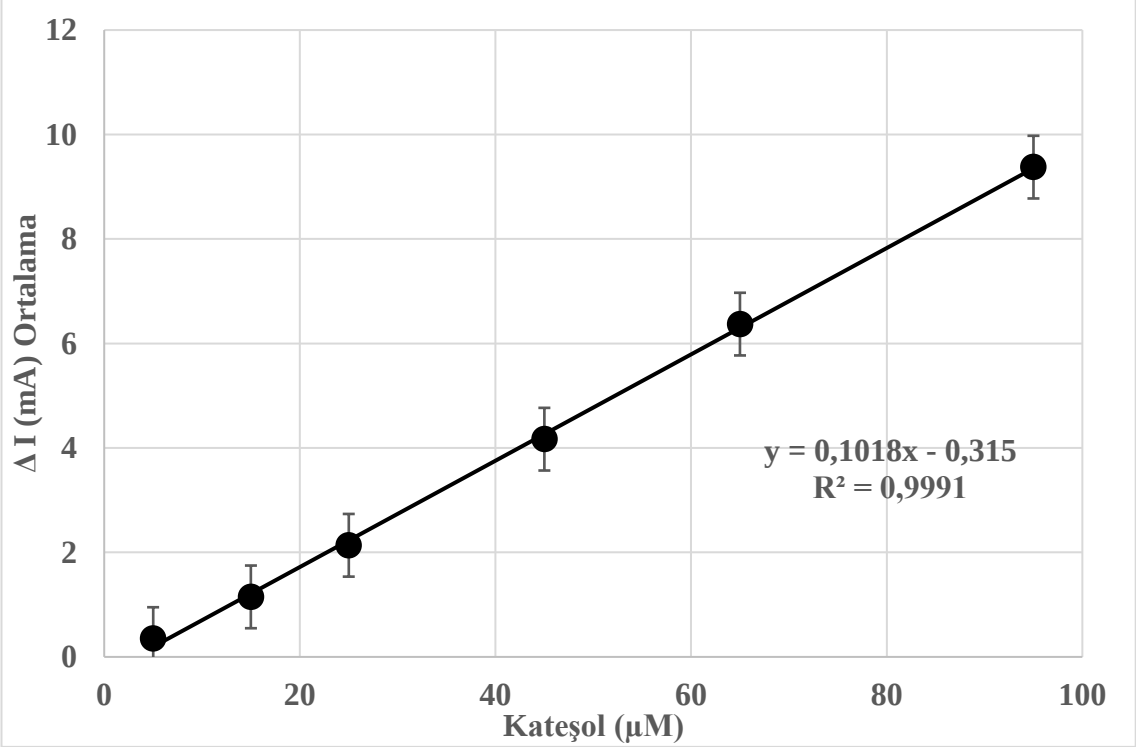
için elde edilen akım farkları (y ekseni) kullanılarak kalibrasyon grafikleri hazırlandı. Kalibrasyon grafiğinin hazırlanmasında 6 farklı kateşol derişimde 10 farklı biyosensör ile elde edilen cevapların ortalaması kullanıldı. Altın, bakır, kalay kaplı bakır ve platin tel kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin kalibrasyon grafikleri sırasıyla Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te verildi. Doğrusallık katsayısı değerleri sırasıyla 0,9888, 0,9999, 0,9991, 0,9998 olarak, LOD değerleri sırasıyla 2,003, 1,040, 2,533 ve 1,112 µM olarak hesaplandı. Grafikler incelendiğinde her bir farklı tel ile üretilen biyosensörün kateşolü 5-95 µM derişim aralığında başarıyla tayin edebildiği gösterildi.



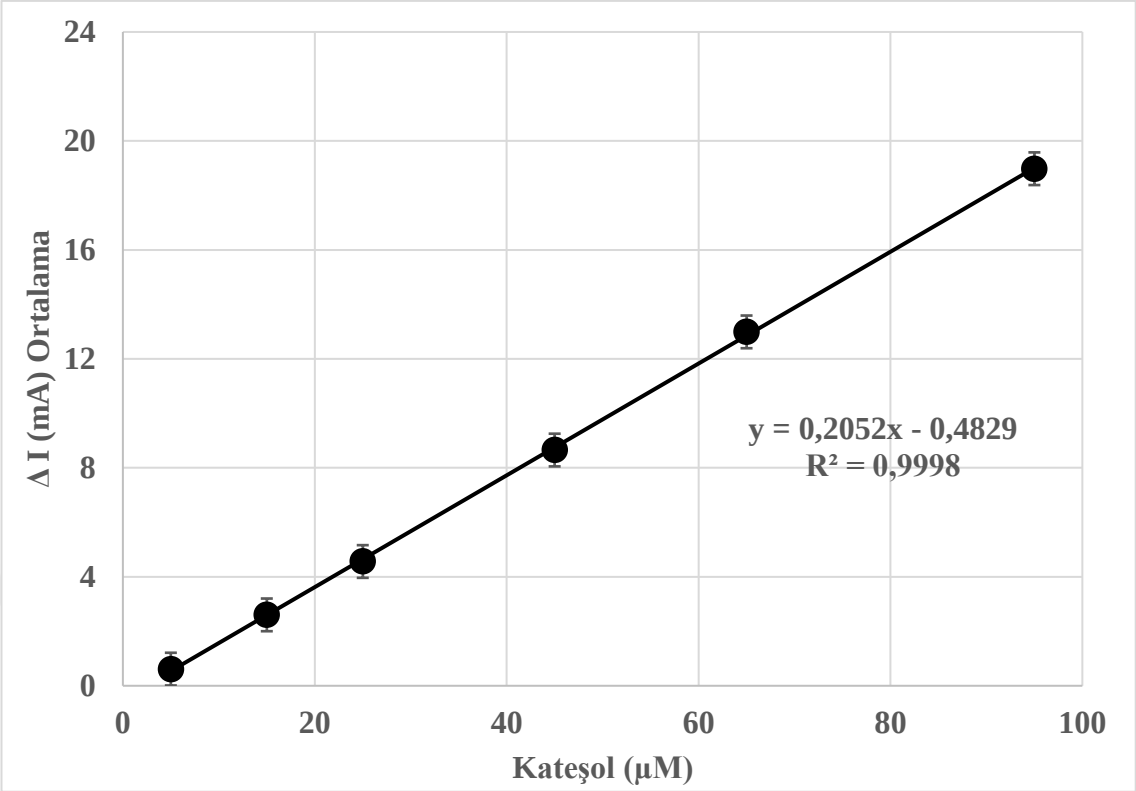
Şekil 4.11. Altın tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün kalibrasyon grafiği



Şekil 4.12. Bakır tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün kalibrasyon grafiği



Şekil 4.13. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün kalibrasyon grafiği

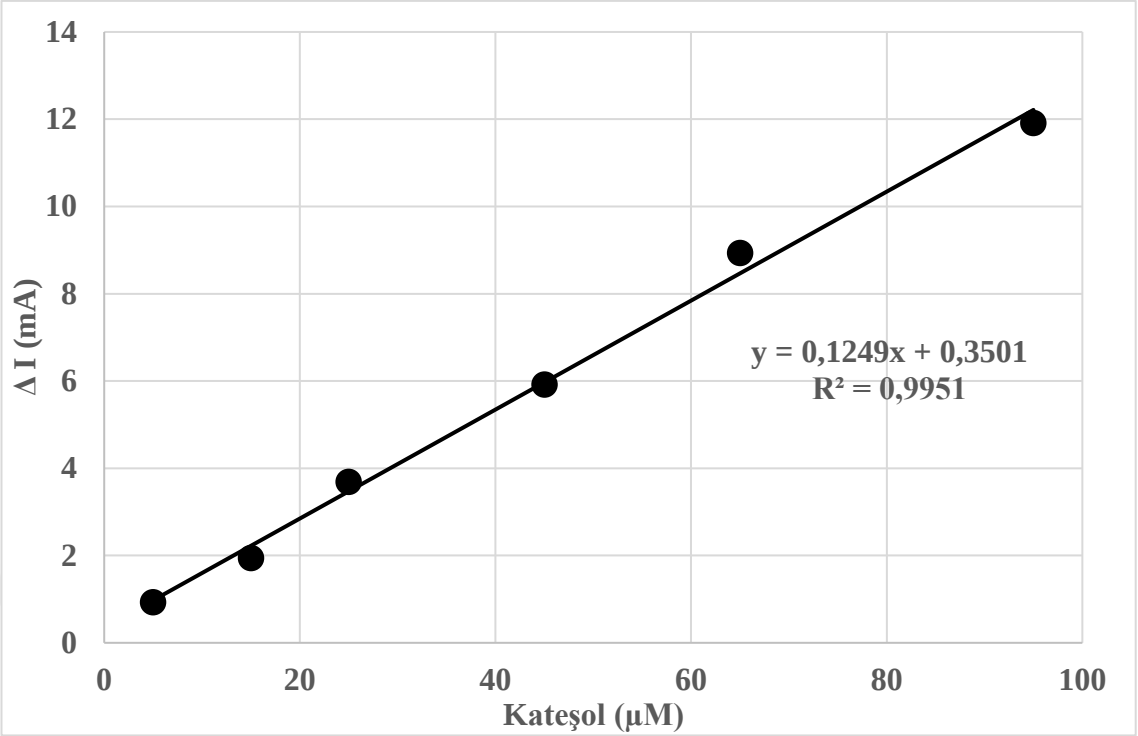


Şekil 4.14. Platin tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün kalibrasyon grafiği

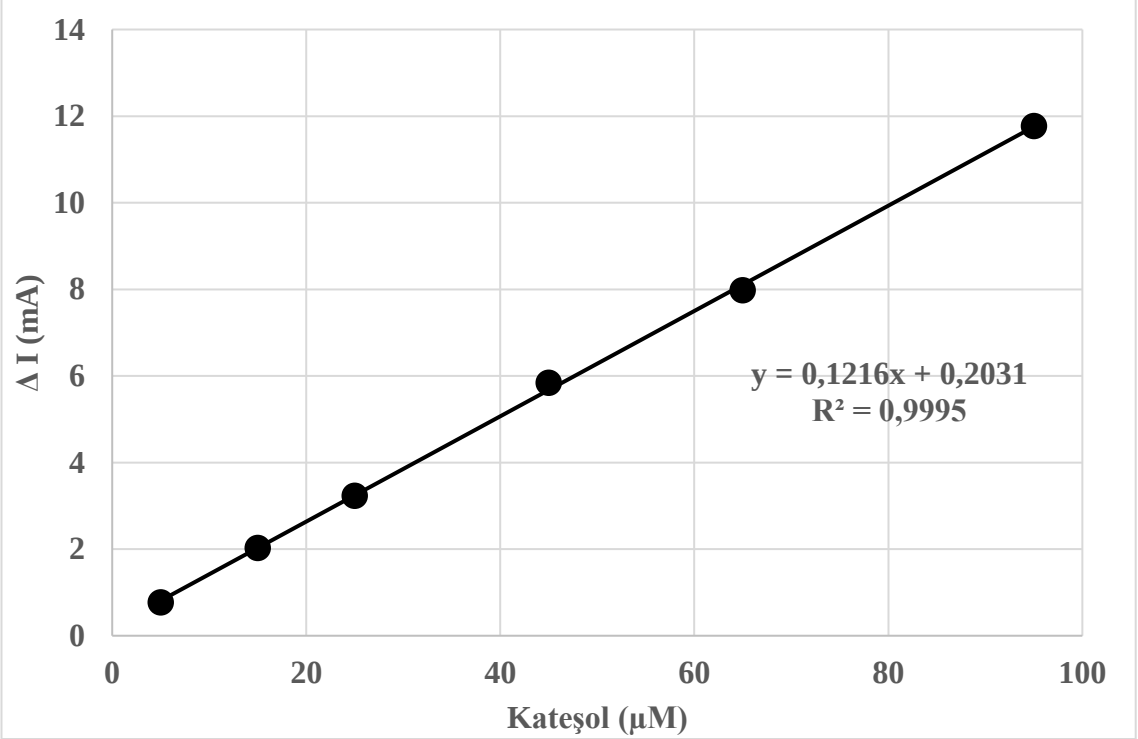
4.6. Tasarlanan Biyosensörlerin Tekrar Üretilebilirliklerinin İncelenmesi

4.6.1. Altın tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün tekrar üretilebilirliği

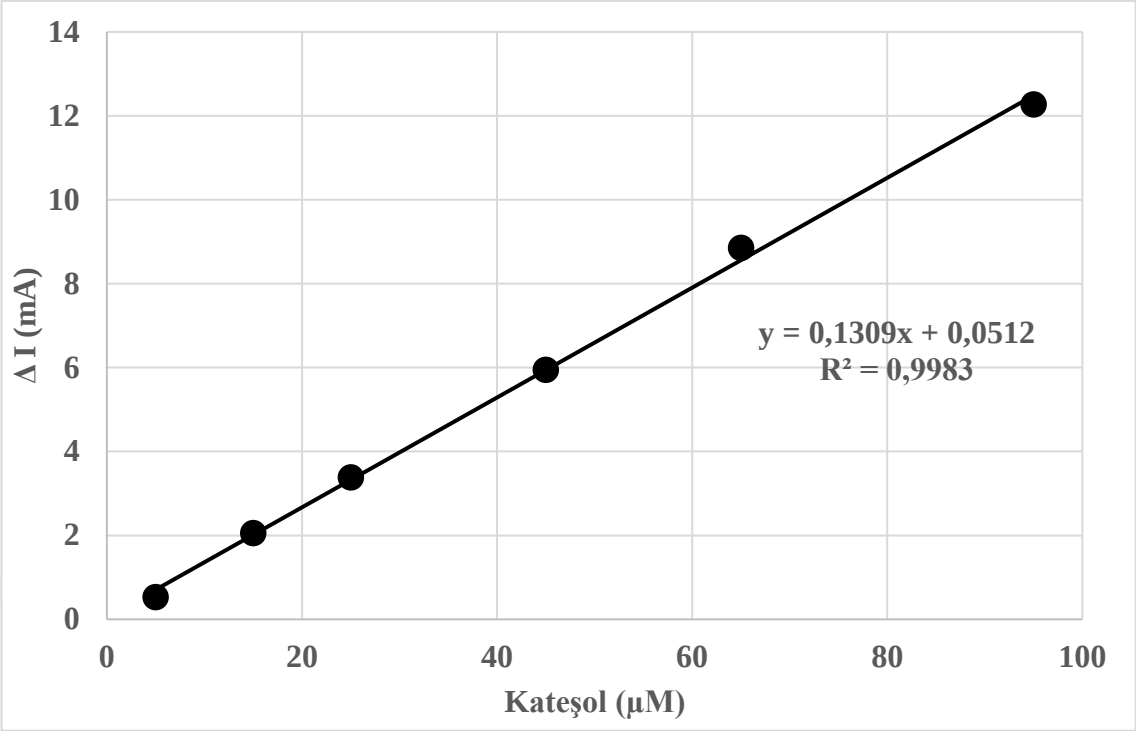
Altın tel kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin tekrar üretilebilirliğinin incelenmesi amacıyla 10 farklı biyosensör hazırlandı ve 5-95 µM kateşol derişim aralığında, pH 6,0 50 mM fosfat tamponu kullanılarak, 40°C sıcaklıktaki çalışma koşullarında +0,7 V sabit potansiyelde ölçümler alındı. Elde edilen sonuçlar kullanılarak her bir biyosensör için kalibrasyon grafikleri çizildi ve bu grafiklerden yararlanılarak, doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları hesaplanandı. Altın tel kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin kalibrasyon grafikleri Şekil 4.15 - Şekil 4.24'te verildi. Şekil 4.25'te ise altın tel kullanılarak hazırlanan 10 farklı biyosensörün kalibrasyon eğrileri tek bir grafikte gösterildi.



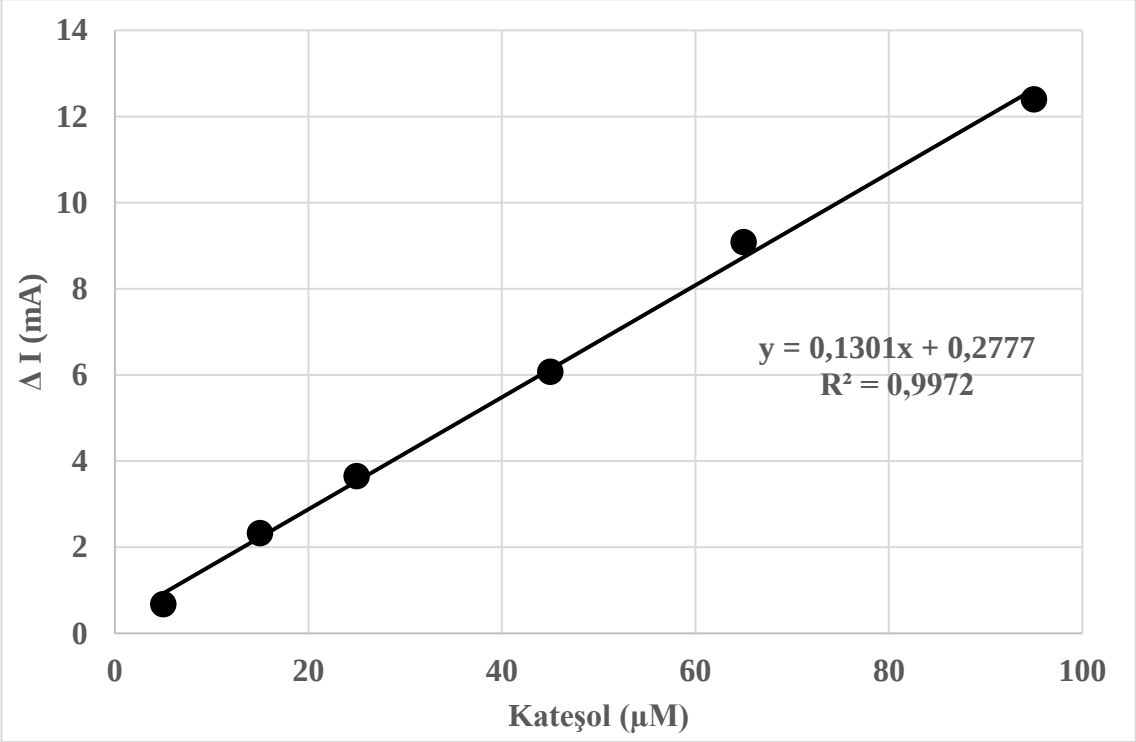
Şekil 4.15. Altın tel kullanılarak hazırlanan 1. biyosensörün kalibrasyon grafiği



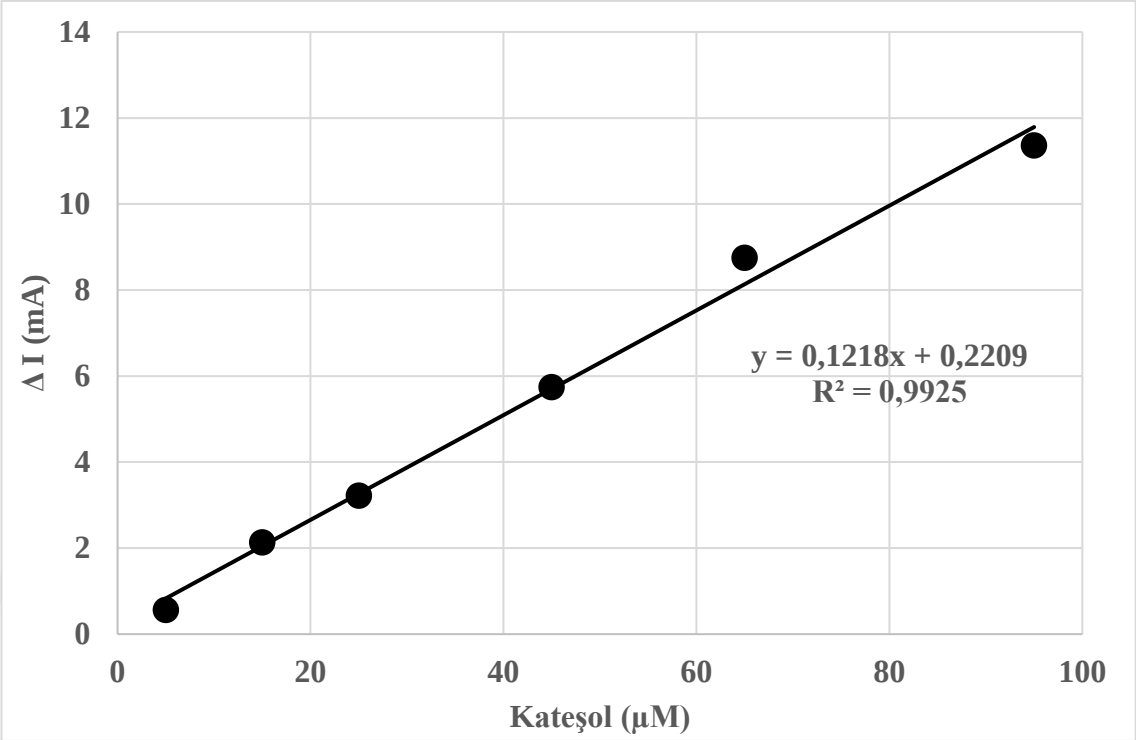
Şekil 4.16. Altın tel kullanılarak hazırlanan 2. biyosensörün kalibrasyon grafiği



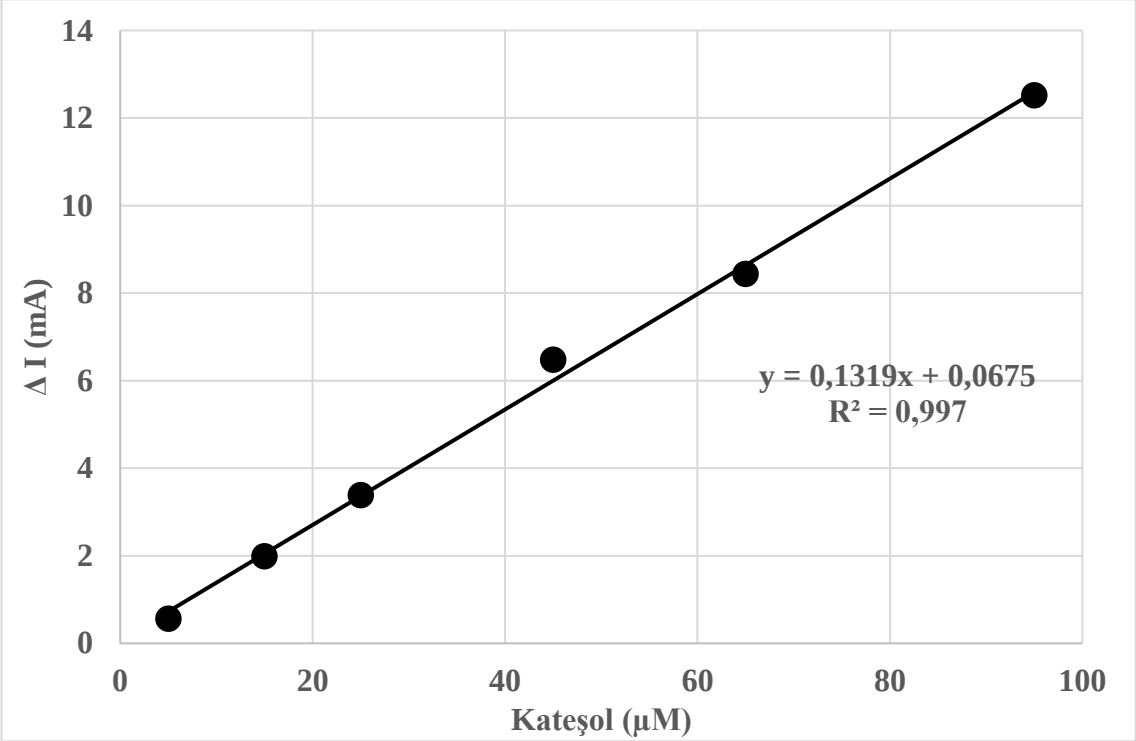
Şekil 4.17. Altın tel kullanılarak hazırlanan 3. biyosensörün kalibrasyon grafiği



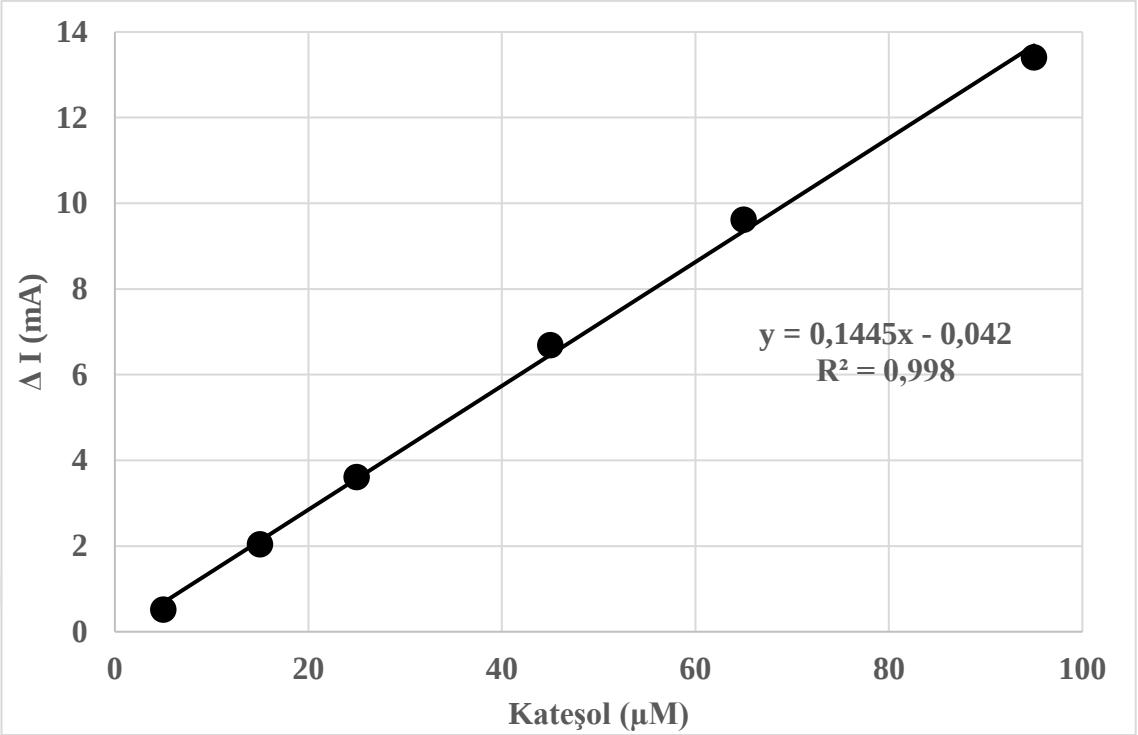
Şekil 4.18. Altın tel kullanılarak hazırlanan 4. biyosensörün kalibrasyon grafiği



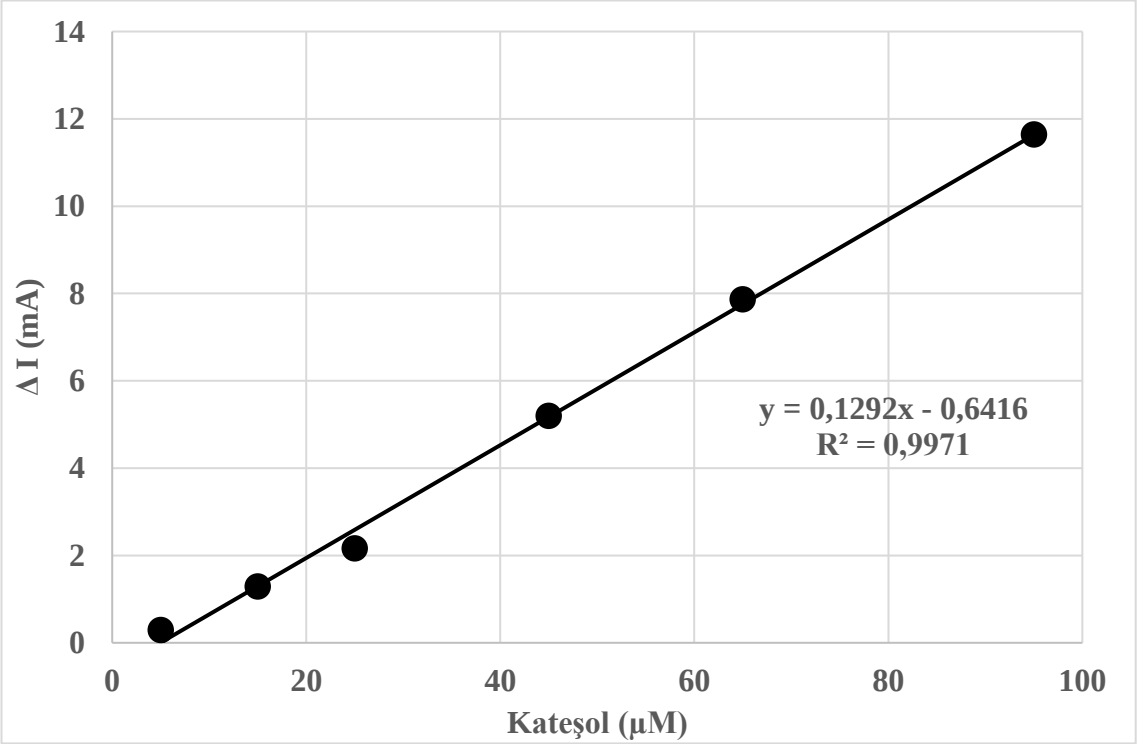
Şekil 4.19. Altın tel kullanılarak hazırlanan 5. biyosensörün kalibrasyon grafiği



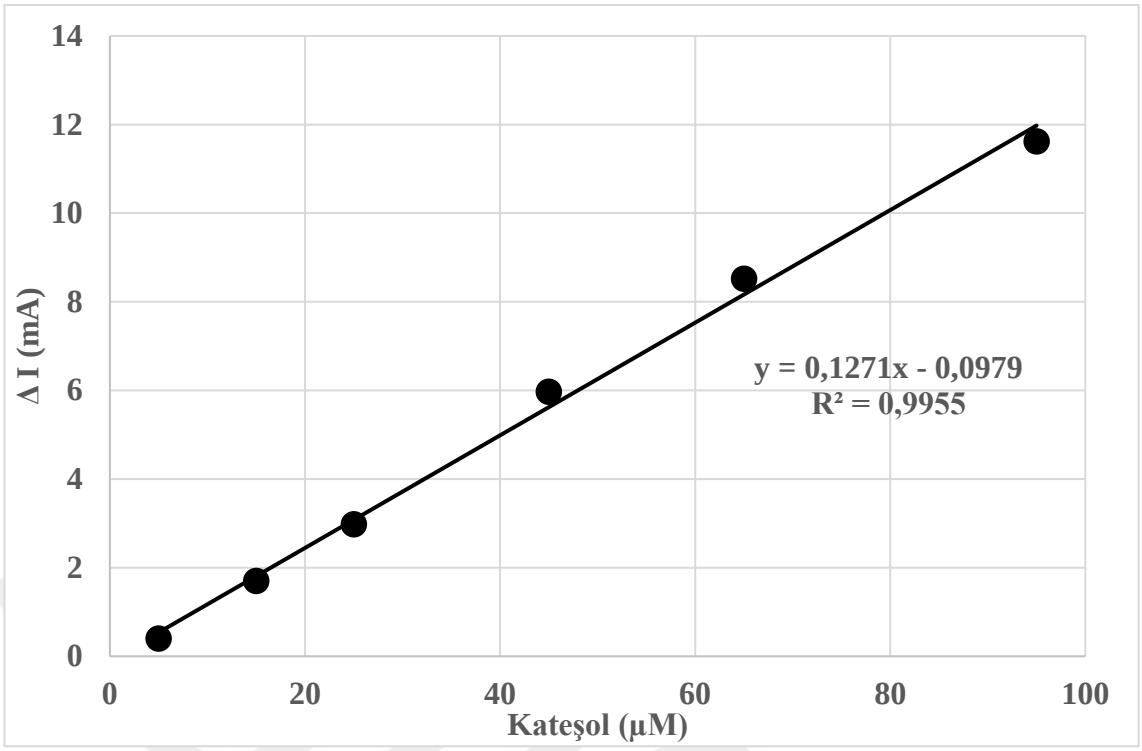
Şekil 4.20. Altın tel kullanılarak hazırlanan 6. biyosensörün kalibrasyon grafiği



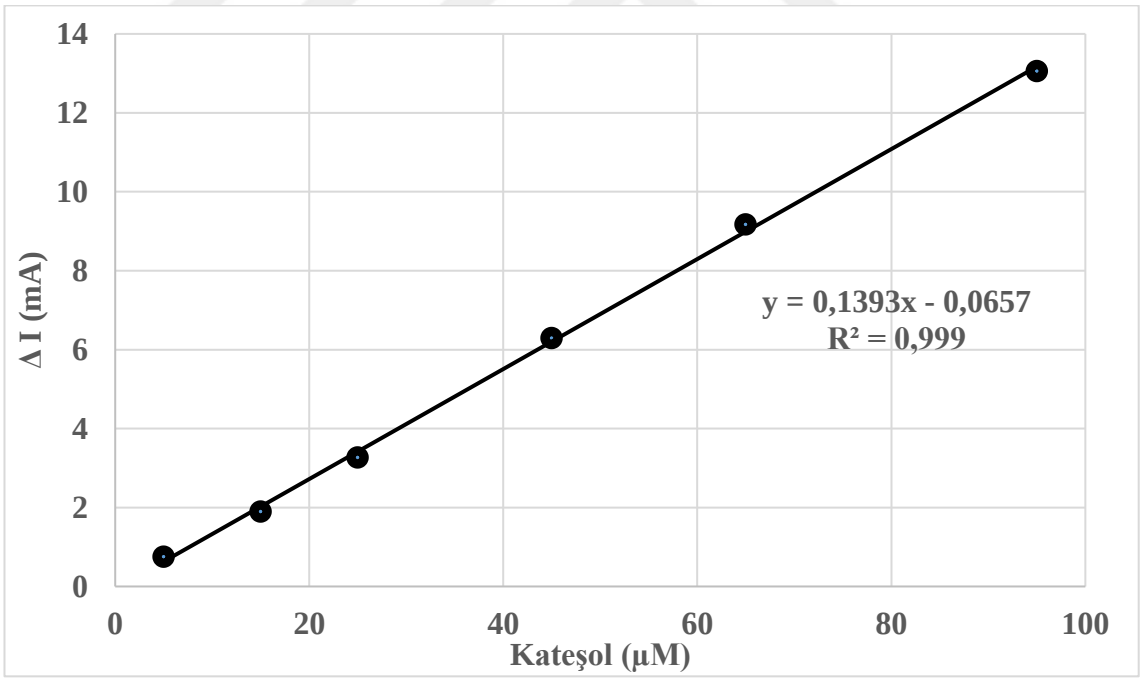
Şekil 4.21. Altın tel kullanılarak hazırlanan 7. biyosensörün kalibrasyon grafiği



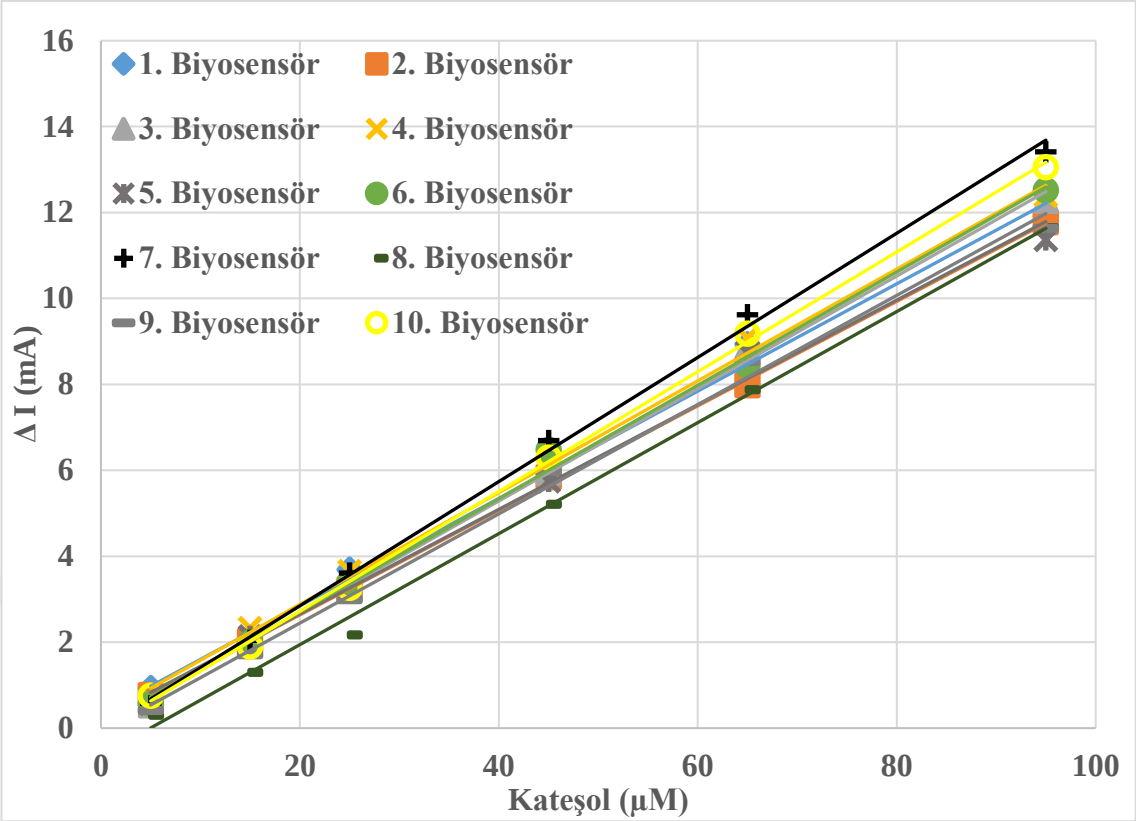
Şekil 4.22. Altın tel kullanılarak hazırlanan 8. biyosensörün kalibrasyon grafiği



Şekil 4.23. Altın tel kullanılarak hazırlanan 9. biyosensörün kalibrasyon grafiği



Şekil 4.24. Altın tel kullanılarak hazırlanan 10. biyosensörün kalibrasyon grafiği



Şekil 4.25. Tasarlanan biyosensördeki karbon pasta çalışma elektrodunun potansiyostat bağlantısını oluşturan altın tel ile yapılan 10 farklı çalışmanın tek bir kalibrasyon grafiği üzerinde gösterilmesi

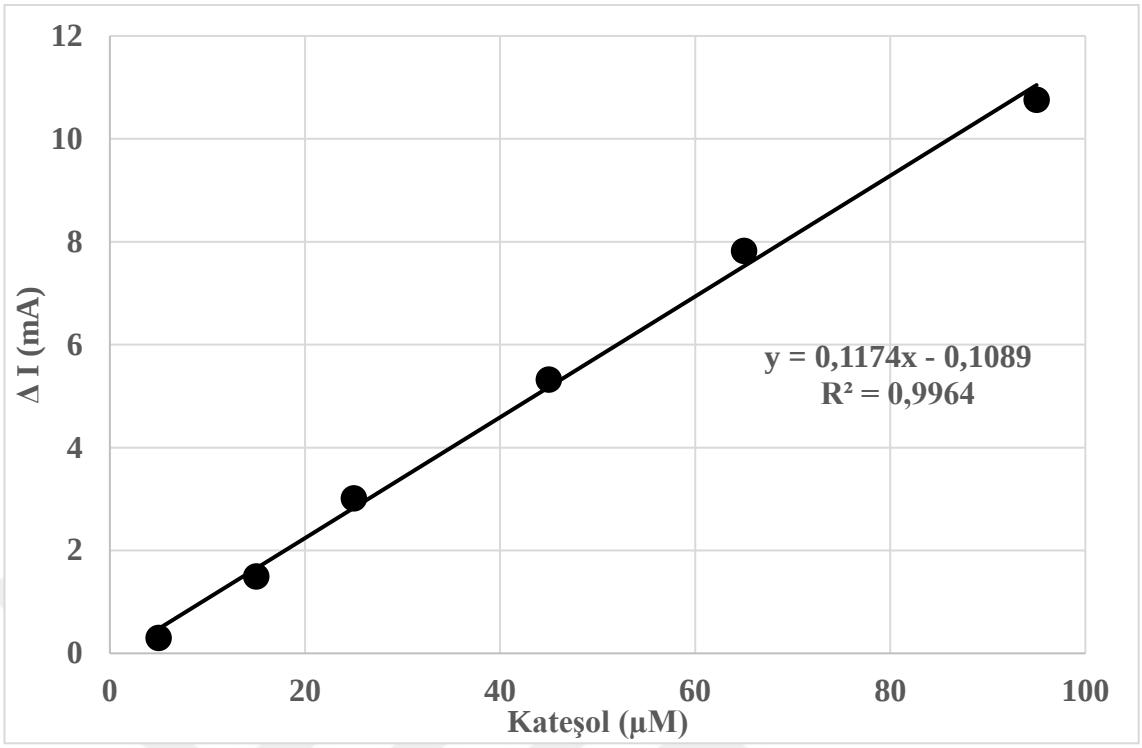
Altın tel kullanılarak hazırlanan 10 farklı biyosensöre ait kalibrasyon grafiklerinden elde edilen doğrusallık katsayıları, doğru denklemleri ve tayin aralıkları Çizelge 4.1'de verildi. Tablodan da görüldüğü gibi altın tel kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin doğru denklemleri birbirleriyle çok uyumlu ve doğrusallık katsayıları oldukça iyidir. Bu sonuçlar tasarlanan biyosensörlerin tekrar üretilebilirliğinin çok iyi olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.1. Altın tel kullanılarak hazırlanan 10 farklı biyosensörün doğrusallık katsayıları, doğru denklemleri ve tayin aralıkları

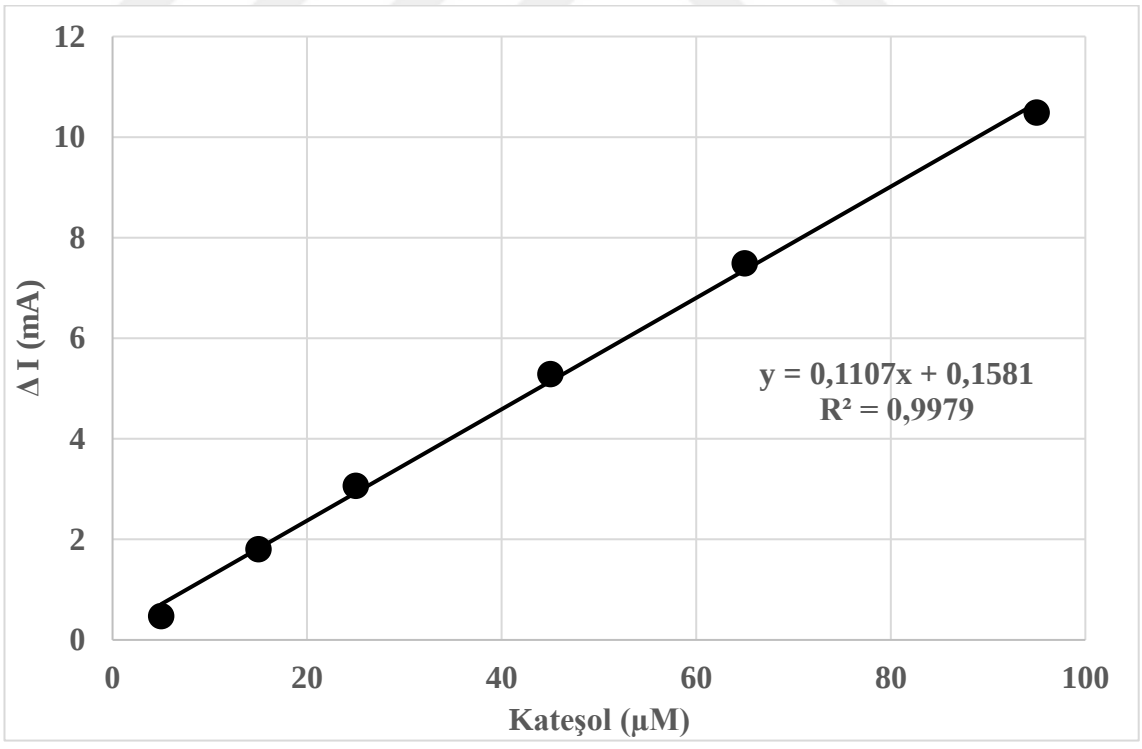
BİYOSENSÖR NUMARASI (ALTIN TEL)	DOĞRU DENKLEMİ	DOĞRUSALLIK KATSAYISI (R^2)	TAYİN ARALIĞI (µM)
1	y = 0,1249x + 0,3501	R^2 = 0,9951	5-95
2	y = 0,1216x + 0,2031	R^2 = 0,9995	5-95
3	y = 0,1309x + 0,0512	R^2 = 0,9983	5-95
4	y = 0,1301x + 0,2777	R^2 = 0,9972	5-95
5	y = 0,1218x + 0,2209	R^2 = 0,9925	5-95
6	y = 0,1319x + 0,0675	R^2 = 0,9970	5-95
7	y = 0,1445x - 0,042	R^2 = 0,9980	5-95
8	y = 0,1292x - 0,6416	R^2 = 0,9971	5-95
9	y = 0,1271x - 0,0979	R^2 = 0,9955	5-95
10	y = 0,1393x - 0,0657	R^2 = 0,9990	5-95

4.6.2. Bakır tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün tekrar üretilebilirliği

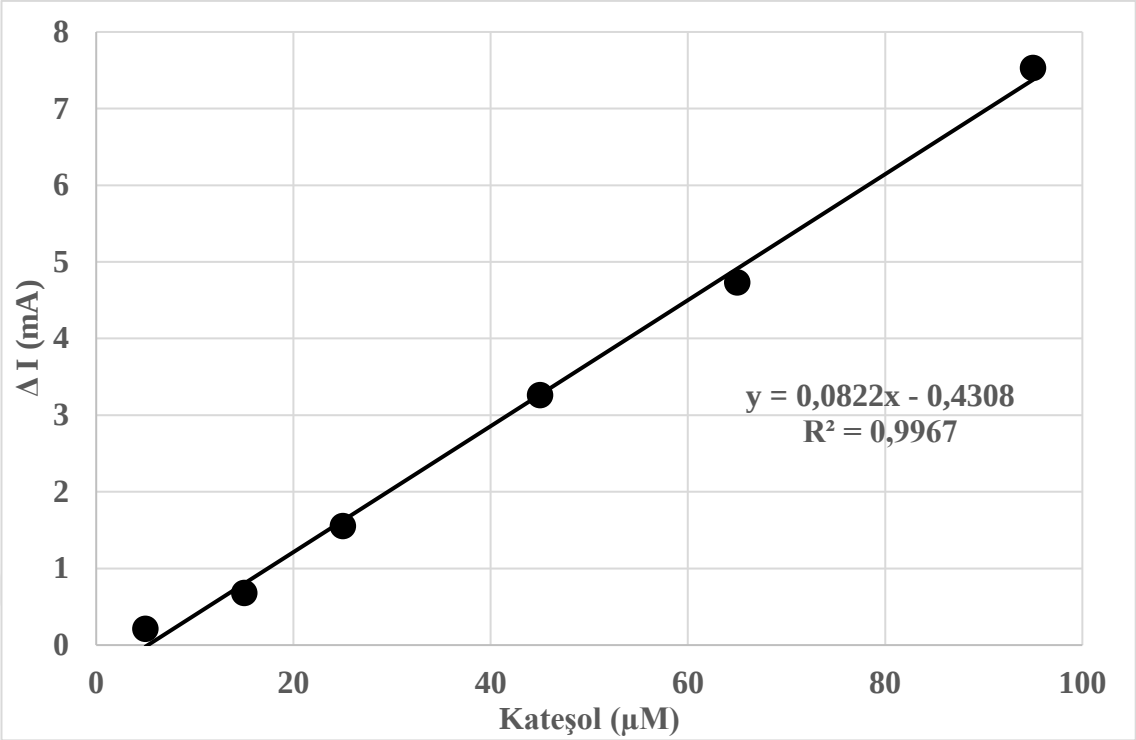
Bakır tel kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin tekrar üretilebilirliğinin incelenmesi amacıyla 10 farklı biyosensör hazırlandı ve 5-95 µM kateşol derişim aralığında, pH 6,0 50 mM fosfat tamponu kullanılarak, 40°C sıcaklıktaki çalışma koşullarında +0,7 V sabit potansiyelde ölçümler alındı. Elde edilen sonuçlar kullanılarak her bir biyosensör için kalibrasyon grafikleri çizildi ve bu grafiklerden yararlanılarak, doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları hesaplanandı. Bakır tel kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin kalibrasyon grafikleri Şekil 4.26 - Şekil 4.35'te verildi. Şekil 4.36'da ise bakır tel kullanılarak hazırlanan 10 farklı biyosensörün kalibrasyon eğrileri tek bir grafikte gösterildi.



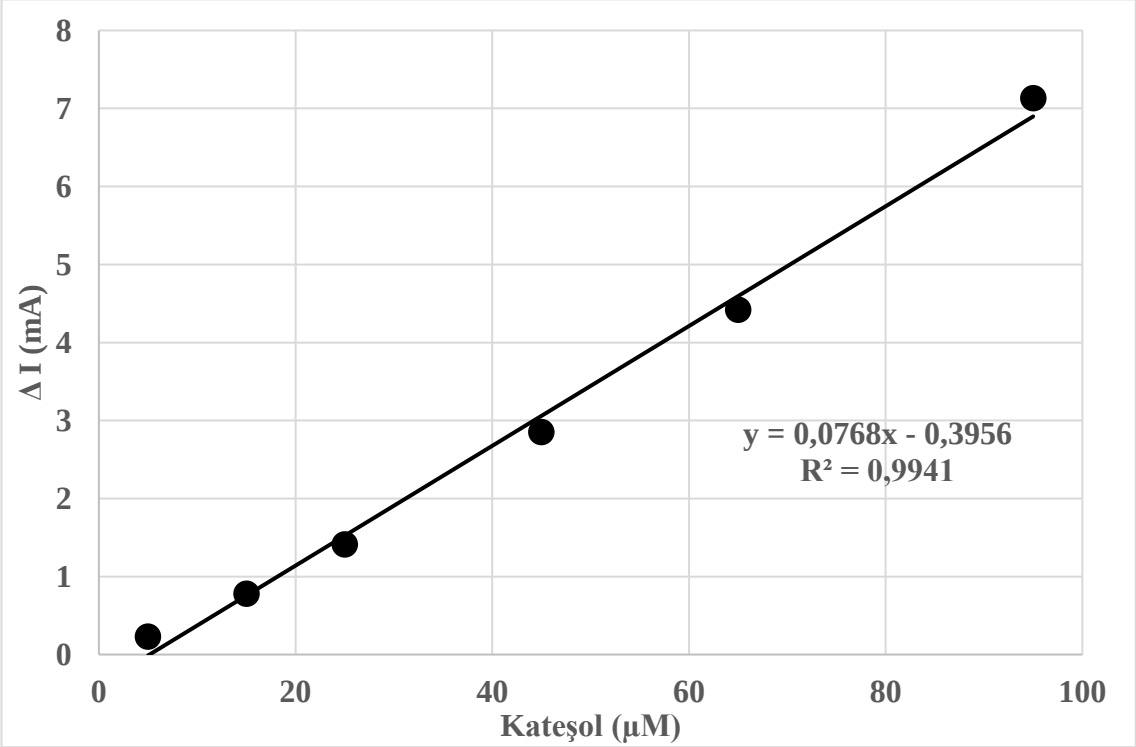
Şekil 4.26. Bakır tel kullanılarak hazırlanan 1. biyosensörün kalibrasyon grafiği



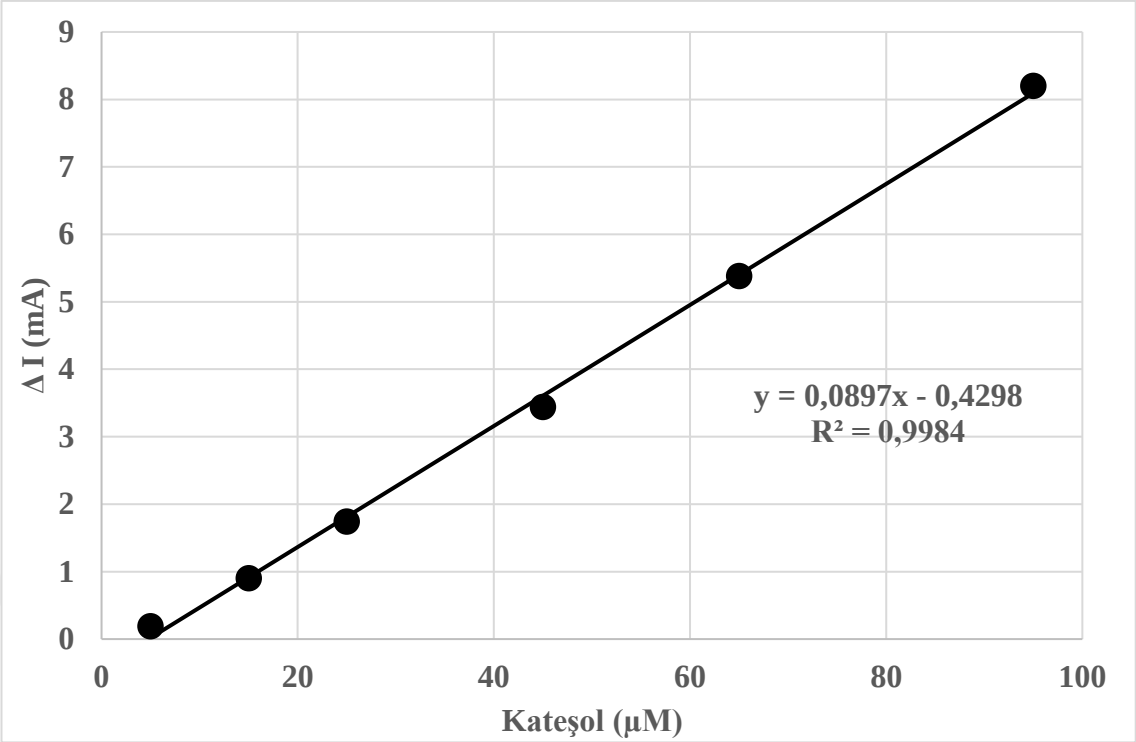
Şekil 4.27. Bakır tel kullanılarak hazırlanan 2. biyosensörün kalibrasyon grafiği



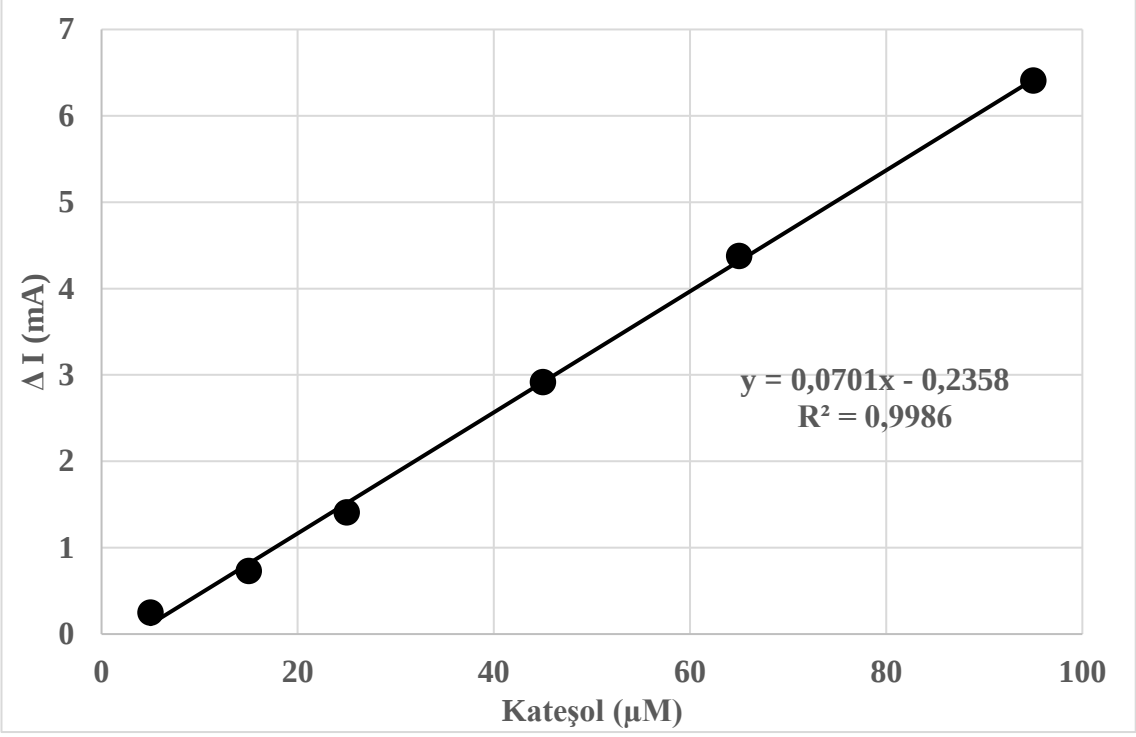
Şekil 4.28. Bakır tel kullanılarak hazırlanan 3. biyosensörün kalibrasyon grafiği



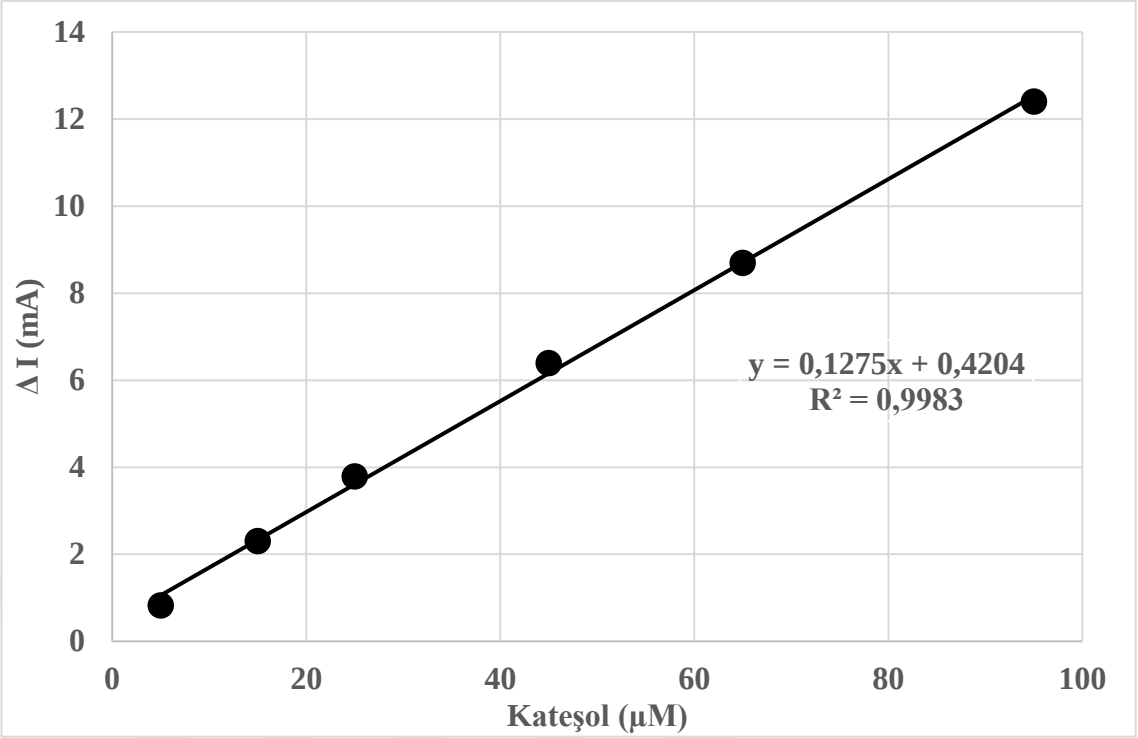
Şekil 4.29. Bakır tel kullanılarak hazırlanan 4. biyosensörün kalibrasyon grafiği



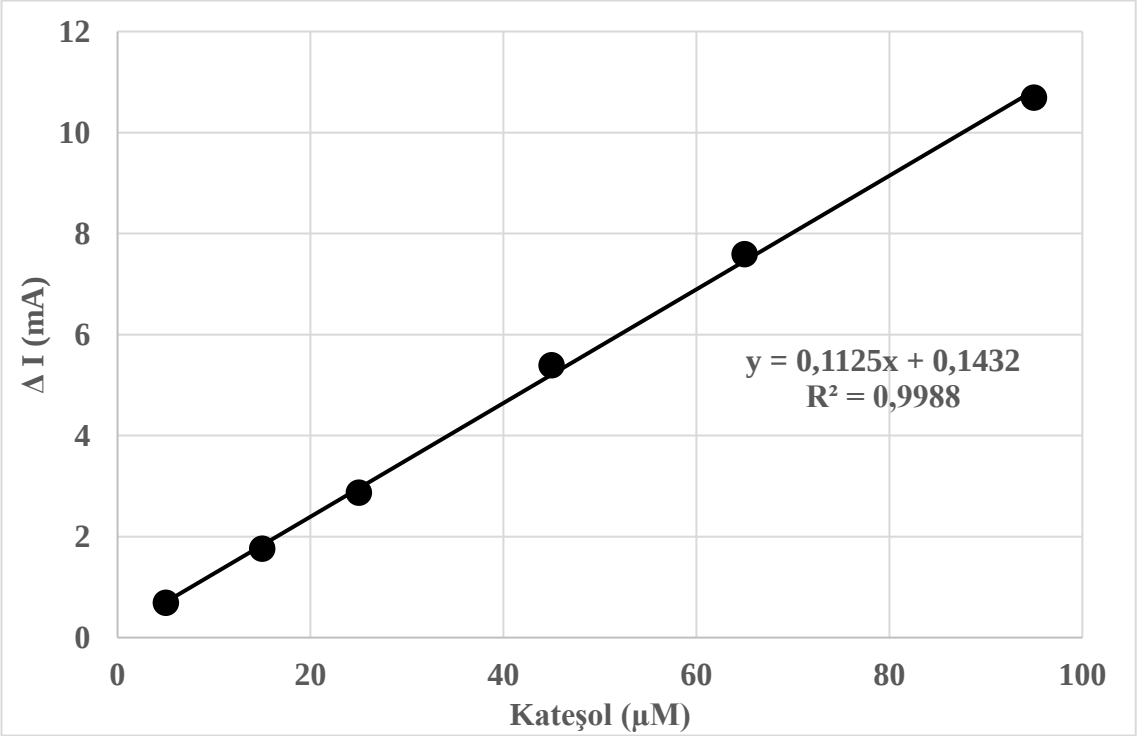
Şekil 4.30. Bakır tel kullanılarak hazırlanan 5. biyosensörün kalibrasyon grafiği



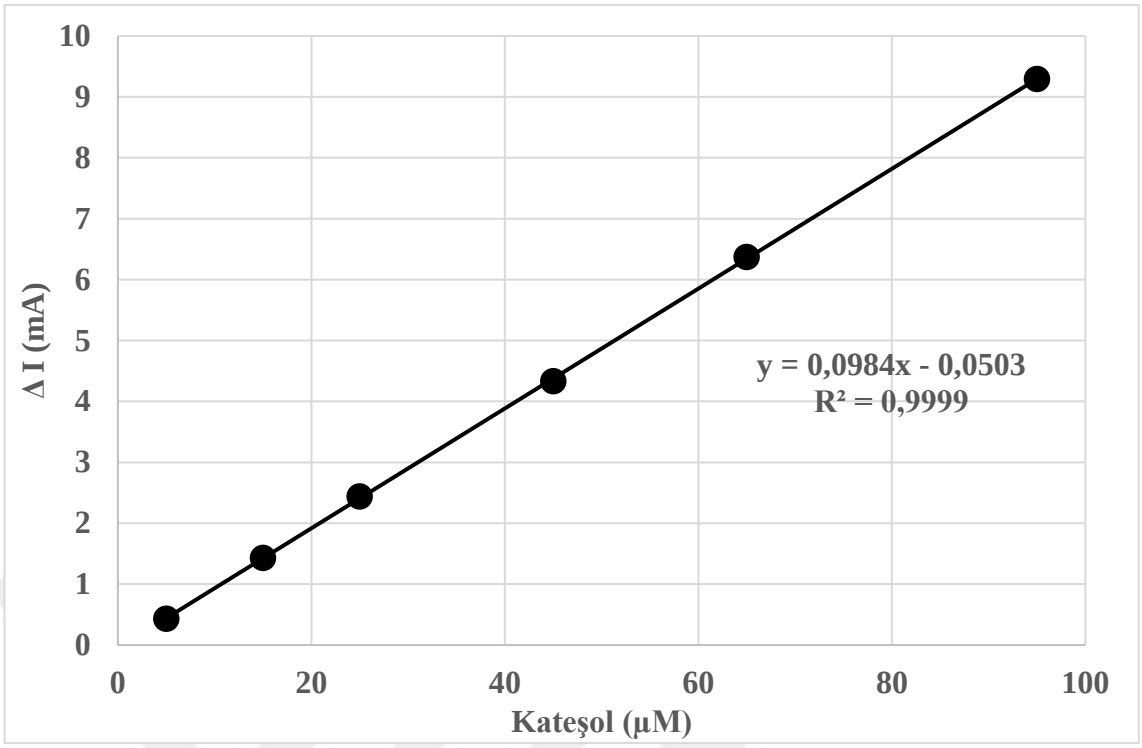
Şekil 4.31. Bakır tel kullanılarak hazırlanan 6. biyosensörün kalibrasyon grafiği



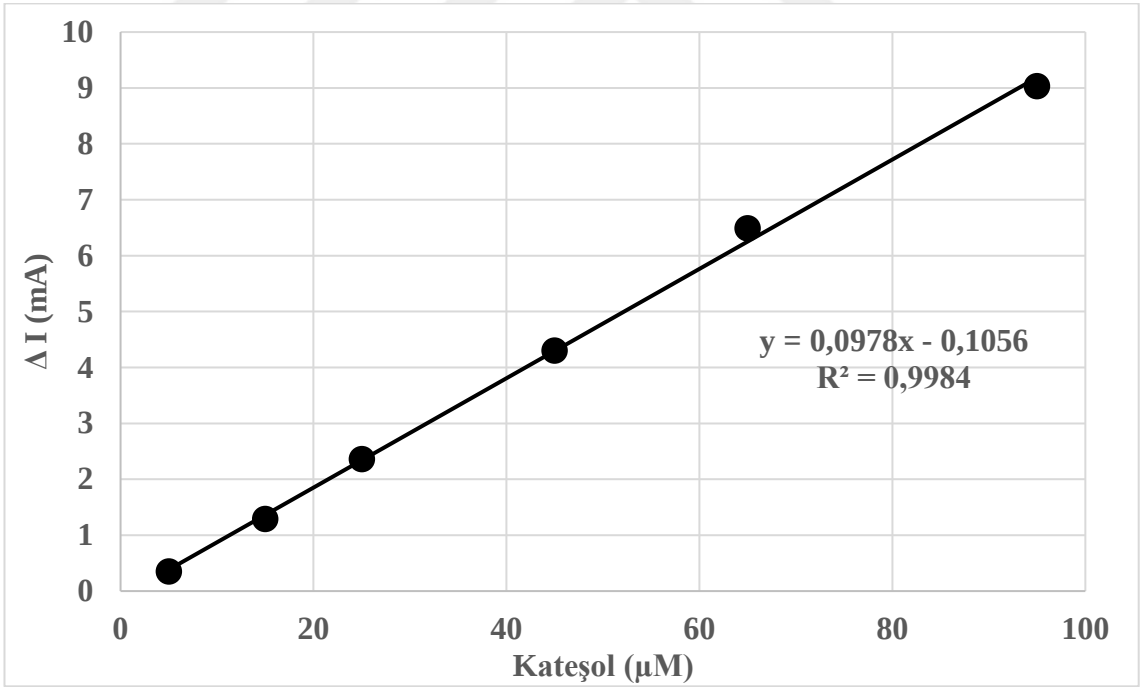
Şekil 4.32. Bakır tel kullanılarak hazırlanan 7. biyosensörün kalibrasyon grafiği



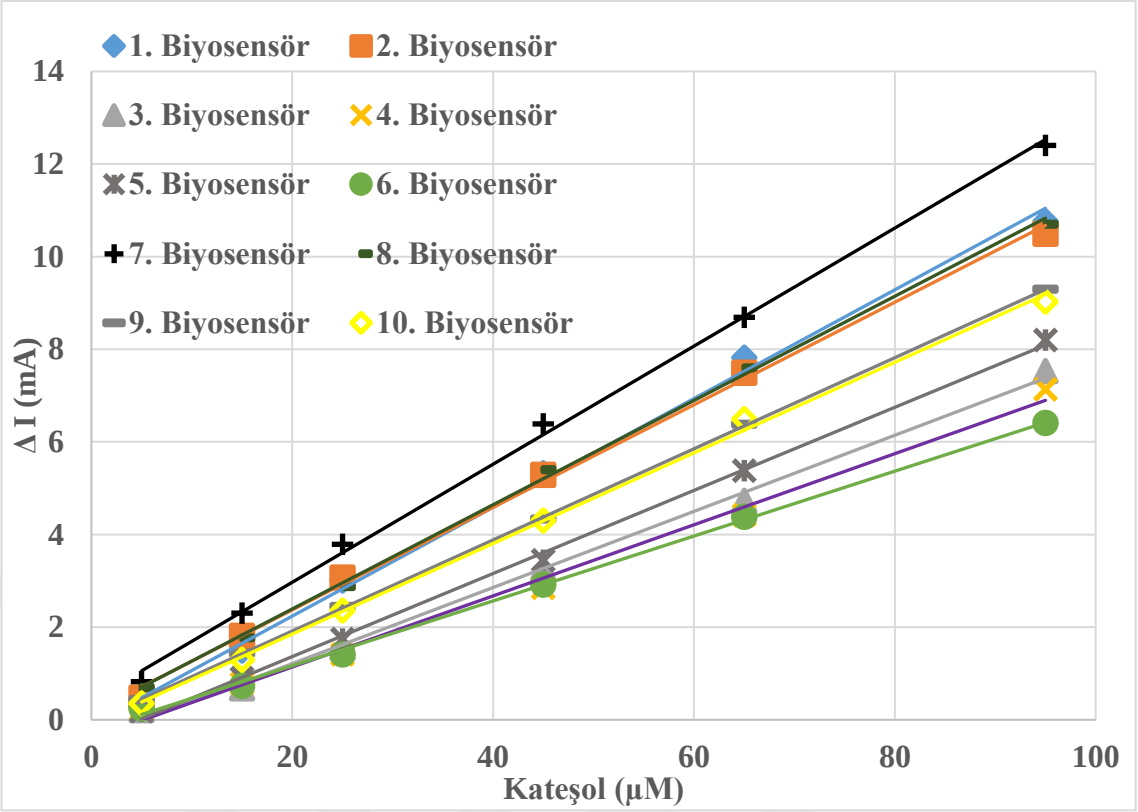
Şekil 4.33. Bakır tel kullanılarak hazırlanan 8. biyosensörün kalibrasyon grafiği



Şekil 4.34. Bakır tel kullanılarak hazırlanan 9. biyosensörün kalibrasyon grafiği



Şekil 4.35. Bakır tel kullanılarak hazırlanan 10. biyosensörün kalibrasyon grafiği



Şekil 4.36. Tasarlanan biyosensördeki karbon pasta çalışma elektrodunun potansiyostat bağlantısını oluşturan bakır tel ile yapılan 10 farklı çalışmanın tek bir kalibrasyon grafiği üzerinde gösterilmesi

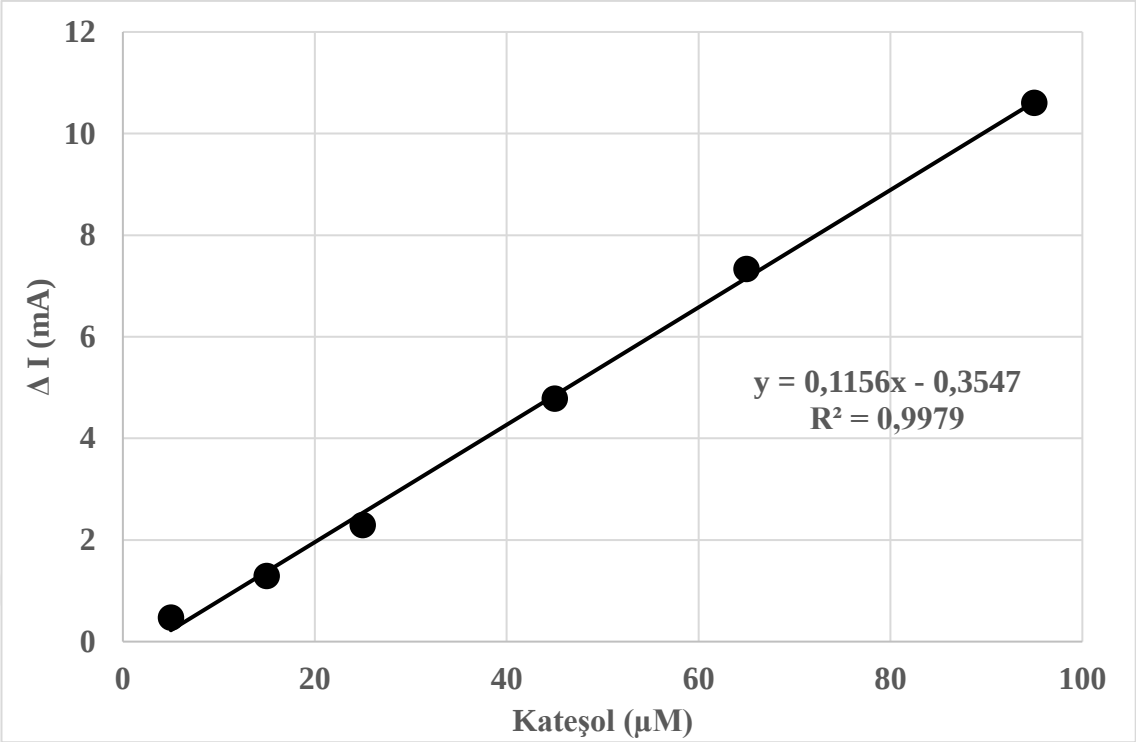
Bakır tel kullanılarak hazırlanan 10 farklı biyosensöre ait kalibrasyon grafiklerinden elde edilen doğrusallık katsayıları, doğru denklemleri ve tayin aralıkları Çizelge 4.2'de verildi. Tablodan da görüldüğü gibi bakır tel kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin doğru denklemleri birbirleriyle çok uyumlu ve doğrusallık katsayıları oldukça iyidir. Bu sonuçlar tasarlanan biyosensörlerin tekrar üretilebilirliğinin çok iyi olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.1. Bakır tel kullanılarak hazırlanan 10 farklı biyosensörün doğrusallık katsayıları, doğru denklemleri ve tayin aralıkları

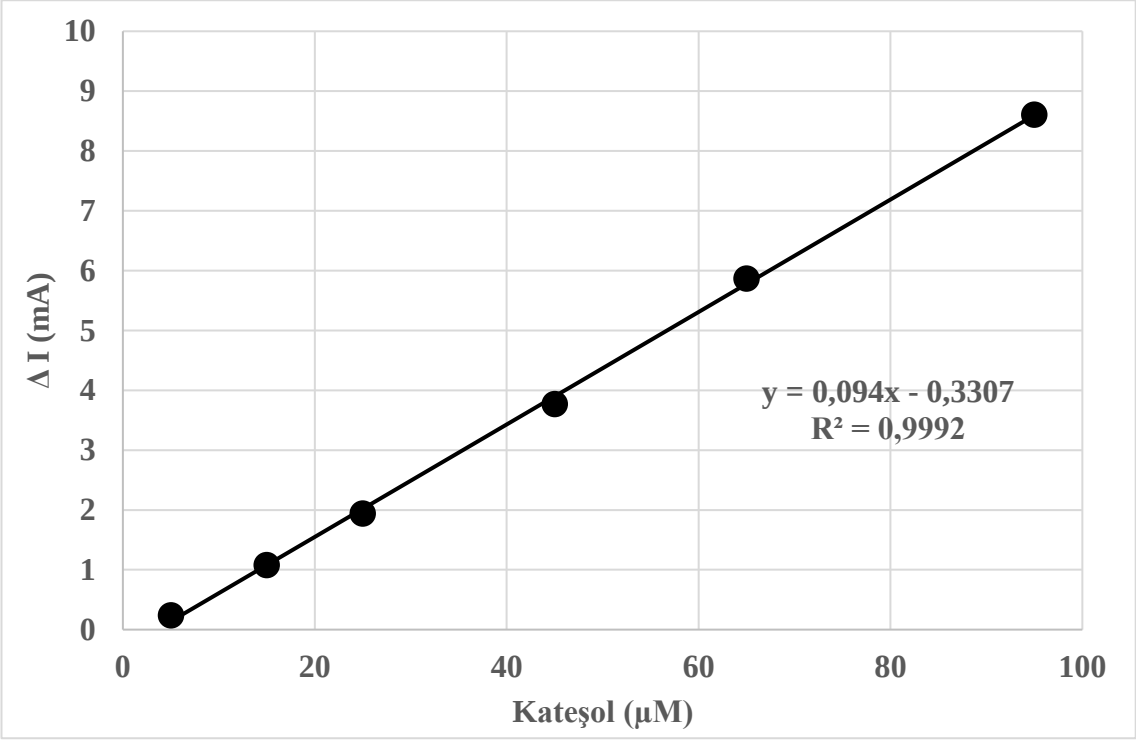
BİYOSENSÖR NUMARASI (BAKIR TEL)	DOĞRU DENKLEMİ	DOĞRUSALLIK KATSAYISI (R^2)	TAYİN ARALIĞI (µM)
1	y = 0,1174x - 0,1089	R^2 = 0,9964	5-95
2	y = 0,1107x + 0,1581	R^2 = 0,9979	5-95
3	y = 0,0822x - 0,4308	R^2 = 0,9967	5-95
4	y = 0,0768x - 0,3956	R^2 = 0,9941	5-95
5	y = 0,0897x - 0,4298	R^2 = 0,9984	5-95
6	y = 0,0701x - 0,2358	R^2 = 0,9986	5-95
7	y = 0,1275x + 0,4204	R^2 = 0,9983	5-95
8	y = 0,1125x + 0,1432	R^2 = 0,9988	5-95
9	y = 0,0984x - 0,0503	R^2 = 0,9999	5-95
10	y = 0,0978x - 0,1056	R^2 = 0,9984	5-95

4.6.3. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün tekrar üretilebilirliği

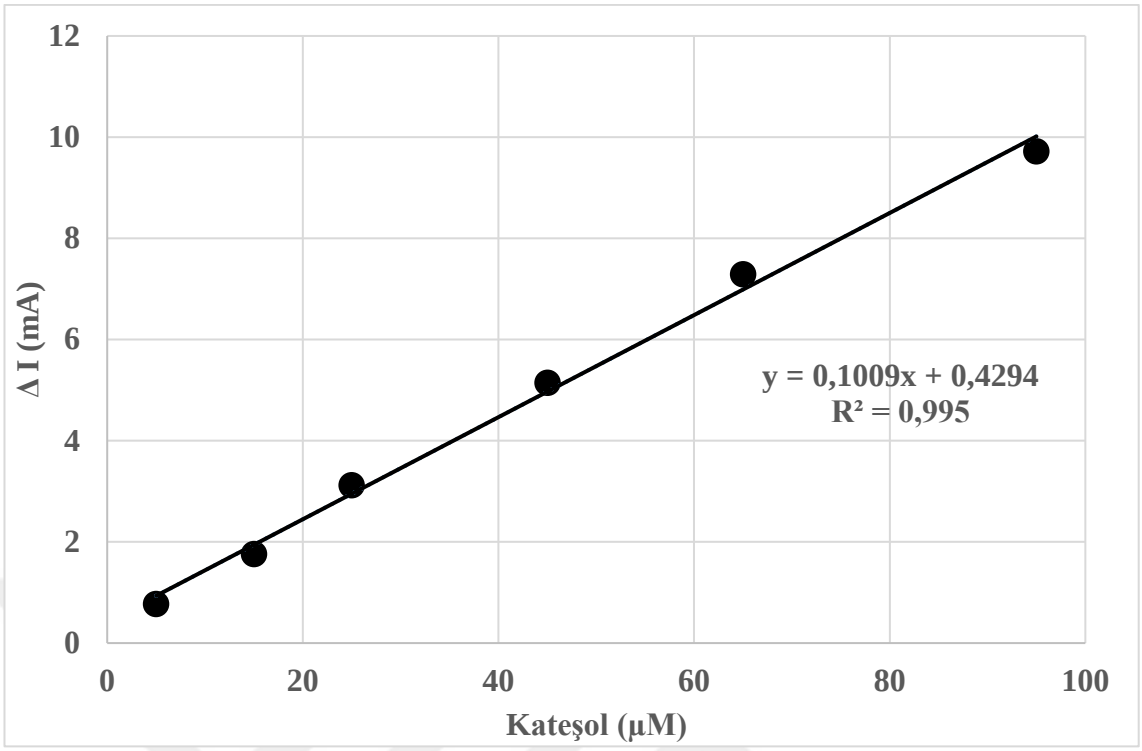
Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin tekrar üretilebilirliğinin incelenmesi amacıyla 10 farklı biyosensör hazırlandı ve 5-95 µM kateşol derişim aralığında, pH 6,0 50 mM fosfat tamponu kullanılarak, 40°C sıcaklıktaki çalışma koşullarında +0,7 V sabit potansiyelde ölçümler alındı. Elde edilen sonuçlar kullanılarak her bir biyosensör için kalibrasyon grafikleri çizildi ve bu grafiklerden yararlanılarak, doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları hesaplanandı. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin kalibrasyon grafikleri Şekil 4.37 - Şekil 4.46'da verildi. Şekil 4.47'de ise kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan 10 farklı biyosensörün kalibrasyon eğrileri tek bir grafikte gösterildi.



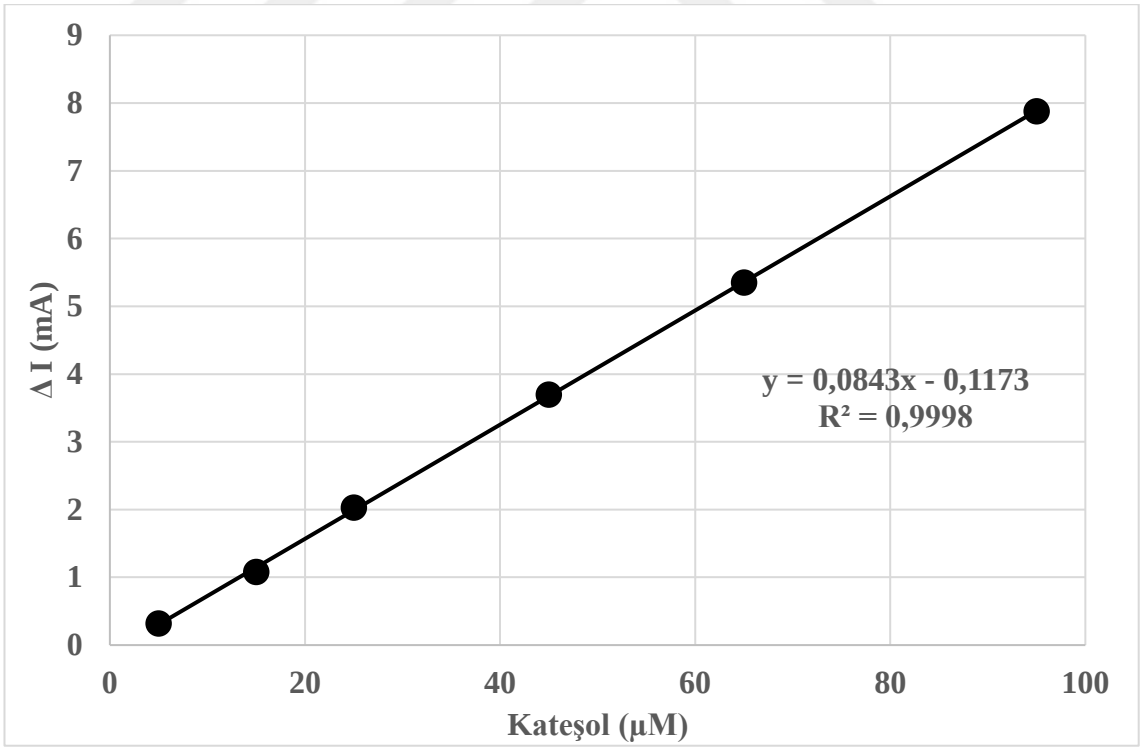
Şekil 4.37. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan 1. biyosensörün kalibrasyon grafiği



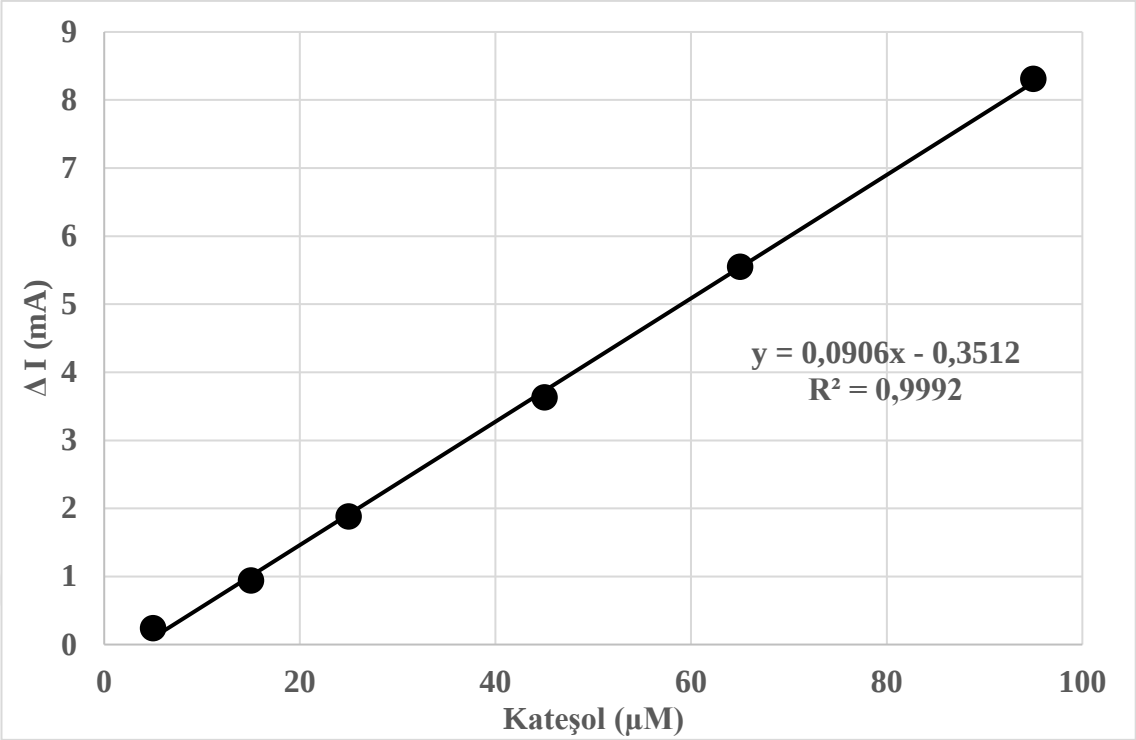
Şekil 4.38. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan 2. biyosensörün kalibrasyon grafiği



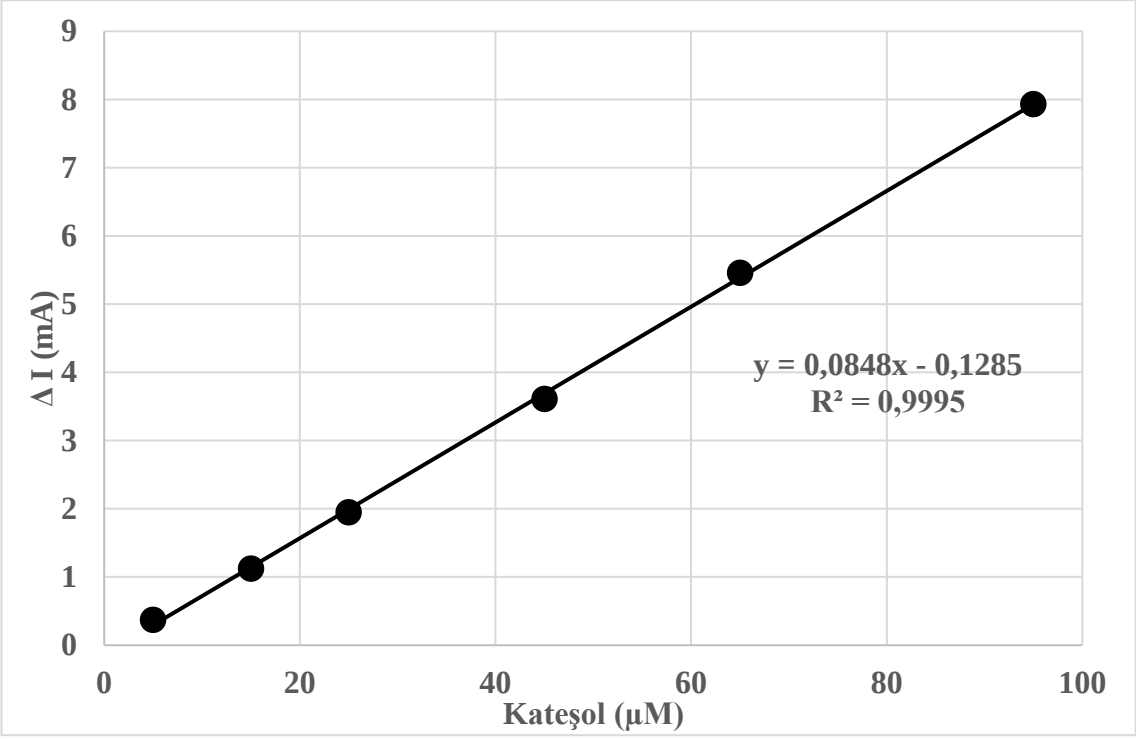
Şekil 4.39. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan 3. biyosensörün kalibrasyon grafiği



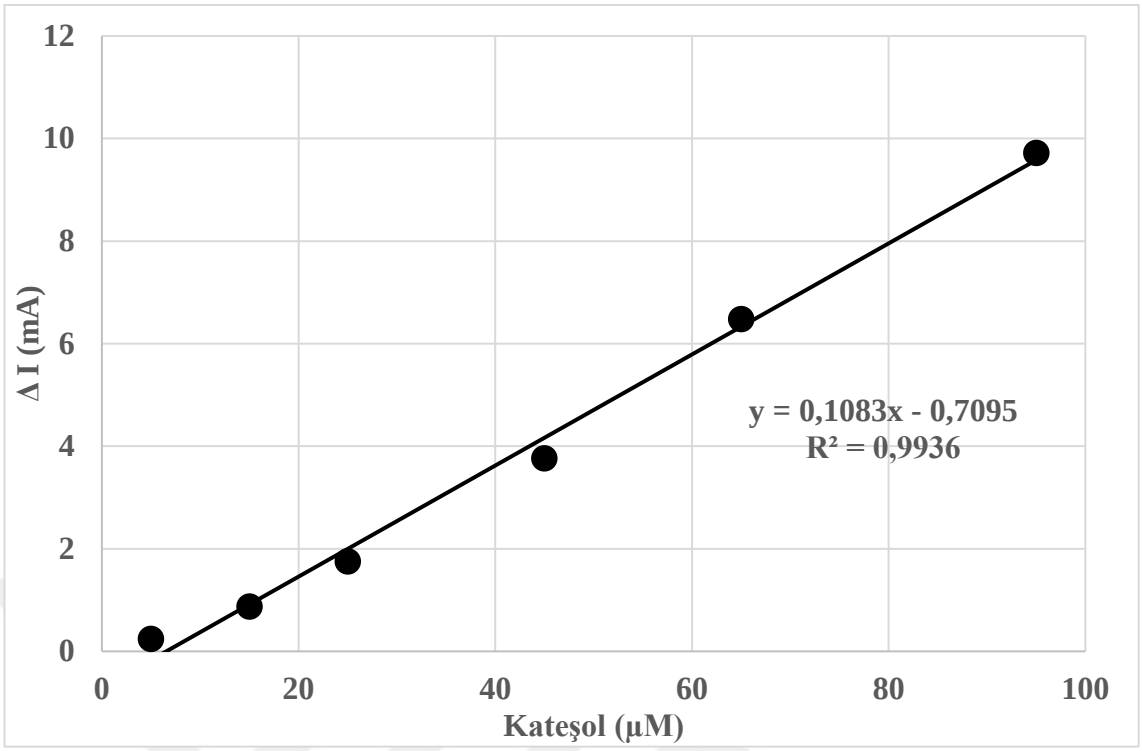
Şekil 4.40. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan 4. biyosensörün kalibrasyon grafiği



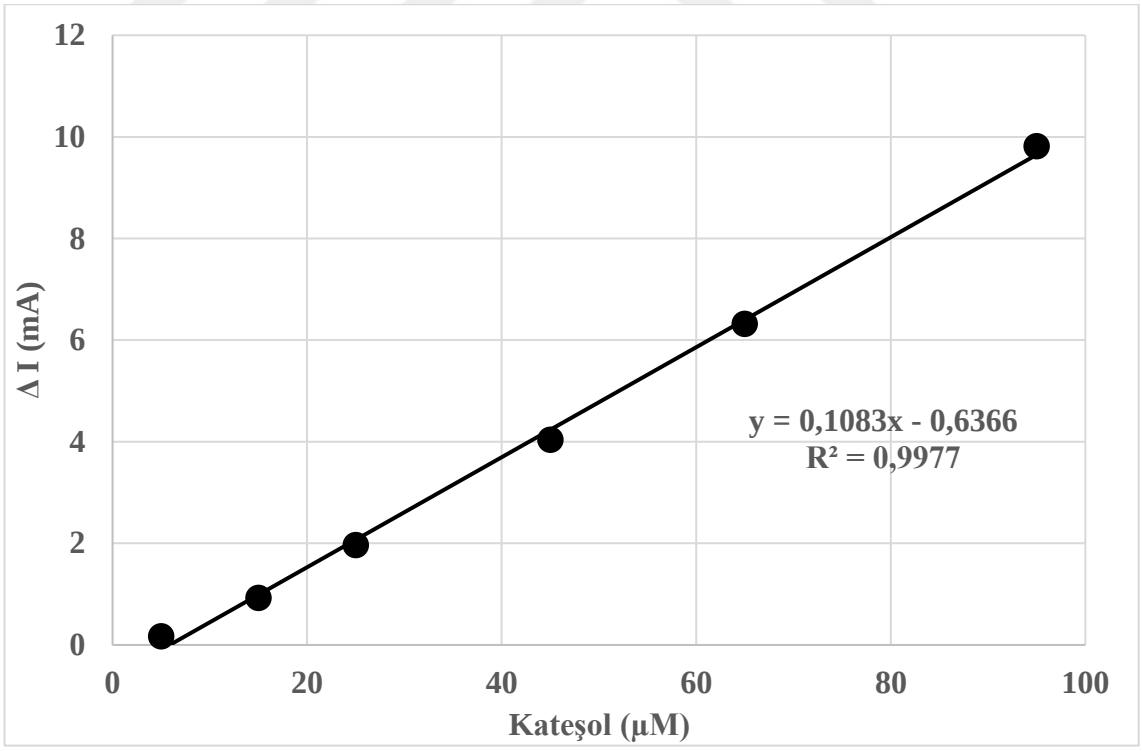
Şekil 4.41. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan 5. biyosensörün kalibrasyon grafiği



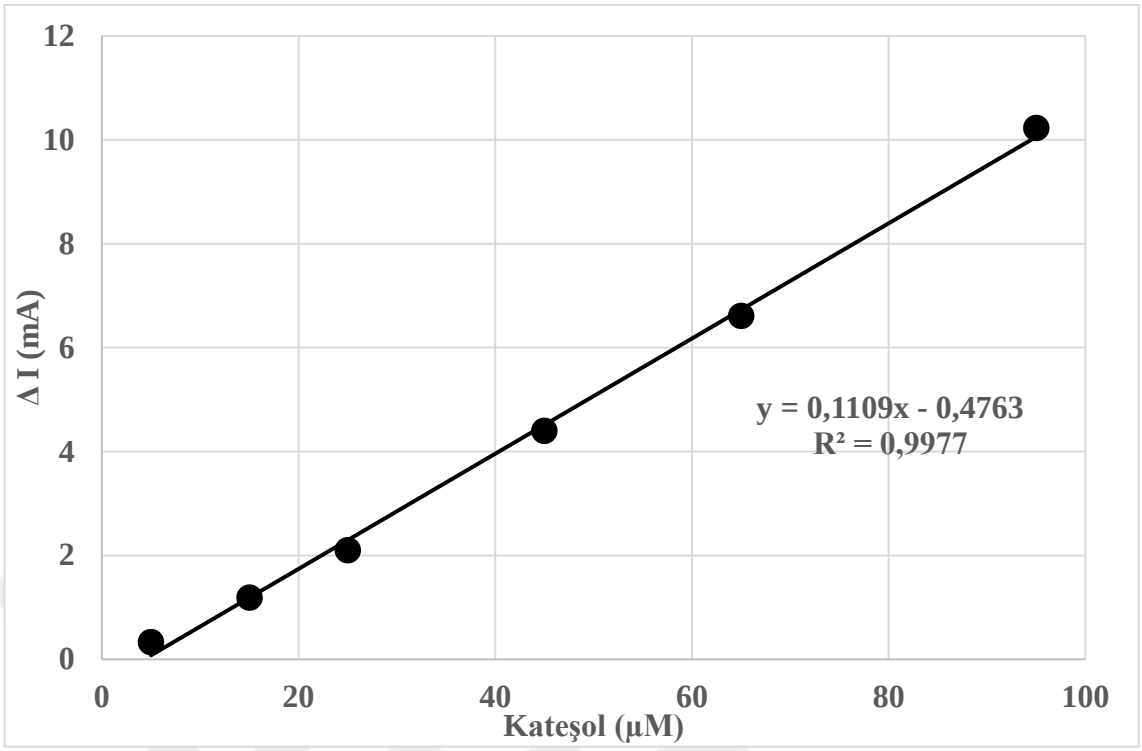
Şekil 4.42. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan 6. biyosensörün kalibrasyon grafiği



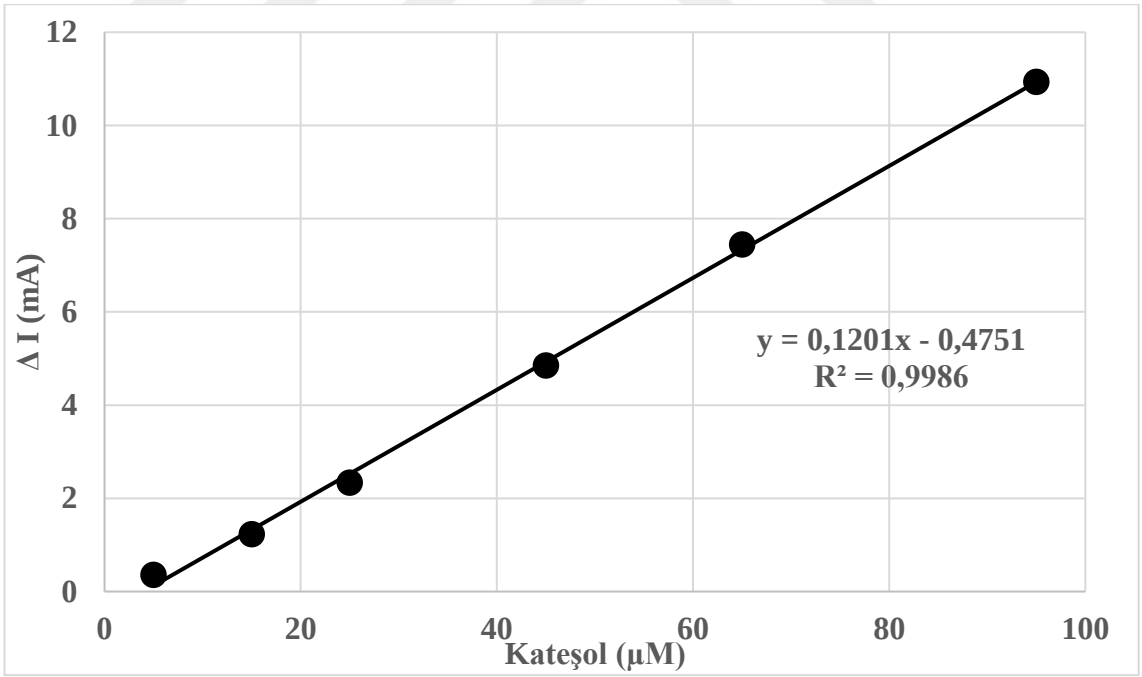
Şekil 4.43. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan 7. biyosensörün kalibrasyon grafiği



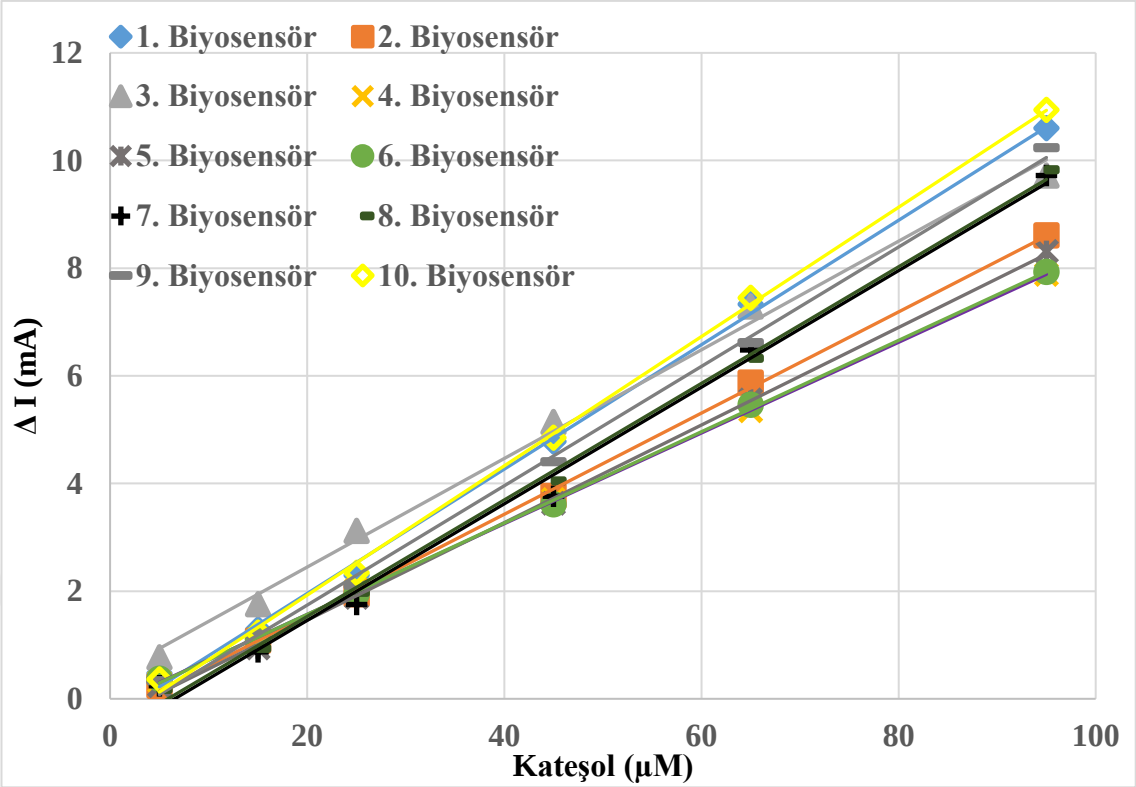
Şekil 4.44. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan 8. biyosensörün kalibrasyon grafiği



Şekil 4.45. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan 9. biyosensörün kalibrasyon grafiği



Şekil 4.46. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan 10. biyosensörün kalibrasyon grafiği



Şekil 4.47. Tasarlanan biyosensördeki karbon pasta çalışma elektrodunun potansiyostat bağlantısını oluşturan kalay kaplı bakır tel ile yapılan 10 farklı çalışmanın tek bir kalibrasyon grafiği üzerinde gösterilmesi

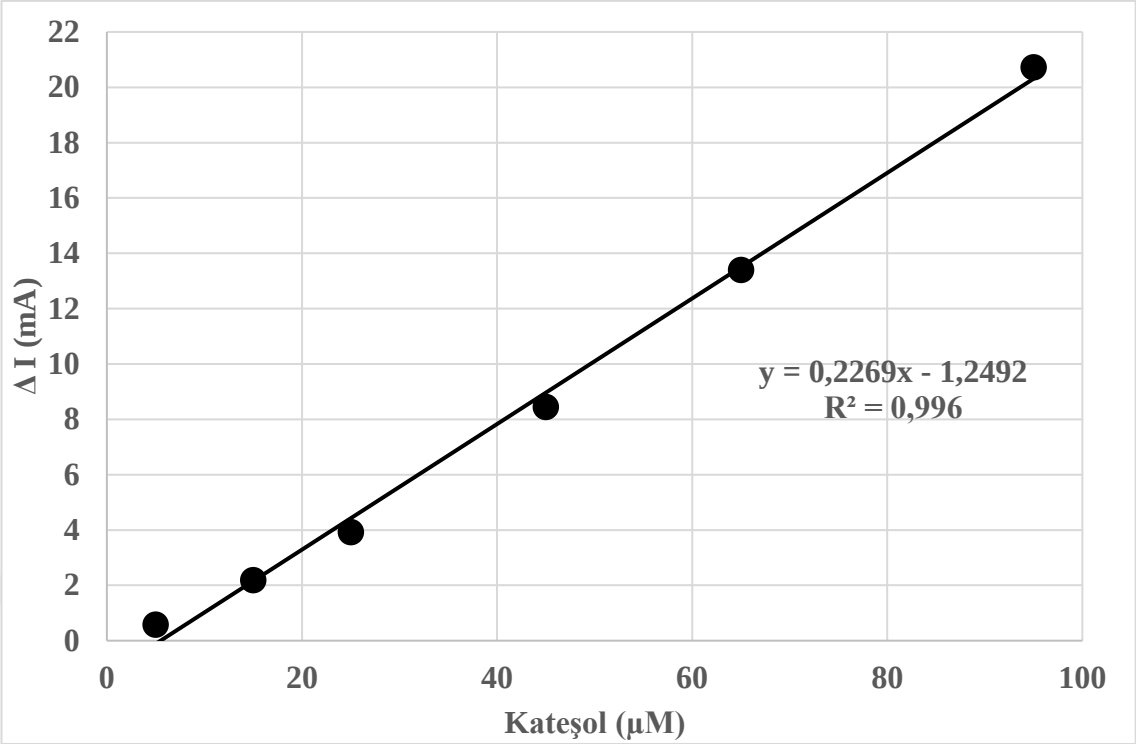
Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan 10 farklı biyosensöre ait kalibrasyon grafiklerinden elde edilen doğrusallık katsayıları, doğru denklemleri ve tayin aralıkları Çizelge 4.3'te verildi. Tablodan da görüldüğü gibi kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin doğru denklemleri birbirleriyle çok uyumlu ve doğrusallık katsayıları oldukça iyidir. Bu sonuçlar tasarlanan biyosensörlerin tekrar üretilebilirliğinin çok iyi olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.3. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan 10 farklı biyosensörün doğrusallık katsayıları, doğru denklemleri ve tayin aralıkları

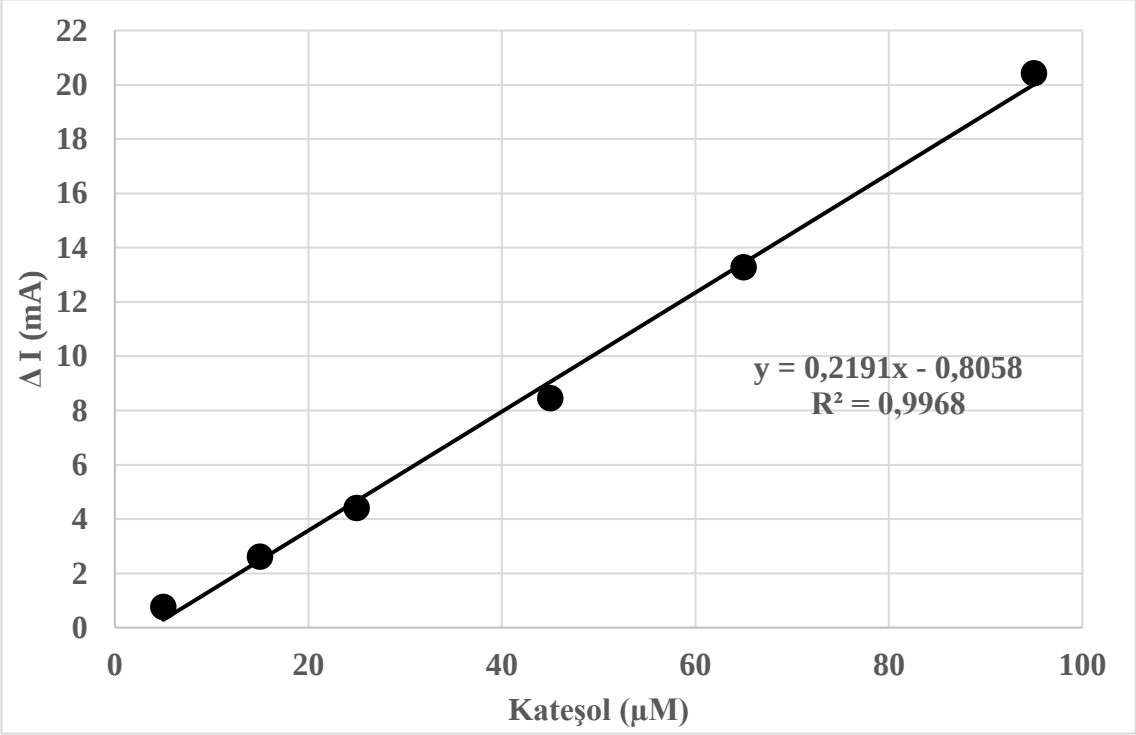
BİYOSENSÖR NUMARASI (KALAY KAPLI BAKIR TEL)	DOĞRU DENKLEMİ	DOĞRUSALLIK KATSAYISI (R^2)	TAYİN ARALIĞI (µM)
1	y = 0,1156x - 0,3547	R^2 = 0,9979	5-95
2	y = 0,094x - 0,3307	R^2 = 0,9992	5-95
3	y = 0,1009x + 0,4294	R^2 = 0,9950	5-95
4	y = 0,0843x - 0,1173	R^2 = 0,9998	5-95
5	y = 0,0906x - 0,3512	R^2 = 0,9992	5-95
6	y = 0,0848x - 0,1285	R^2 = 0,9995	5-95
7	y = 0,1083x – 0,7095	R^2 = 0,9936	5-95
8	y = 0,1083x - 0,6366	R^2 = 0,9977	5-95
9	y = 0,1109x – 0,4763	R^2 = 0,9977	5-95
10	y = 0,1201x – 0,4751	R^2 = 0,9986	5-95

4.6.4. Platin tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün tekrar üretilebilirliği

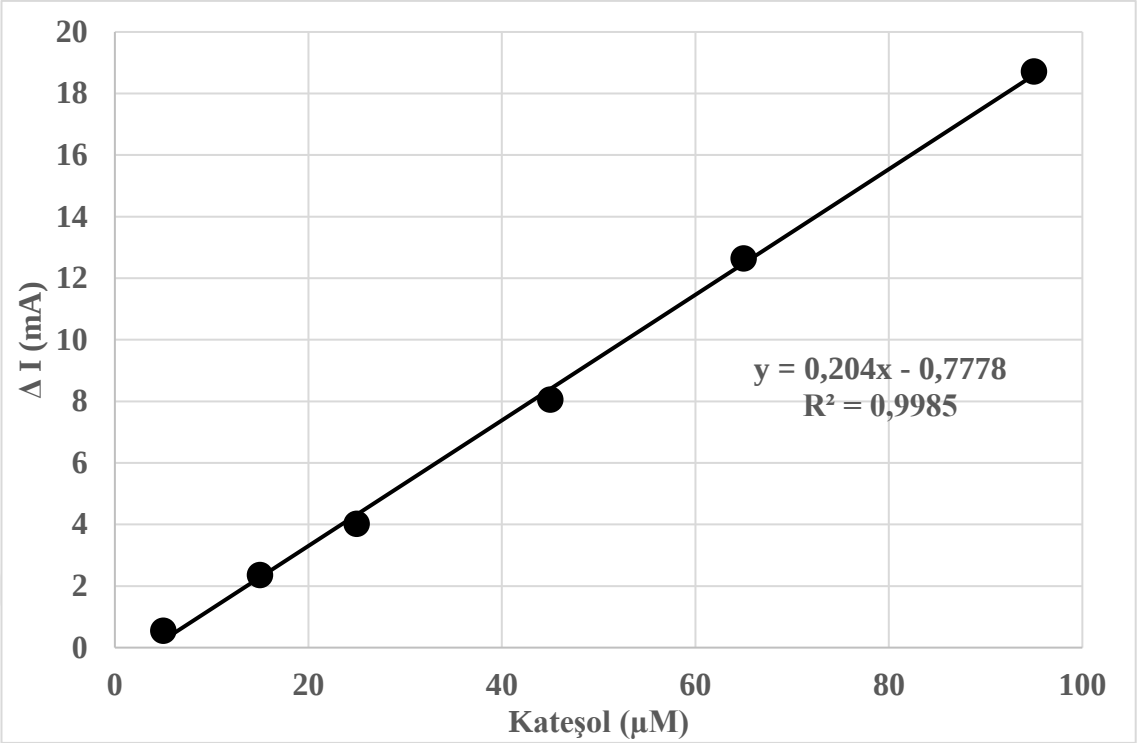
Platin tel kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin tekrar üretilebilirliğinin incelenmesi amacıyla 10 farklı biyosensör hazırlandı ve 5-95 µM kateşol derişim aralığında, pH 6,0 50 mM fosfat tamponu kullanılarak, 40°C sıcaklıktaki çalışma koşullarında +0,7 V sabit potansiyelde ölçümler alındı. Elde edilen sonuçlar kullanılarak her bir biyosensör için kalibrasyon grafikleri çizildi ve bu grafiklerden yararlanılarak, doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları hesaplanandı. Platin tel kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin kalibrasyon grafikleri Şekil 4.48 - Şekil 4.57'de verildi. Şekil 4.58'de ise platin tel kullanılarak hazırlanan 10 farklı biyosensörün kalibrasyon eğrileri tek bir grafikte gösterildi.



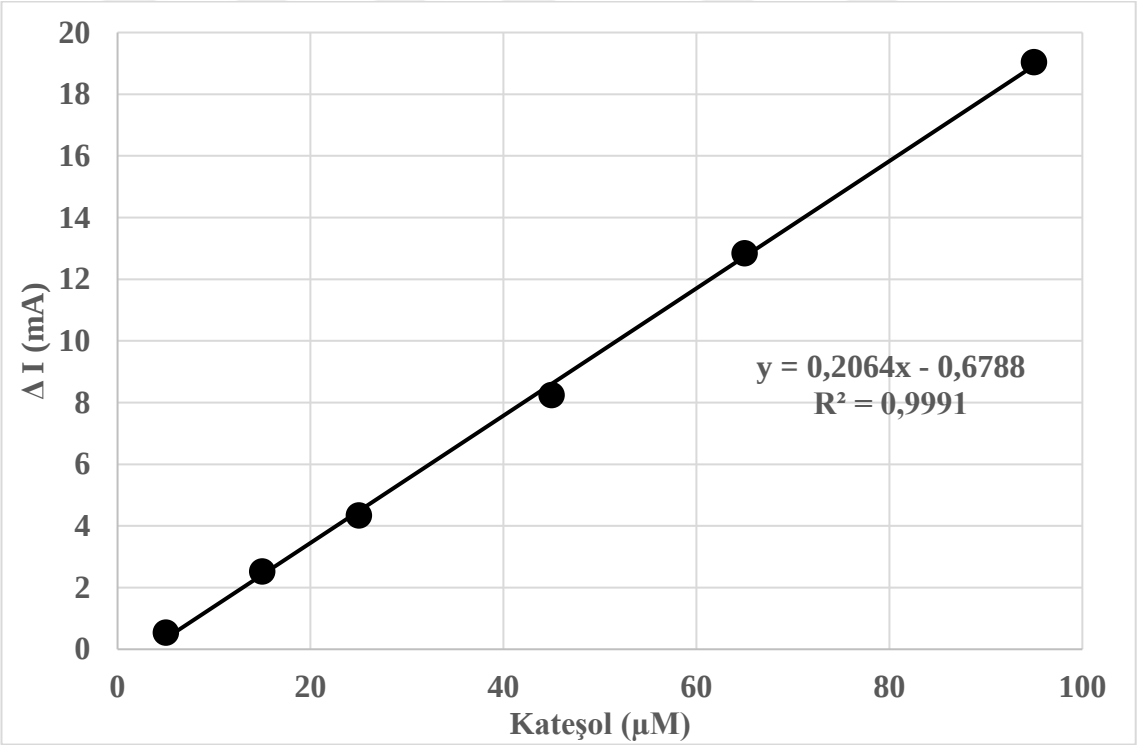
Şekil 4.48. Platin tel kullanılarak hazırlanan 1. biyosensörün kalibrasyon grafiği



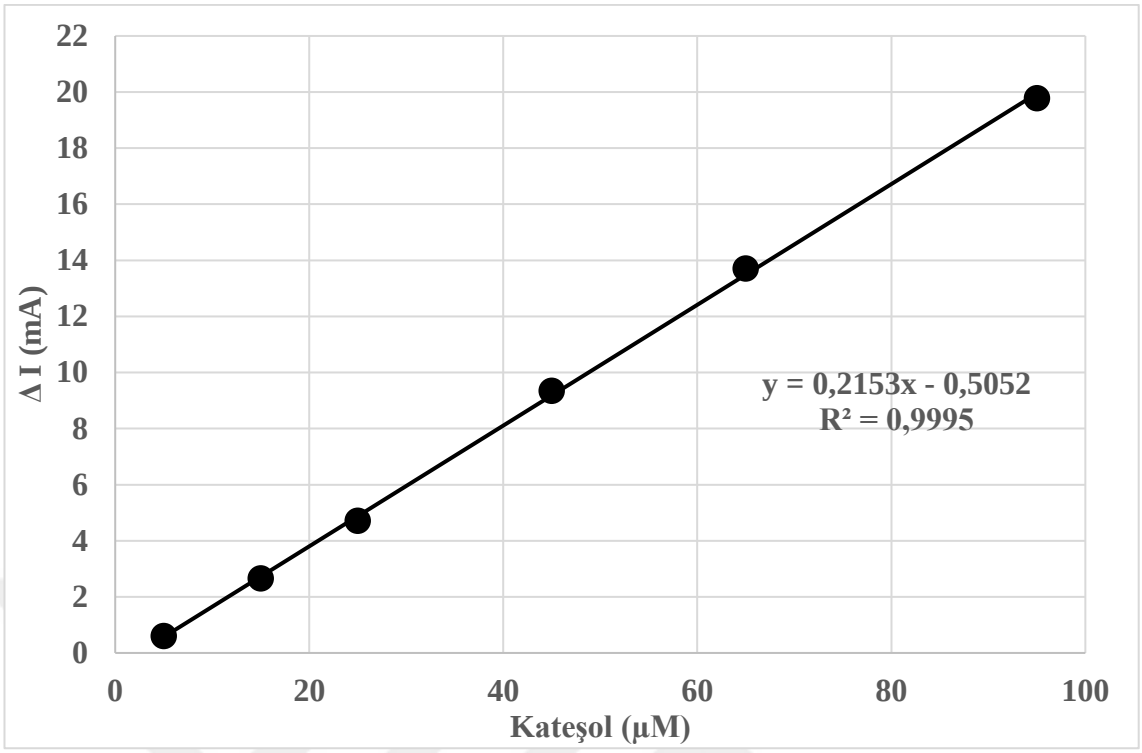
Şekil 4.49. Platin tel kullanılarak hazırlanan 2. biyosensörün kalibrasyon grafiği



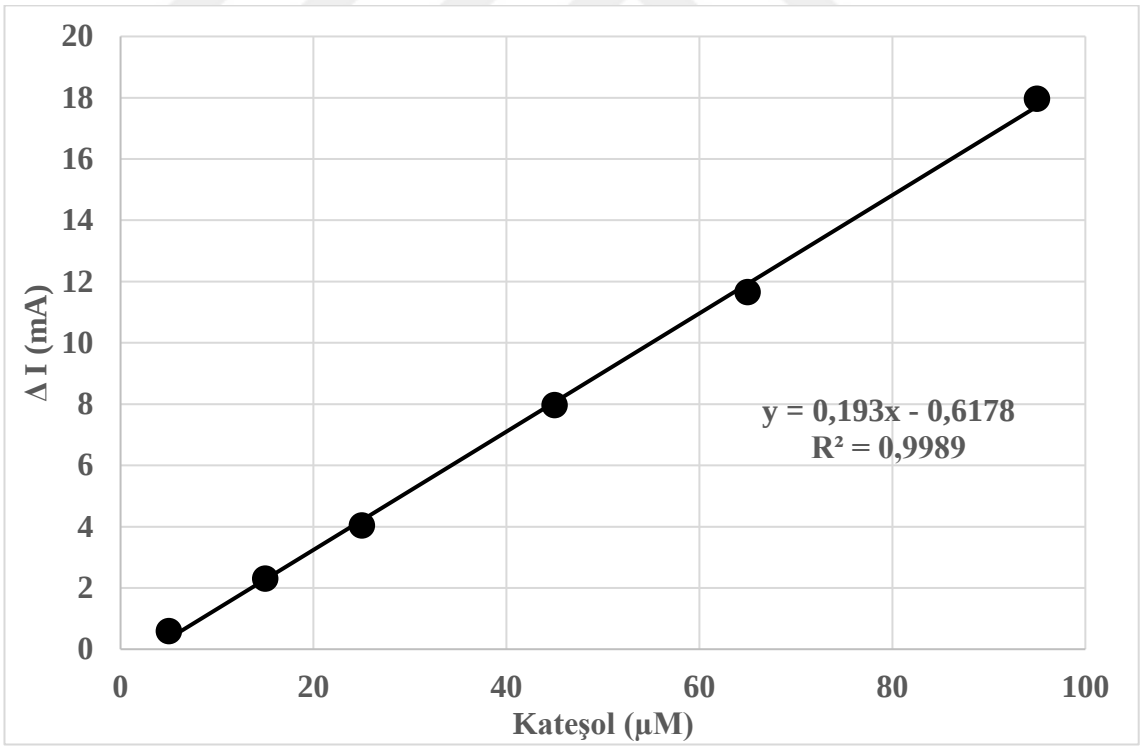
Şekil 4.50. Platin tel kullanılarak hazırlanan 3. biyosensörün kalibrasyon grafiği



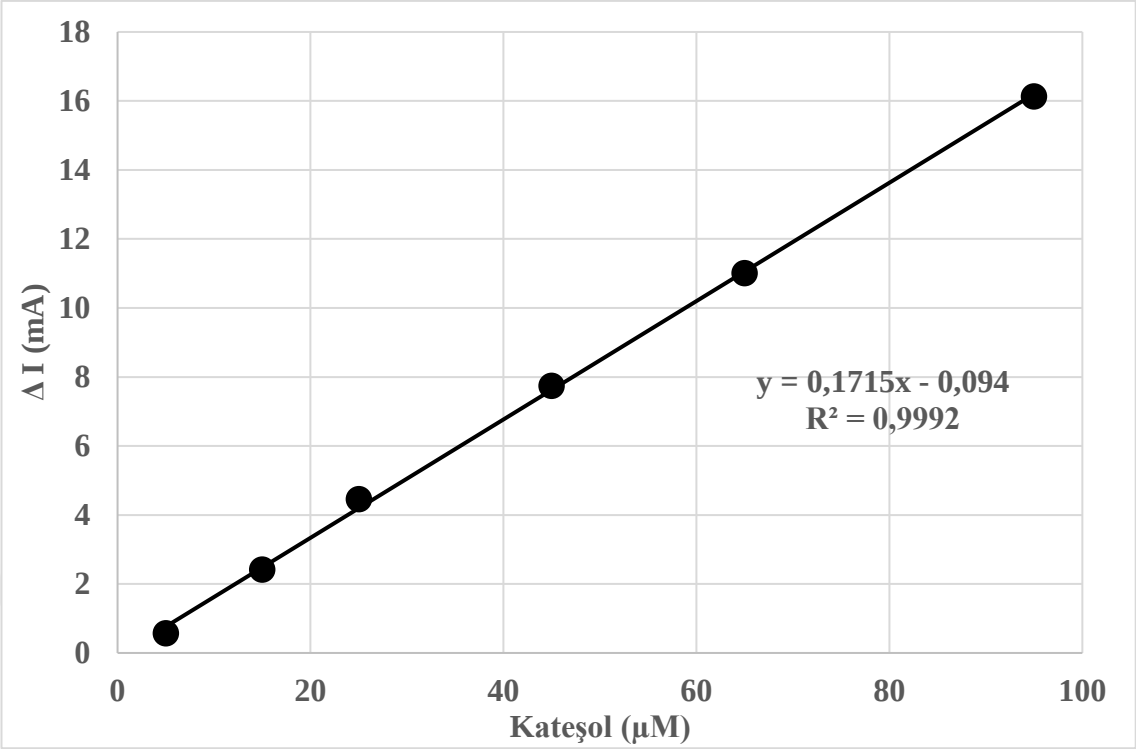
Şekil 4.51. Platin tel kullanılarak hazırlanan 4. biyosensörün kalibrasyon grafiği



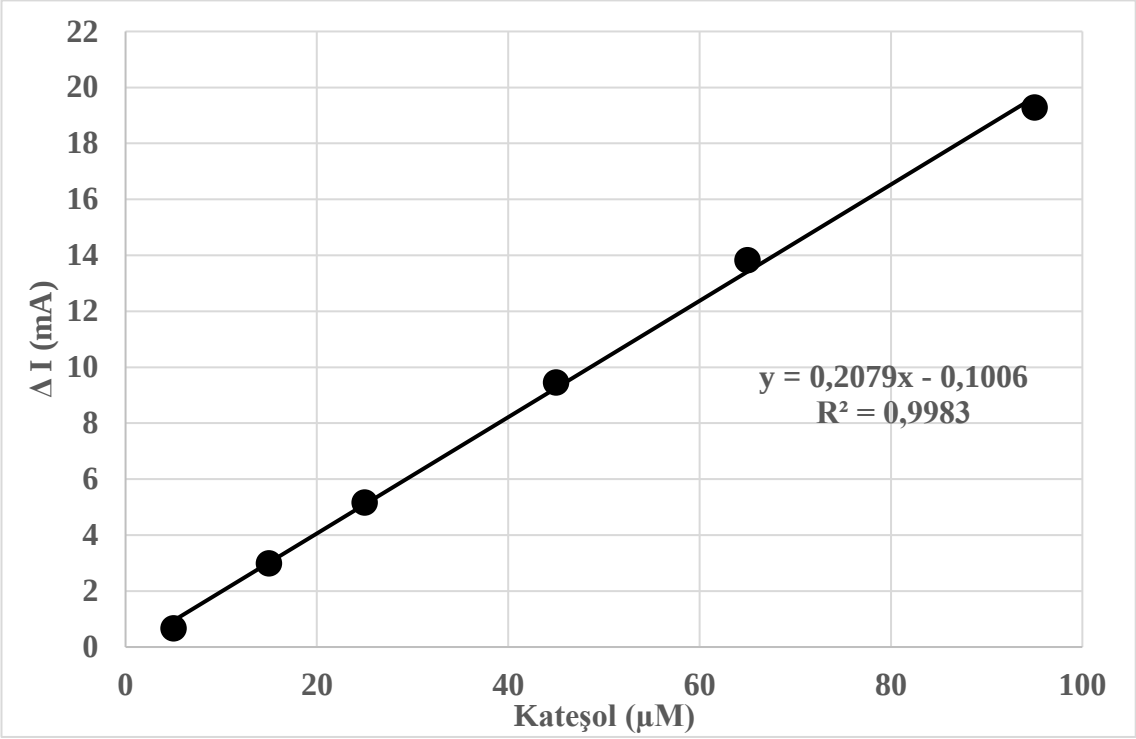
Şekil 4.52. Platin tel kullanılarak hazırlanan 5. biyosensörün kalibrasyon grafiği



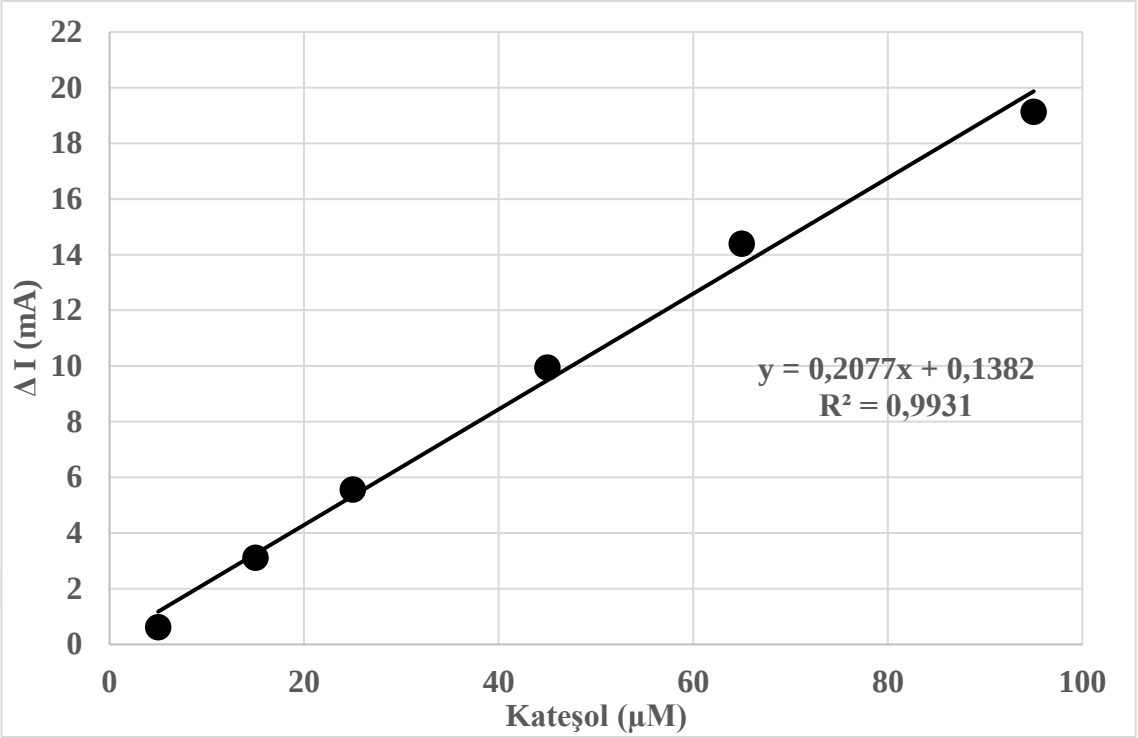
Şekil 4.53. Platin tel kullanılarak hazırlanan 6. biyosensörün kalibrasyon grafiği



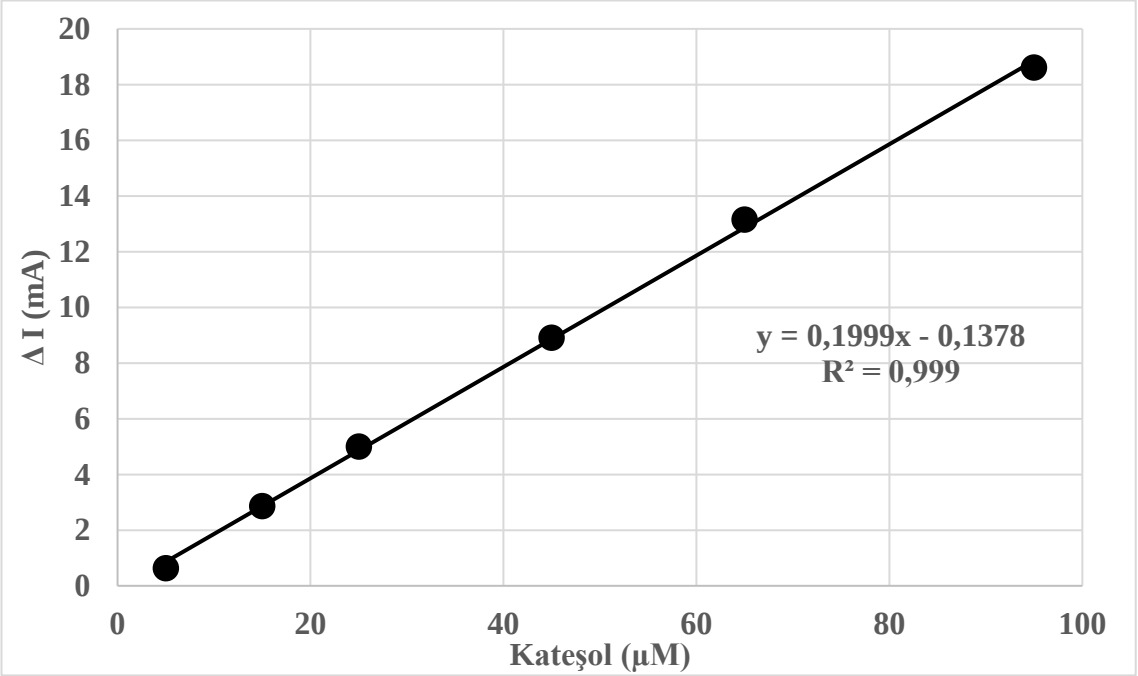
Şekil 4.54. Platin tel kullanılarak hazırlanan 7. biyosensörün kalibrasyon grafiği



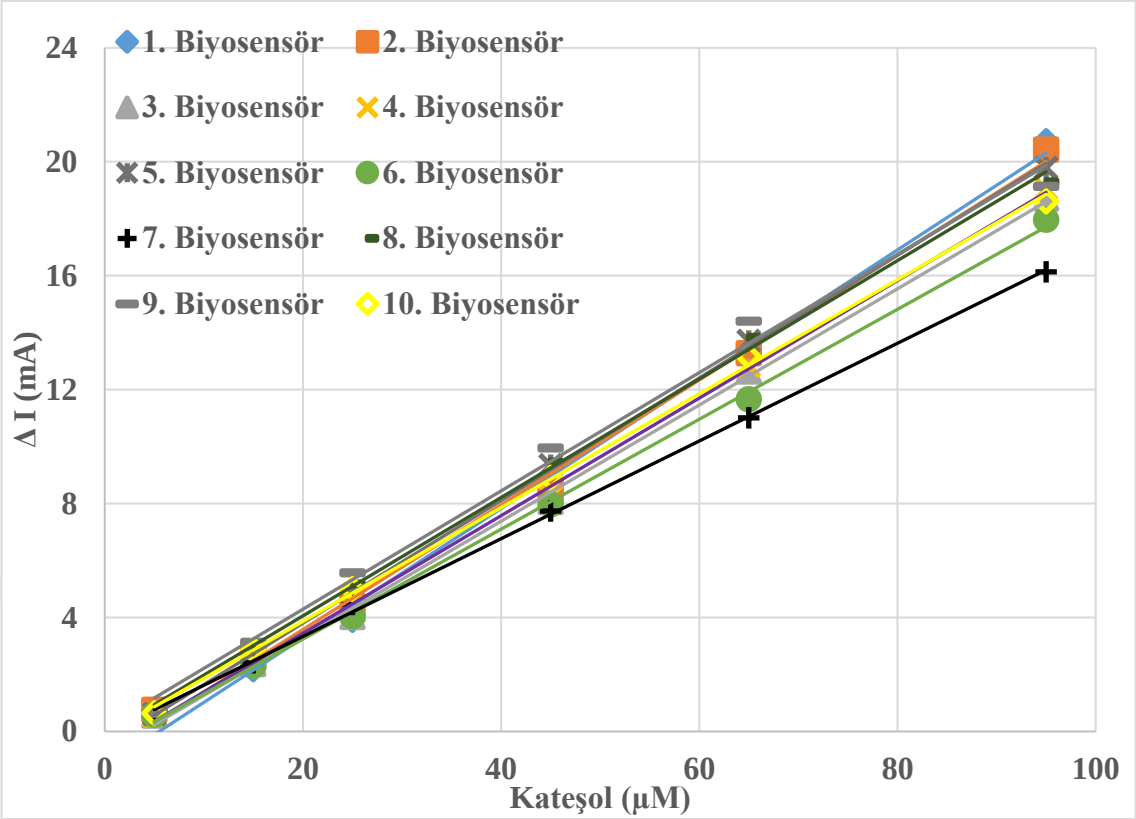
Şekil 4.55. Platin tel kullanılarak hazırlanan 8. biyosensörün kalibrasyon grafiği



Şekil 4.56. Platin tel kullanılarak hazırlanan 9. biyosensörün kalibrasyon grafiği



Şekil 4.57. Platin tel kullanılarak hazırlanan 10. biyosensörün kalibrasyon grafiği



Şekil 4.58. Tasarlanan biyosensördeki karbon pasta çalışma elektrodunun potansiyostat bağlantısını oluşturan platin tel ile yapılan 10 farklı çalışmanın tek bir kalibrasyon grafiği üzerinde gösterilmesi

Platin tel kullanılarak hazırlanan 10 farklı biyosensöre ait kalibrasyon grafiklerinden elde edilen doğrusallık katsayıları, doğru denklemleri ve tayin aralıkları Çizelge 4.4'te verildi. Tablodan da görüldüğü gibi platin tel kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin doğru denklemleri birbirleriyle çok uyumlu ve doğrusallık katsayıları oldukça iyidir. Bu sonuçlar tasarlanan biyosensörlerin tekrar üretilebilirliğinin çok iyi olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.4. Platin tel kullanılarak hazırlanan 10 farklı biyosensörün doğrusallık katsayıları, doğru denklemleri ve tayin aralıkları

BİYOSENSÖR NUMARASI (PLATİN TEL)	DOĞRU DENKLEMİ	DOĞRUSALLIK KATSAYISI (R^2)	TAYİN ARALIĞI (µM)
1	y = 0,2269x - 1,2492	R^2 = 0,9960	5-95
2	y = 0,2191x - 0,8058	R^2 = 0,9968	5-95
3	y = 0,204x - 0,7778	R^2 = 0,9985	5-95
4	y = 0,2064x - 0,6788	R^2 = 0,9991	5-95
5	y = 0,2153x - 0,5052	R^2 = 0,9995	5-95
6	y = 0,193x - 0,6178	R^2 = 0,9989	5-95
7	y = 0,1715x - 0,094	R^2 = 0,9992	5-95
8	y = 0,2079x - 0,1006	R^2 = 0,9983	5-95
9	y = 0,2077x + 0,1382	R^2 = 0,9931	5-95
10	y = 0,1999x - 0,1378	R^2 = 0,9990	5-95

4.7. Tasarlanan Biyosensörlerin Tekrarlanabilirlik Çalışması

Altın, bakır, kalay kaplı bakır ve platin tel kullanılarak hazırlanan 4 farklı biyosensör 5, 15, 25, 45, 65 ve 95 µM kateşol derişimlerinde 10'ar ölçüm gerçekleştirildi. Biyosensörler her ölçüm arasında, 15 dk boyunca pH 6,0 50 mM fosfat tamponunda rejenere edildi. Her bir biyosensör için, ortalama değer, standart sapma (±S.S.) ve geri kazanım yüzdeleri (%) Çizelge 4.5- Çizelge 4.8'de verildi.

Çizelge 4.5. Altın tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün tekrarlanabilirliği

EKLENEN KATEŞOL MİKTARI	BİYOSENSÖR İLE ÖLÇÜLEN KATEŞOL MİKTARI	STANDART SAPMA	GERİ KAZANIM (%)
5 µM	4,33681 µM	1,335826405	86,736
15 µM	14,65793 µM	0,892254124	97,719
25 µM	24,7796 µM	1,35661654	99,118
45 µM	45,56274 µM	2,066765638	101,250
65 µM	66,7911 µM	2,008422395	102,755
95 µM	93,45205 µM	1,222125931	98,370

Çizelge 4.6. Bakır tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün tekrarlanabilirliği

EKLENEN KATEŞOL MİKTARI	BİYOSENSÖR İLE ÖLÇÜLEN KATEŞOL MİKTARI	STANDART SAPMA	GERİ KAZANIM (%)
5 µM	5,37056 µM	1,94423872	107,411
15 µM	14,43912 µM	0,631876967	96,260
25 µM	24,93307 µM	1,196165162	99,732
45 µM	45,09426 µM	1,509430056	100,209
65 µM	65,36109 µM	1,668922791	100,555
95 µM	94,78 µM	1,737763396	99,768

Çizelge 4.7. Kalay kaplı bakır tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün tekrarlanabilirliği

EKLENEN KATEŞOL MİKTARI	BİYOSENSÖR İLE ÖLÇÜLEN KATEŞOL MİKTARI	STANDART SAPMA	GERİ KAZANIM (%)
5 µM	6,46109 µM	1,46365	129,221
15 µM	14,38716 µM	0,52736	95,914
25 µM	24,17586 µM	1,2237	96,703
45 µM	44,07994 µM	1,38886	97,955
65 µM	65,68324 µM	1,1997	101,051
95 µM	95,18903 µM	1,29563	100,198

Çizelge 4.8. Platin tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün tekrarlanabilirliği

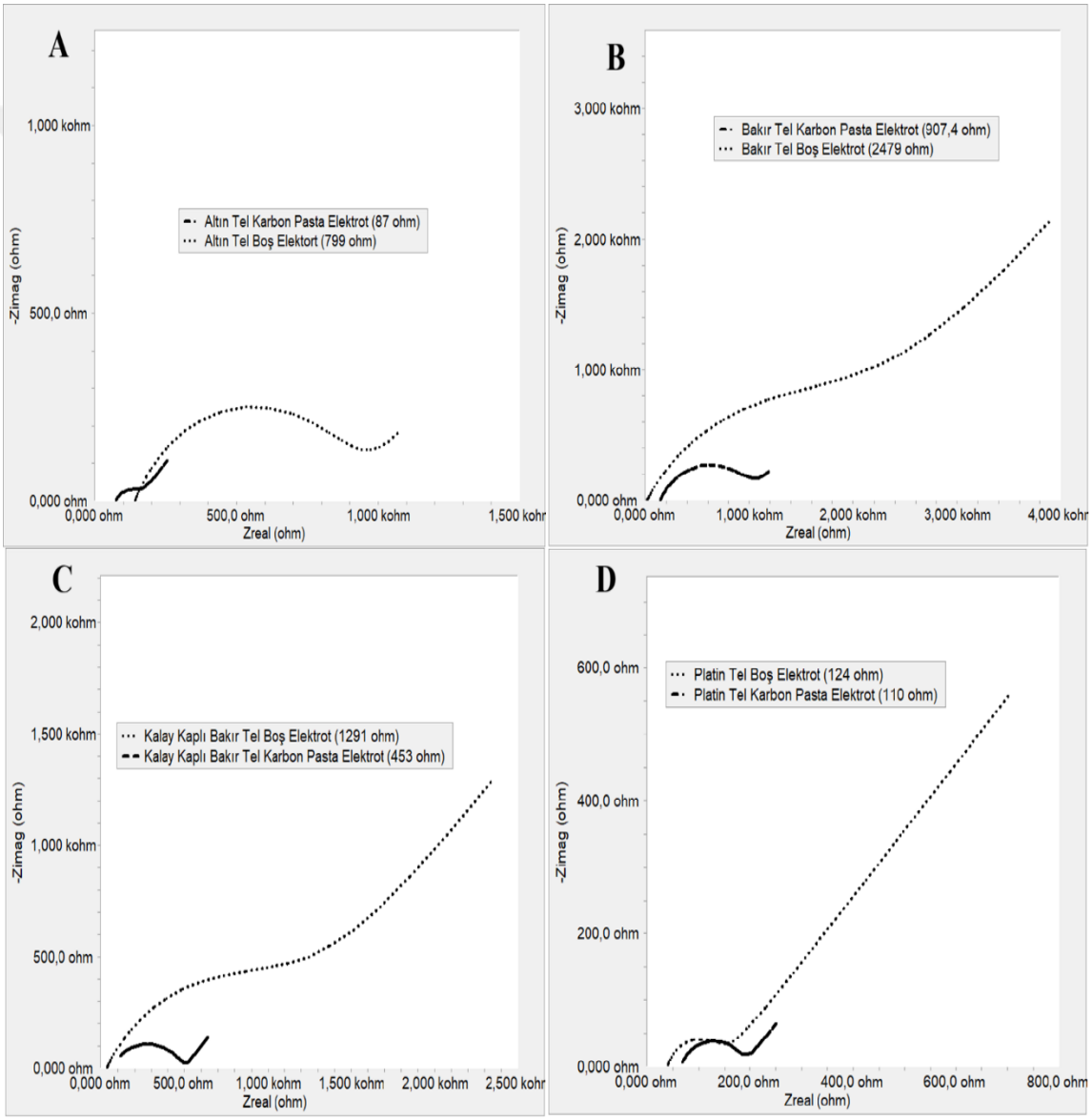
EKLENEN KATEŞOL MİKTARI	BİYOSENSÖR İLE ÖLÇÜLEN KATEŞOL MİKTARI	STANDART SAPMA	GERİ KAZANIM (%)
5 µM	5,27472 µM	1,80809	105,494
15 µM	15,02991 µM	0,41321	100,199
25 µM	24,64221 µM	1,21382	98,568
45 µM	44,5708 µM	1,63721	99,046
65 µM	65,65399 µM	1,47197	101,006
95 µM	94,83656 µM	1,74067	99,827

Çizelge 4.5-Çizelge 4.8'de gösterilen sonuçlara göre, Altın, bakır, kalay kaplı bakır ve platin tel kullanılarak hazırlanan 4 farklı biyosensörün de 5, 15, 25, 45, 65, 95

µM kateşol derişimlerinde kateşolü yüksek doğrulukta tespit edebildiği, düşük standart sapmaya ve yüksek geri kazanıma sahip olduğu gösterildi.

4.8. Tasarlanan Biyosensörlerin İmpedans Analizleri

Altın, bakır, kalay kaplı bakır ve platin tel kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin impedimetrik davranışlarını belirlemek amacıyla, her bir tel için karbon pasta elektrodu gövdesi bir dolu bir boş olacak şekilde impedans ölçümleri alındı. Sonuçlar Şekil 4.59'da verildi.



Şekil 4.59. Altın, bakır, kalay kaplı bakır ve platin tel kullanılarak hazırlanan karbon pasta çalışma elektrotlarının impedans analizine ait grafikler (A: Altın tel için, B: Bakır tel için, C: Kalay kaplı bakır için, D: Platin tel için)

Her bir tel için karbon pasta elektrodu gövdesi bir dolu bir boş olacak şekilde impedans ölçümleri alınan biyosensörlerin impedans analizine ait grafikleri Şekil 4.59'da verilmiştir. Şekil 4.59(A) altın tel kullanılarak hazırlanan biyosensörün impedans analizine aittir. Altın tel için elde edilen impedans sonuçlarına bakacak olursak boş elektrodun direnç değeri karbon pasta dolu elektrodun direnç değerinden fazla olduğu görülmektedir. Bu sonuç ohm yasasına göre karbon pasta dolu elektrodun içi boş elektroda göre daha iyi bir iletken olduğunu söylemektedir. Şekil 4.59 (B) bakır teli, Şekil 4.59 (C) kalay kaplı bakır teli ve Şekil 4.59 (D) platin teli kullanarak yapılan impedans analizine ait sonuçları göstermektedir. Şekil 4.59 (B), (C) ve (D)'deki sonuçları da incelediğimizde, Şekil 4.59 (A)'da olduğu gibi karbon pasta dolu elektrotların içi boş elektroda göre daha iyi bir iletken olduğu görülmektedir. Sonuç olarak karbon pastanın, elektrodun iletkenliğini arttırdığını söyleyebiliriz.

Literatürde, biyosensör çalışmalarında kullanılmak üzere üç boyutlu yazıcı ile karbon pasta çalışma elektrodu üretimine yönelik tek bir biyosensör tasarım çalışması yer almaktadır. Bu tasarım çalışmasında; üç boyutlu yazıcı ile üretilen 8 cm uzunluğundaki karbon pasta elektrot gövdesinin elektriksel bağlantısı bir bakır tel ile sağlanmış ve 7/3 ağırlık oranında grafit tozu ve parafin yağının karıştırılmasıyla elde edilen karbon pasta elektrot gövdesi üzerindeki boşluğa doldurulmuş ve parlatılarak bir camsı karbon elektrot ile kateşol tayini için karşılaştırılmıştır. Bu amaçla her iki elektrotta, elektrot yüzeyleri kitosan-altın nanotanecik-tirozinaz enziminden oluşan biyokompozit film ile kaplanmıştır. Geliştirilen biyosensörün korelasyon katsayısını 0.987 olarak bulunmuş, camsı karbon elektroda göre daha geniş doğrusal aralıkta (0-100 μM) olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada biyosensör tasarımında kullanılan bakır tel ile ilgili herhangi bir inceleme yapılmamıştır (Polatoğlu, 2018).

Çizelge 4.9'da, literatürde yer alan kateşol tayinine yönelik lakkaz ve tirozinaz temelli bazı biyosensörlerin LOD ve lineer tayin aralıkları bu çalışmada tasarlanan biyosensörlerle kıyaslanmıştır.

Çizelge 4.9. Geliştirilen biyosensörlerin literatürde yer alan kateşol tayinine yönelik diğer biyosensörler ile kıyaslanması

ENZİM	LOD	LİNEER ARALIK	REFERANS
Lakkaz	0,31 µM	0.39–8.98 µM	(Guo vd., 2014)
Lakkaz	0,35 µM	1-100 µM	(Qu vd., 2014)
Lakkaz	1,18 µM	9,95-9760 µM	(Fu vd., 2014)
Lakkaz	0,29 µM	1-100 µM	(Qu vd., 2015)
Lakkaz	0,66 µM	1,2-30 µM	(Liu vd., 2006)
Lakkaz	7 µM	15-700 µM	(Zhou vd., 2013)
Lakkaz	0,331 µM	4-87,98 µM	(Xu vd., 2009)
Lakkaz	0,67 µM	0,67-13,8 µM	(Xu vd., 2010)
Lakkaz	0,63 µM	1-1310 µM	(Li vd., 2014)
Tirozinaz	52 µM	50-400 µM	(Leboukh vd., 2018)
Tirozinaz	1 µM	2,5-100 µM	(Berne & Pecora, 1976)
Tirozinaz	0,43 µM	1-100 µM	(Slomczynski vd., 1995)
Tirozinaz	0,33 mM	0,5-8 mM	(Park vd., 2010)
Lakkaz	0.23 mg/L	0.5–10,0 mg/L	(Abdullah vd., 2007)
Lakkaz	2 µM	5-70 µM	(Karami & Taher, 2019
Tirozinaz	1,2 µM	1,6-140 µM	(Rajesh vd., 2004)
Tirozinaz	7,6 µM	10-80 µM	(Perez-Lopez & Merkoci, 2011)
Tirozinaz	0,84 µM	10-120 µM	(Apetrei vd., 2011)
Tirozinaz	6 µM	60-800 µM	(Tembe vd., 2007)
Tirozinaz	0,67 µM	3-50 µM	(Ozoner vd., 2010)
Tirozinaz	3,409 µM	1-10 mM	(Liu vd., 2017)
Lakkaz	2,003 µM	5-95 µM	Bu Çalışma (Altın Tel)
Lakkaz	1,040 µM	5-95 µM	Bu Çalışma (Bakır Tel)
Lakkaz	2,533 µM	5-95 µM	Bu Çalışma (Kalay Kaplı Bakır Tel)
Lakkaz	1,112 µM	5-95 µM	Bu Çalışma (Platin Tel)

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, biyosensör çalışmalarında kullanılmak üzere üç boyutlu yazıcı ile karbon pasta çalışma elektrodu başlığı üretimi gerçekleştirilmiş ve üretilen bu başlıklar ile altın, bakır, kalay kaplı bakır ve platin tel kullanılarak kateşol tayini için 4 farklı biyosensör geliştirilmiştir. Tasarlanan biyosensörler literatür ile kıyaslandığında uygun tayin aralığında yeterli hassasiyetle kateşol tayinini gerçekleştirebildiği net olarak söylenebilir. Bu çalışmada üretilen başlıklar, çok çeşitli farklı bileşiklerin analizi için yapılacak diğer biyosensör çalışmalarında ticari olarak satın almaktansa (100-150 €) daha düşük bir maliyet (0,5-1,0 €) ile tek kullanımlık karbon pasta çalışma elektrotları alternatifi olarak sunulabilir. Bu çalışmada uyguladığımız yöntemlerle tasarlanan ve üretilen çalışma elektrotlarının, tek kullanımlık ve düşük maliyetli olması, tekrar üretilebilirliğinin öne çıkması, hızlı ölçüm yapabilmesi, duyarlı

olması ve farklı iletken teller kullanılarak üretilebilmesi gibi önemli avantayları nedeniyle biyosensör tasarımlarında farklı bir alternatif olabileceğini söyleyebiliriz.

KAYNAKLAR

Abdullah, J., Ahmad, M., Heng, L. Y., Karuppiah, N., & Sidek, H. (2007). An optical biosensor based on immobilization of laccase and MBTH in stacked films for the detection of catechol. *Sensors, 7*(10), 2238–2250. https://doi.org/10.3390/s7102238

Adams, R. N. (1958). Carbon paste electrodes. *Analytical Chemistry*, *30*(9), 1576. https://doi.org/10.1021/ac60141a600

Akolpoğlu, M. B., Bozuyuk, U., Erkoc, P., & Kizilel, S. (2019). Biosensing–drug delivery systems for in vivo applications. In Inamuddin, R. M. Khan, & A. M. Asiri (Eds.), *Advanced biosensors for health care applications* (pp. 249–262). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815743-5.00009-3

Alachkar, A., Alhassan, S., & Senel, M. (2022). Lab-in-a-syringe: A novel electrochemical biosensor for on-site and real-time monitoring of dopamine in freely behaving mice. *ACS Sensors, 7*, 331–337. https://doi.org/10.1021/acssensors.1c02525

Alvarado-Gámez, A., Alonso-Lomillo, M., Domínguez-Renedo, O., & Arcos-Martínez, M. (2014). A disposable alkaline phosphatase-based biosensor for vanadium chronoamperometric determination. *Sensors*, *14*(2), 3756–3765. https://doi.org/10.3390/s140203756

Antonelli, M. L., Spadaro, C., & Tornelli, R. F. (2008). A microcalorimetric sensor for food and cosmetic analyses: l-Malic acid determination. *Talanta, 74*(5), 1450-1454. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.09.035

Apetrei, C., Rodriguez-Mendez, M. L., & De Saja, J. A. (2011). Amperometric tyrosinase-based biosensor using an electropolymerized phosphate-doped polypyrrole film as an immobilization support: Application for detection of phenolic compounds. *Electrochimica Acta, 56*(28), 8919–8925. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.07.127

Asav, E. (2021). Bazı Mantar Türlerinin Lakkaz Aktivitelerinin Kıyaslanması ve Clytocibe nebularis Türünün Biyosensör Sistemlerine Uygulanabilirliğinin İncelenmesi. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, *10*(3), 911-919. https://doi.org/10.17798/bitlisfen.957370

Aydın, L., & Küçük, S. (2015). Design and construction of ankle foot orthosis by means of three-dimensional printers. *In Tıp Tekno 2014, Perissia Hotel & Convention Center, Kapadokya* (pp. 130–132).

Bard, A. J., & Faulkner, L. R. (2000). *Electrochemical methods: Fundamentals and applications* (2 ed.). Wiley.

Berne, B., & Pecora, R. (1976). *Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology, and physics*. Wiley.

Bhand, S. G., Soundararajan, S., Surugiu-Wärnmark, I., Milea, J. S., Dey, E. S., Yakovleva, M., & Danielsson, B. (2010). Fructose-selective calorimetric biosensor in flow injection analysis. *Analytica chimica acta*, *668*(1), 13-18. https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.01.020

Campbell, T., Williams, C., Ivanova, O., & Garrett, B. (2011). Could 3D printing change the world. *Technologies, Potential, and Implications of Additive Manufacturing, Atlantic Council, Washington, DC*, *3*(1), 18.

Clark Jr, L. C., & Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of sciences*, *102*(1), 29-45. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x

Clark, L. C. (1956). Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. *Transactions of the American Society for Artificial Internal Organs*, *2*, 41.

Cooper, M. A. (2003). Label-free screening of bio-molecular interactions. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *377*, 834-842. https://doi.org/10.1007/s00216-003-2111-y

Damiati, S., Peacock, M., Leonhardt, S., Damiati, L., Baghdadi, M. A., Becker, H., Kodzius, R., & Schuster, B. (2018). Embedded disposable functionalized electrochemical biosensor with a 3D-printed flow cell for detection of hepatic oval cells (HOCs). *Genes*, 9(2), 89–99. https://doi.org/10.3390/genes9020089

Dias, A. A., Cardoso, T. M., Cardoso, R. M., Duarte, L. C., Muñoz, R. A., Richter, E. M., & Coltro, W. K. (2016). Paper-based enzymatic reactors for batch injection analysis of glucose on 3D printed cell coupled with amperometric detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *226*, 196–203. https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.11.040

Dinçkaya, E. (1999). *Biyosensörler*. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir.

Durmaz, T. (2016). *Kanser teşhisine yönelik elektrokimyasal impedans temelli biyosensör geliştirilmesi.* (Yüksek Lisans Tezi). Trakya Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

Elbadawi, M., Ong, J. J., Pollard, T. D., Gaisford, S., & Basit, A. W. (2021). Additive manufacturable materials for electrochemical biosensor electrodes. *Advanced Functional Materials*, *31*, Article 2006407. https://doi.org/10.1002/adfm.202006407

Erdem, C. (2012). *Glukoz tayini için nikel oksit modifiye karbon pasta elektrotların hazırlanması.* (Yüksek lisans tezi). Ankara Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Erol, A. (2020). *İlaç-DNA etkileşimine dayalı elektrokimyasal biyosensörlerin tasarımı ve uygulamaları.* (Yüksek lisans tezi). Aydın Adnan Menderes Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.

Finny, A. S., Jiang, C., & Andreescu, S. (2020). 3D printed hydrogel-based sensors for quantifying UV exposure. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *12*(39). https://doi.org/10.1021/acsami.0c12086

Fu, J., Qiao, H., Li, D., Luo, L., Chen, K., & Wei, Q. (2014). Laccase biosensor based on electrospun copper/carbon composite nanofibers for catechol detection. *Sensors*, *14*(5), 3543–3556. https://doi.org/10.3390/s140203543

Gowers, S. A., Curto, V. F., Seneci, C. A., Wang, C., Anastasova, S., Vadgama, P., Yang, G.-Z., & Boutelle, M. G. (2015). 3D printed microfluidic device with integrated biosensors for

online analysis of subcutaneous human microdialysate. *Analytical Chemistry, 87*(15), 7763–7770. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01353

Griesche, C., & Baeumner, A. J. (2020). Biosensors to support sustainable agriculture and food safety. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 128*, 115906. https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115906

Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical biosensors - Sensor principles and architectures. *Sensors (Basel), 8*(3), 1400–1458. https://doi.org/10.3390/s80314000

Guo, M., Wang, H., Huang, D., Han, Z., Li, Q., Wang, X., & Chen, J. (2014). Amperometric catechol biosensor based on laccase immobilized on nitrogen-doped ordered mesoporous carbon (N-OMC)/PVA matrix. *Science and Technology of Advanced Materials, 15*(1), 1–9. https://doi.org/10.1088/1468-6996/15/3/035005

Henao-Escobar, W., Domínguez-Renedo, O., Alonso-Lomillo, M. A., & Arcos-Martínez, J. (2013). A screen-printed disposable biosensor for selective determination of putrescine. *Microchimica Acta*. https://doi.org/10.1007/s00604-013-0989-4

Heinze, J. (1984). Cyclic voltammetry electrochemical spectroscopy: New analytical methods. *Angewandte Chemie International Edition in English, 23*(11), 831–847. https://doi.org/10.1002/anie.198408313

Homola, J. (2003). *Analytical and Bioanalytical Chemistry, 377*, 528–539. https://doi.org/10.1007/s00216-003-2101-0

Huang, K.-J., Sun, J.-Y., Xu, C.-X., Niu, D.-J., & Xie, W.-Z. (2009). A disposable immunosensor based on gold colloid modified chitosan nanoparticles-entrapped carbon paste electrode. *Microchimica Acta*. https://doi.org/10.1007/s00604-009-0254-z

Janshoff, A., Galla, H. J., & Steinem, C. (2000). *Angewandte Chemie International Edition, 39*, 4004–4032. https://doi.org/10.1002/1521-3773(20001117)39:22<4004::AID-ANIE4004>3.0.CO;2-2

Kalcher, K., Svancara, I., Buzuk, M., Vytras, K., & Walcarius, A. (2009). Electrochemical sensors and biosensors based on heterogeneous carbon materials. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly, 140*, 861-889. https://doi.org/10.1007/s00706-009-0131-9

Klonoff, D. C. (2005). A review of continuous glucose monitoring technology. *Diabetes Technology & Therapeutics, 7*(5), 770–775. https://doi.org/10.1089/dia.2005.7.770

Koncki, R. (2007). Recent developments in potentiometric biosensors for biomedical analysis. *Analytica Chimica Acta*, 599(1), 7-15. https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.08.003

Koyun, A., Ahlatcolu, E., Koca, Y., & Kara, S. (2012). Biosensors and their principles. *A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones, 5*, 42–117.

Kökbaş, U., Kayrın, L., & Tuli, A. (2013). Biyosensörler ve tıpta kullanım alanları. *Arşiv Kaynak Toplama Dergisi, 22*(4), 499–513.

Karami, C., & Taher, M. A. (2019). A catechol biosensor based on immobilizing laccase to Fe_3O_4@Au core-shell nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules, 129*, 84–90. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.015

Kuntawong, P., Kongintr, U., Promptmas, C. (2022). 3D printed-lactate amperometric biosensor for real-time noninvasive health monitoring in human sweat. *Clinica Chimica Acta*, 530, S11. https://doi.org/10.1016/j.cca.2022.04.312

Lakshmipriya, T., & Gopinath, S. C. (2019). An introduction to biosensors and biomolecules. In S. Gopinath & T. Lakshmipriya (Eds.), *Nanobiosensors for biomolecular targeting* (pp. 1–21). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813900-4.00001-4

Laschi, S., Bulukin, E., Palchetti, I., Cristea, C., & Mascini, M. (2008). Disposable electrodes modified with multi-wall carbon nanotubes for biosensor applications. *IRBM*. https://doi.org/10.1016/j.rbmret.2007.11.002

Leboukh, S., Gouzi, H., Coradin, T., & Yahia, H. (2018). An optical catechol biosensor based on a desert truffle tyrosinase extract immobilized into a sol–gel silica layered matrix. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, *87*(1), 1–7. https://doi.org/10.1007/s10971-018-4696-9

Li, D., Pang, Z., Chen, X., Luo, L., Cai, Y., & Wei, Q. (2014). A catechol biosensor based on electrospun carbon nanofibers. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, *5*, 346–354. https://doi.org/10.3762/bjnano.5.39

Liu, H., Wang, X., & Wu, D. (2017). Fabrication of graphene/TiO2/paraffin composite phase change materials for enhancement of solar energy efficiency in photocatalysis and latent heat storage. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *5*(6), 4906-4915. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00321

Liu, Y., Qu, X., Guo, H., Chen, H., Liu, B., & Dong, S. (2006). Facile preparation of amperometric laccase biosensor with multifunction based on the matrix of carbon nanotubes–chitosan composite. *Biosensors and Bioelectronics, 21*, 2195–2201. https://doi.org/10.1016/j.bios.2005.11.014

Loo, A. H., Chua, C. K., & Pumera, M. (2017). DNA biosensing with 3D printing technology. *Analyst, 142*(2), 279–283. https://doi.org/10.1039/c6an02038k

Maalouf, R., Chebib, H., Saïkali, Y., Vittori, O., Sigaud, M., & Jaffrezic-Renault, N. (2007). Amperometric and impedimetric characterization of a glutamate biosensor based on Nafion and a methyl viologen modified glassy carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics, 22*(12), 2682–2688. https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.11.003

Malhotra, B. D., Singhal, R., Chaubey, A., Sharma, S. K., & Kumar, A. (2005). Recent trends in biosensors. *Current Applied Physics, 5*, 92–97. https://doi.org/10.1016/j.cap.2004.06.021

Mittal, S., Kaur, H., Gautam, N., & Mantha, A. K. (2017). Biosensors for breast cancer diagnosis: A review of bioreceptors, biotransducers and signal amplification strategies. *Biosensors and Bioelectronics, 88*, 217-231. https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.028

Mohanty, S. P., & Kougianos, E. (2006). Biosensors: A tutorial review. *Potentials, IEEE, 25*, 35-40. https://doi.org/10.1109/MP.2006.1649009

Moradpour, H., Forootanfar, H., Ameri, A., & Beitollahi, H. (2024). Fabrication of the carbon paste electrode modified with Trametes versicolor laccase immobilized on carboxyl functionalized multi-walled carbon nanotubes and its application for measurement of dopamine. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137891. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.137891

Naresh, V., & Lee, N. (2021). A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. *Sensors, 21*(4), 1109. https://doi.org/10.3390/s21041109

Nejem, R. M. (2004). *Enantioselective Sensors and Biosensors for Clinical Analysis.* (Master of Science). University of Pretoria/The Faculty of Natural and Agricultural Sciences, Pretoria.

Nice, E. C., & Catimel, B. (1999). Instrumental biosensors: New perspectives for the analysis of biomolecular interactions. *Bioessays, 21*(4), 339-352. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199904)21:4<339::AID-BIES11>3.0.CO;2-C

Nicholson, R. S., & Shain, I. (1964). Theory of stationary electrode polarography. Single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems. *Analytical Chemistry*, 36(4), 706–723. https://doi.org/10.1021/ac60210a007

Noguer, T., Gradinaru, A., Ciucu, A., & Marty, J.-L. (1999). A new disposable biosensor for the accurate and sensitive detection of ethylenebis(dithiocarbamate) fungicides. *Analytical Letters*. https://doi.org/10.1080/00032719908542928

Ozcan, H. M., & Sezginturk, M. K. (2015). Detection of parathyroid hormone using an electrochemical impedance biosensor based on PAMAM dendrimers. *Biotechnology Progress, 31*(3), 815-822. https://doi.org/10.1002/btpr.2060

Ozoner, S. K., Yalvac, M., & Erhan, E. (2010). Flow injection determination of catechol based on polypyrrole-carbon nanotube-tyrosinase biocomposite detector. *Current Applied Physics, 10*(3), 323–328. https://doi.org/10.1016/j.cap.2009.06.017

Özbek, O., & Isildak, Ö. (2021). Polymer-based cadmium (II)-selective potentiometric sensors for the analysis of Cd^{2+} in different environmental samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1-14. https://doi.org/10.1080/03067319.2021.1877283

Palenzuela, C. L. M., & Pumera, M. (2018). (Bio)Analytical chemistry enabled by 3D printing: Sensors and biosensors. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 103, 110-118. https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.016

Park, S.-A., Jang, E., Koh, W.-G., & Kim, B. (2010). Fabrication and characterization of optical biosensors using polymer hydrogel microparticles and enzyme–quantum dot conjugates. *Sensors and Actuators B: Chemical, 150*(1), 120–125. https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.07.032

Perez-Lopez, B., & Merkoci, A. (2011). Magnetic nanoparticles modified with carbon nanotubes for electrocatalytic magnetoswitchable biosensing applications. *Advanced Functional Materials, 21*(2), 255–260. https://doi.org/10.1002/adfm.201001306

Polatoğlu, İ. (2018). Elektrokimyasal Biyosensörler için Karbon Pasta Elektrot Tasarımı ve Karakterizasyonu. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 22*, 141-148.

Qu, J., Lou, T., Wang, Y., Dong, Y., & Xing, H. (2015). Determination of catechol by a novel laccase biosensor based on zinc-oxide sol-gel. *Analytical Letters, 48*(12), 1842–1853. https://doi.org/10.1080/00032719.2014.1003427

Qu, J., Wang, Y., Guo, J., Lou, T., & Dong, Y. (2014). Determination of catechol by a laccase biosensor based on silica-modified zirconia nanoparticles. *Analytical Letters, 47*(13), 2537–2547. https://doi.org/10.1080/00032719.2014.915402

Rajesh, Takashima, W., & Kaneto, K. (2004). Amperometric phenol biosensor based on covalent immobilization of tyrosinase onto an electrochemically prepared novel copolymer poly(N-3-aminopropyl pyrrole-co-pyrrole) film. *Sensors and Actuators B: Chemical, 102*(2), 271–277 https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.04.028

Ramanathan, K., & Danielsson, B. (2001). Principles and applications of thermal biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, *16*(6), 417-423. https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00124-5

Randles, J. E. B. (1947). Kinetics of rapid electrode reactions. *Discussions of the Faraday Society, 1,* 11. https://doi.org/10.1039/df9470100011

Roda, A., Guardigli, M., Calabria, D., Calabretta, M. M., Cevenini, L., & Michelini, E. (2014). A 3D printed device for a smartphone-based chemiluminescence biosensor for lactate in oral fluid and sweat. *Analyst*, 139(24), 6494-6501. https://doi.org/10.1039/C4AN01612B

Sarika, C., Rekha, K. & Narasimha-Murthy, B. (2016). Immobilized laccase-based biosensor for the detection of disubstituted methyl and methoxy phenols-application of Box-Behnken design with response surface methodology for modeling and optimization of performance parameters. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 44*(7), 1741-1752. https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1096793

Sezginturk, M. K., Odaci, D., Pazarlioğlu, N., Pilloton, R., Dinçkaya, E., Telefoncu, A., & Timur, S. (2010). Construction and comparison of Trametes versicolor laccase biosensors capable of detecting xenobiotics. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, *38*(4), 192-199. https://doi.org/10.3109/10731191003776777

Sezginturk, M. K., & Uygun, Z. O. (2012). An impedimetric vascular endothelial growth factor biosensor-based PAMAM/cysteamine modified gold electrode for monitoring of tumor growth. *Analytical Biochemistry*, 423, 277-285. https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.12.049

Shahrubudin, N., Lee, T. C., & Ramlan, R. (2019). An overview on 3D printing technology: Technological, materials, and applications. *Procedia Manufacturing*, *35*, 1286-1296. https://doi.org/10.1016/j.promfg.2019.06.089

Sharma, A., Ahmed, A., Singh, A., Oruganti, S., Khosla, A., & Arya, S. (2021). Recent advances in tin oxide nanomaterials as electrochemical/chemiresistive sensors. *Journal of The Electrochemical Society, 168*(2), 027505. https://doi.org/10.1149/1945-7111/abdee8

Singh, A., Sharma, A., Ahmed, A., Sundramoorthy, A. K., Furukawa, H., Arya, S., & Khosla, A. (2021). Recent advances in electrochemical biosensors: Applications, challenges, and future scope. *Biosensors*, *11*(9), 336. https://doi.org/10.3390/bios11090336

Slomczynski, D., Nakas, J., & Tanenbaum, S. (1995). Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61-34. *Applied and Environmental Microbiology, 61*(3), 907–912. https://doi.org/10.1128/aem.61.3.907-912.1995

Stradiotto, N. R., Yamanaka, H., & Zanoni, M. V. B. (2003). Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry. *Journal of the Brazilian Chemical Society, 14*(2), 159–173. https://doi.org/10.1590/S0103-50532003000200003

Suni, I. I. (2008). Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry, 27*(7), 604-611. https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2008.03.012

Şahinçi, F. (2005). *İlaç-DNA etkileşmesinin elektrokimyasal algılanmasına dayalı tasarımlar.* (Yüksek Lisans Tezi). Ege Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Şiranlı, H. (2016). *Tek kullanımlık modifiye edilmiş ve edilmemiş grafit elektrotların DNA hibridizasyon sensörü olarak kullanılabilirliğinin araştırılması.* (Yüksek lisans tezi). Aydın Adnan Menderes Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.

Tahir, Z., Alocilja, E., & Grooms, D. (2008). Indium Tin Oxide-Polyaniline Biosensor: Fabrication and Characterization. *Sensors, 7*(7), 1123-1138. https://doi.org/10.3390/s7071123

Taleat, Z., Khoshroo, A., & Mazloum-Ardakani, M. (2014). Screen-printed electrodes for biosensing: A review (2008–2013). *Microchimica Acta, 181*, 865-891. https://doi.org/10.1007/s00604-014-1181-1

Telefoncu, A., (2008). *Biyosensörlere Genel Bakış ve Biyosensör Uygulamalarında Son Gelişmeler,* Ege Üniversitesi Biyosensör Yaz Okulu Kitabı, İzmir

Thevenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (1999). Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry*, *71*(12), 2333–2348. https://doi.org/10.1351/pac199971122333

Tembe, S., Inamdar, S., Haram, S., Karve, M., & D'Souza, S. F. (2007). Electrochemical biosensor for catechol using agarose-guar gum entrapped tyrosinase. *Journal of Biotechnology*, *128*(1), 80–85. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.09.020

Tombelli, S., Minunni, M., & Mascini, M. (2005). Analytical applications of aptamers. *Biosensors and Bioelectronics*, *20*(12), 2424-2434. https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.11.006

Tuncay, D., & Ergene, B. (2024). Determination of the total phenolic content in Hardaliye by amperometric laccase-based biosensor and comparison of the LC-MS/MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, *134*, 106487. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.106487

Tural, H., Ertaş, F. N., & Gökçel, H. (2006). *Enstrümental Analiz ve Elektroanalitik Yöntemler.* İzmir: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, 339 s.

Velasco-Garcia, M. N. (2009). Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects. *Seminars in Cell & Developmental Biology, 20*(1), 27-33. Academic Press. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.01.013

Vermeir, S., Nicolaï, B. M., Verboven, P., Van Gerwen, P., Baeten, B., Hofl ack, L., Vulsteke, V., & Lammertyn, J. (2007). Analytical chemistry, *79*(16), 6119-3127.

Vo-Dinh, T., & Cullum, B. (2000). Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, *366*(6), 540-551. https://doi.org/10.1007/s002160051549

Wang, J. (2002). *Analytical Electrochemistry* (2nd ed.). John Wiley & Sons, Inc., New York, USA. https://doi.org/10.1007/s00897020566a

Wang, J., & Kawde, A. N. (2001). Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization. *Analytica Chimica Acta*, *431*(2), 219-224. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01318-0

Wang, J., Kawde, A. N., & Sahlin, E. (2000). Renewable pencil electrodes for highly sensitive stripping potentiometric measurements of DNA and RNA. *Analyst, 125*(1), 5-7. https://doi.org/10.1039/A907364G

Wang, H. B., Zhang, H. D., Ping Xu, S., Gan, T., Huang, K. J., & Liu, Y. M. (2014). A sensitive and label-free electrochemical impedance biosensor for protein detection based on terminal protection of small molecule-linked DNA. *Sensors and Actuators B: Chemical, 194*, 478–483. https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.01.002

Wohler, R. (2015). *Wohler Report, 3D Printing and Additive Manufacturing State of the Industry, Annual Worldwide Progress Report*, 18-182.

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

Xu, X., Lu, P., Zhou, Y., Zhao, Z., & Guo, M. (2009). Laccase immobilized on methylene blue modified mesoporous silica MCM-41/PVA. *Materials Science and Engineering: C, 29*, 2160–2164. https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.04.019

Yan, Q., Dong, H., Su, J., Han, J., Song, B., Wei, Q., & Shi, Y. (2018). A review of 3D printing technology for medical applications. *Engineering, 4*(5), 729-742. https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.07.021

Yücel, A. (2023). *Potansiyel obezite biyobelirteçlerinin tayini için impedimetrik biyosensör sistemlerinin geliştirilmesi*. (Doktora tezi). Trakya Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

Zhou, X.-H., Liu, L.-H., Bai, X., & Shi, H.-C. (2013). A reduced graphene oxide based biosensor for high-sensitive detection of phenols in water samples. *Sensors and Actuators B: Chemical, 181*, 661–667. https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.02.021

ÖZGEÇMİŞ

Lise eğitimimi Lüleburgaz Anadolu Lisesi'nde 2017 yılında tamamladım. 2017 yılında Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü'nde lisans eğitimime başladım; 2021 yılında bölüm birinciliği ile mezun oldum. 2022 yılında Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda başladığım yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.