



**EVSEL ATIKLARDAN NANOPARTİKÜL ELDESİ VE GLUKOZ
BİYOSENSÖRÜ TASARIMINDA KULLANIMI**

Sevda ÜÇDEMİR PEKTAŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

AĞUSTOS 2023

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Sevda ÜÇDEMİR PEKTAŞ

02/08/2023

EVSEL ATIKLARDAN NANOPARTİKÜL ELDESİ VE GLUKOZ BİYONSENSÖRÜ TASARIMINDA KULLANIMI

(Yüksek Lisans Tezi)

Sevda ÜÇDEMİR PEKTAŞ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ağustos 2023

ÖZET

Nanoteknoloji, fonksiyonel materyaller elde etmek amacıyla nanopartiküllerin tasarlanmasını ve sentezlenmesini amaçlayan multidisipliner bir bilim dalıdır. Nanopartiküller (1-100 nm) sahip oldukları fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı pek çok alanda kullanılmaktadır. Nanopartikül sentezi kimyasal, fiziksel ve biyolojik teknikler kullanılarak yapılabilmektedir. Kullanılan kimyasal yöntemlerin toksik olma, üretim hızının düşük olması, maliyetin çok olması ve verimin düşük olması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu nedenlerle çevre dostu ve düşük maliyetli yeşil sentez yöntemi, kimyasal ve fiziksel yöntemlere alternatif olarak geliştirilmiştir. Yeşil sentez yönteminde bitkiler, bakteriler, algler ve mantarlar kullanılmaktadır. Şehirleşmenin artmasıyla birlikte evsel katı atıklar yerleşim merkezlerinde karşılaşılan en büyük sorunlardan biri haline gelmiş ve atıkların bertaraf edilmesi ile teknoloji alanına kazandırılması oldukça önem kazanmıştır. Yapılan bu çalışmada, evsel çay atığı özütü kullanılarak gümüş nanopartiküllerin biyosentezi gerçekleştirilmiştir. Nanopartikül oluşumu çözelti renginin sarımsı turuncudan koyu kahverengiye dönüşmesi ile gözlenmiştir. Gümüş nanopartikül karakterizasyonu UV-Vis spektroskopisi, FTIR ve SEM ile yapılmıştır. UV-Vis spektroskopisi ile 450 nm’de maksimum absorbans verdiği, partikül boyutlarının ortalama 70 nm olduğu tespit edilmiştir. Karakterize edilen gümüş nanopartikül ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrot hazırlanmıştır. Hazırlanan karbon pasta elektrot yüzeyine glukoz oksidaz enzimi çapraz bağlama yöntemi ile immobilize edilmiştir. Glukoz tayini, hazırlanan enzim elektrotun yüzeyinde gerçekleşen enzimatik tepkime sonucu oluşan hidrojen peroksidin +0,4 V ‘da yükseltgenmesi esasına dayanılarak yapılmıştır. Glukoz tayinine pH ve sıcaklık etkisi incelenmiş ve doğrusal çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M olarak belirlenmiştir. K_m (göz) ve I_{max} değerleri sırasıyla 0,0129 μ M ve 38,5 μ A olarak bulunmuştur. Ayrıca enzim elektrotun tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrü tayin edilmiştir. Hazırlanan biyosensör cevabı üzerine girişim yapabilecek maddelerin etkileri incelenerek, biyosensör meyve suyunda ve sentetik kan örneğinde glukoz ölçümü için test edilmiştir. Glukoz miktarı sentetik kan numunesinde $1,0 \pm (0,0014) \times 10^{-6}$ M, meyve suyunda $44,37 \pm 4,14$ g/L olarak bulunmuştur.

Bilim Kodu : 20104
Anahtar Kelimeler : Atık çay, gümüş nanopartikül, glukoz biyosensörü, yeşil sentez
Sayfa Adedi : 97
Danışman : Prof. Dr. Fatma ARSLAN

OBTAINING NANOPARTICLES FROM DOMESTIC WASTES AND THEIR USE IN GLUCOSE BIOSENSOR DESIGN

(M. Sc. Thesis)

Sevda ÜÇDEMİR PEKTAŞ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

August 2023

ABSTRACT

Nanotechnology is a multidisciplinary branch of science that aims to design and synthesize nanoparticles in order to obtain functional materials. Nanoparticles (1-100 nm) are used in many fields due to their physical and chemical properties. Nanoparticle synthesis can be performed using chemical, physical and biological techniques. The chemical methods used have disadvantages such as being toxic, low production speed, high cost and low efficiency. For these reasons, it has been developed as an alternative to chemical and physical methods with an environmentally friendly and low-cost green synthesis method. Plants, bacteria, algae and fungi are used in the green synthesis method. With the increase in urbanization, household solid waste has become one of the biggest problems encountered in residential centers, and it has become very important to dispose of waste and bring them to the technology field. In this study, the biosynthesis of silver nanoparticles was carried out using household tea waste extract. Nanoparticle formation was observed by changing the color of the solution from yellowish orange to dark brown. Silver nanoparticle characterization was performed by UV-Vis spectroscopy, FTIR and SEM. It was determined by UV-Vis spectroscopy that it gives a maximum absorbance at 450 nm and the average particle size is 70 nm. A modified carbon paste electrode was prepared with the characterized silver nanoparticle. The prepared carbon paste was immobilized on the electrode surface by the glucose oxidase enzyme cross-linking method. Glucose determination was made on the basis of oxidation of hydrogen peroxide at +0.4 V, which was formed as a result of enzymatic reaction on the surface of the prepared enzyme electrode. The effect of pH and temperature on glucose determination was studied and the linear operating range was determined as $1.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-6}$ M. The K_m and I_{max} values were found to be 0.0129 μ M and 38.5 μ A, respectively. In addition, the reusability and shelf life of the enzyme electrode were determined. By examining the effects of substances that may interfere with the prepared biosensor response, the biosensor was tested for glucose measurement in fruit juice and synthetic blood sample. The amount of glucose was found to be $1.0 \pm (0.0014) \times 10^{-6}$ M in the synthetic blood sample and 44.37 ± 4.14 g/L in fruit juice.

Science Code : 20104
Key Words : Tea waste, silver nanoparticles, glucose biosensor, green synthesis
Page Number : 97
Supervisor : Prof. Dr. Fatma ARSLAN

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezimin bütün aşamalarında derin bilgi birikimi ve engin tecrübesiyle beni destekleyen ve her konuda yardımcı olan, güler yüzlü ve anlayışlı değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fatma ARSLAN'a, çalışmalarına katkı sağlayan ve bana yol gösteren hocam Sayın Prof. Dr. Halit ARSLAN'a, Yüksek Lisans öğrenim sürecim boyunca her türlü yardımda bulunan ve beni aydınlatan hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Merve KESKİN'e, laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan ve bana destek olup zaman ayıran Arş. Gör. Onur Can BODUR'a, beni her konuda destekleyen, sonsuz sabrı ile yanımda olan hayat arkadaşım M. Bahadır PEKTAŞ'a ve bana dünyanın en güzel hediyesi olan oğlum Poyraz PEKTAŞ'a, bu çalışmaya zaman ayırabilmem için beni her türlü idare eden ve destekleyen arkadaşlarım Gözde UĞURLUOL'a ve Esin KESKİN ARPA'ya, maddi manevi her türlü desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen sevgili aileme, sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Nanopartikül.....	5
2.1.1. Nanopartiküllerin sentezi.....	7
2.1.2. Yeşil kimyanın ilkeleri	9
2.2. Yeşil Sentez.....	10
2.2.1. Yeşil sentezin avantajları.....	11
2.2.2. Yeşil sentezde kullanılan indirgeyiciler	11
2.2.3. Nanopartiküllerin karakterizasyonu	13
2.2.4. Nanopartiküllerin kullanım alanları.....	15
2.2.5. Gümüş nanopartikül	16
2.3. Atık.....	18
2.3.1. Çay bitkisi atığı.....	21
2.4. Biyosensörler.....	23
2.4.1. Biyosensörlerin tarihçesi	24
2.4.2. Biyosensörlerin yapısı	25
2.4.3. Biyosensörlerin sınıflandırılması.....	27

	Sayfa
2.4.4. Biyosensörlerin immobilizasyonu	29
2.5. Enzimler	32
2.5.1. Enzimlerin sınıflandırılması	32
2.5.2. Enzimlerin yapısı	33
2.5.3. Glukoz oksidaz enzimi	35
2.6. Glukoz	38
2.7. Karbon Pasta Elektrotlar	39
2.8. Kaynak Araştırması.....	41
3. GEREKÇE VE YÖNTEM.....	49
3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	49
3.2. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler	49
3.3. Deneylerde Kullanılan Cihazlar	51
3.3.1. Elektrokimyasal analiz cihazı	51
3.3.2. Hücre ve elektrotlar	51
3.3.3. Su banyosu.....	51
3.3.4. pH metre	52
3.3.5. Mikro pipet	52
3.3.6. Saf su cihazı.....	52
3.3.7. SEM cihazı	52
3.3.8. FTIR cihazı	52
3.3.9. Hassas terazi	52
3.3.10. UV-VIS spektroskopi cihazı.....	52
3.4 Nanopartikül Sentezi	53
3.4.1. Çay ekstraktının hazırlanması	53
3.4.2. AgNP'nin yeşil sentezi	53
3.4.3. Nanopartiküllerin karakterizasyonu	54

Sayfa

3.5. Glukoz Biyosensörünün Hazırlanması ve En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi.....	54
3.5.1. Çalışma elektrodunun hazırlanması: Karbon pasta elektrot (CPE) ve modifiye karbon pasta elektrot (MCPE) hazırlanması	54
3.5.2. Karbon pasta elektrodun sabit akıma getirilmesi	55
3.5.3. CPE ve MCPE'nin Hidrojen Peroksite karşı duyarlılığı	55
3.5.4. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi.....	56
3.5.5. MCPE'nin Hidrojen Peroksit duyarlılığına AgNP miktarının etkisi.....	56
3.5.6. Enzimin MCPE'ye immobilizasyonu	56
3.5.7. Gluteraldehit miktarının etkisi.....	57
3.5.8. Enzim elektrodun en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi.....	57
3.5.9. Biyosensör üzerine girişim yapan türlerin etkisinin incelenmesi.....	59
3.5.10. Gerçek numunede glukoz tayini	59
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	61
4.1. Ag Nanopartikülün Yeşil Sentez Sonuçları	62
4.2. Gümüş Nanopartikülün Karakterizasyonu	63
4.2.1. Ag nanopartikülünün FT-IR karakterizasyonu.....	63
4.2.2. Ag nanopartikülünün SEM karakterizasyonu.....	64
4.2.3. Ag nanopartikülün EDX karakterizasyonu.....	65
4.2.4. Ag nanopartiküllerinin UV-VIS spektroskopisi	66
4.3. Glukoz Biyosensörünün Hazırlanması.....	67
4.3.1. CPE ve MCPE'nin H ₂ O ₂ 'e duyarlılıklarının belirlenmesi	67
4.3.2. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi.....	68
4.3.3. MCPE'nin H ₂ O ₂ duyarlılığına AgNP miktarının etkisi.....	69
4.3.4. Biyosensörün glukoz duyarlılığına gluteraldehit miktarının etkisi	70
4.3.5. Enzim elektrodun en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi.....	72
4.3.6. Glukoz tayinine girişim yapan türlerin etkisi	79

	Sayfa
4.3.7. Gerçek numunede glukoz tayini	80
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	83
KAYNAKLAR	85
ÖZGEÇMİŞ	97

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan tüm kimyasal maddeler	49
Çizelge 4.1. Çalışma sonuçlarının literatür ile karşılaştırılması	61
Çizelge 4.2. Biyosensörün glukoz tayinine girişim yapan maddelerin girişim oranları.	80

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Lycurgus kupası.....	5
Şekil 2.2. Nanopartiküllerin sınıflandırılması.....	7
Şekil 2.3. Nanopartiküllerin sentez yöntemleri.....	9
Şekil 2.4. Nanoteknolojinin ilişkili olduğu bilim dalları	15
Şekil 2.5. Gümüş nanopartiküllerin kullanım alanları	16
Şekil 2.6. Gümüş nanopartiküller konusunda yayımlanmış araştırma makalelerindeki eğilim.....	17
Şekil 2.7. Gümüş nanopartiküllerin araştırma alanları	17
Şekil 2.8. Nanopartikül ile ilgili yayımlanan makalaların ülkelere göre dağılımı.....	18
Şekil 2.9. Evsel atık	20
Şekil 2.10. Sıfır atık projesi görseli	21
Şekil 2.11. Çay bitkisi	22
Şekil 2.12. Glukoz tespiti için bir Clark enzim elektrotunun şematik diyagramı.....	24
Şekil 2.13. Biyosensörlerin tarihsel gelişimi	25
Şekil 2.14. Bir biyosensörün genel şematik gösterimi	25
Şekil 2.15. Biyosensörlerin yapısı ve bileşenleri	26
Şekil 2.16. Biyosensörlerin sınıflandırılması.....	27
Şekil 2.17. Enzim esaslı biyosensörlerin çalışma şeması	28
Şekil 2.18. İmmobilizasyon teknikleri, E: enzim, P: protein	29
Şekil 2.19. Enzimin substrat ile tepkimesi.....	34
Şekil 2.20. Michaelis-Menten grafiği	34
Şekil 2.21. Lineweaver-Burk grafiği	35
Şekil 2.22. Glukoz oksidaz, Glukoz oksidaz iki alt birimi ile koyu ve açık mavi, FAD koenzimi ise pembe olarak tasvir edilmiştir	36
Şekil 2.23. Glukoz oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon	37

Şekil	Sayfa
Şekil 2.24. Glukoz oksidaz enziminde yer alan FAD grubu.....	38
Şekil 2.25. Glukozun molekül yapısı.....	38
Şekil 2.26. Karbon pasta elektrot.....	40
Şekil 2.27. Grafit molekülü.....	41
Şekil 3.1. Malzemesi teflon olan ve özel olarak hazırlanan karbon pasta elektrot.....	51
Şekil 3.2. Siyah çay atığı özütü kullanılarak AgNP sentezi	53
Şekil 3.3. MCPE hazırlanması ve çalışma hücresi şeması.....	55
Şekil 4.1. AgNP'nin renk dönüşümü.	62
Şekil 4.2. a) AgNP'lere ait FTIR spektrumları b) Çayın sulu ektresine ait FTIR spektrumları c) a ve b şekillerindeki pik tablosu	64
Şekil 4.3. AgNP'lerin SEM analizi.....	65
Şekil 4.4. AgNP'lerin EDX analizi.....	66
Şekil 4.5. AgNP'lerin UV-Görünür Bölge Spektrumu.....	67
Şekil 4.6. MCPE ve CPE'nin H ₂ O ₂ duyarlılığı	68
Şekil 4.7. MCPE'un H ₂ O ₂ 'e duyarlılığı üzerine çalışma potansiyelinin etkisi.....	69
Şekil 4.8. MCPE'deki kullanılan AgNP miktarının H ₂ O ₂ cevabına etkisi	70
Şekil 4.9. Glukoz duyarlılığına glutraldehit miktarının etkisi.....	71
Şekil 4.10. Glukoz duyarlılığına pH'ın etkisi	73
Şekil 4.11. Biyosensörün glukoza duyarlılığına sıcaklığın etkisi	74
Şekil 4.12. Biyosensörün amperometrik cevabına karşı Glukoz derişiminin etkisi.....	76
Şekil 4.13. Glukoz biyosensörü için kalibrasyon grafiği	76
Şekil 4.14. Biyosensörün amperometrik cevabına Glukoz derişiminin etkisi	77
Şekil 4.15. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi.....	78
Şekil 4.16. Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi.....	79

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
dk	Dakika
g	Gram
M	Molar derişim
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar derişim
mV	Milivolt
nA	Nanoamper
°C	Santigrat derece
R ²	Lineer regresyon katsayısı
s	Saniye
V	Volt
Δi	Akım farkı
μA	Mikroamper
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar derişim
Kısaltmalar	Açıklamalar
AgNO ₃	Gümüş Nitrat çözeltisi
AgNP	Gümüş Nanopartikül
AgNPs	Gümüş Nanopartiküller
BSA	Bovin serum albümin
CPE	Karbon pasta elektrot
CV	Dönüşümlü voltametri
DPV	Diferansiyel puls voltametri

Kısaltmalar	Açıklamalar
E	Enzim
EC	Enzim Kodu
ES	Enzim - substrat ara kompleksi
ES	Enzim - substrat ara kompleksi
GAD	Gluteraldehit
GOD	Glukoz oksidaz enzimi
I_{max}	Maksimum akım farkı
K_m	Michaelis-Menten sabiti
LOD	Gözlenebilme sınırı
LOQ	Alt tayin sınırı
MCPE	Modifiye karbon pasta elektrot
NP	Nanopartikül
S	Substrat
UA	Ürik asit
V_{max}	Maksimum hız

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji, nano ölçekte yeni malzemeler üretmeyi amaçlayan bir bilim dalı olmakla birlikte teknolojiadaki uygulamalar ile gelişen bir alandır (Rajeshkumar, Bharath ve Geetha, 2019). Ayrıca nanoteknoloji, yaklaşık 1 ila 100 nm arasında değişen nanopartiküllerin sentezi ve uygulamaları ile ilgilenen önemli bir modern araştırma alanıdır. Nanopartiküllerin ve nanomalzemelerin yeni uygulama alanları; boyutlarına, dağılımlarına ve morfolojilerine göre tamamen yeni veya geliştirilmiş fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri nedeniyle çeşitli alanlarda hızla artmaktadır. Sağlık, kozmetik, biyomedikal, gıda ve yem, ilaç-gen dağıtımı, çevre, sağlık, mekanik, optik, kimya endüstrileri, elektronik, uzay endüstrileri, enerji bilimi, kataliz gibi çok sayıda alanda önemli bir yere sahip olmaktadır (Zhang, Liu, Shen ve Gurunathan, 2016).

Genel olarak nanopartiküller, çeşitli biyolojik risklerden sorumlu toksik ve tehlikeli kimyasalların kullanımını içeren, oldukça pahalı ve çevre için potansiyel olarak tehlikeli olan çeşitli kimyasal ve fiziksel yöntemlerle sentezlenir (Ahmed, Ahmad, Swami and Ikram, 2016). Genellikle nanopartikül sentezinde yer alan iki yaklaşım bulunmaktadır. Bu yöntemler yukarıdan aşağıya sentez ve aşağıdan yukarıya sentez yöntemidir. Aşağıdan yukarıya sentez yönteminde nano ölçekli bir parçacığa dönüşen atomların, kendi kendine toplanmasıyla birlikte kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılarak sentezlenebilir. Bu yöntemin en büyük avantajlarından biri, çok miktarda nanopartikülün kısa sürede sentezlenebilmesidir. Bu sentez sırasında kullanılan kimyasallar toksiktir ve çevre dostu olmayan yan ürünlere yol açar. Yukarıdan aşağıya sentezde nanopartiküller genellikle atmosfer basıncında bir tüp fırın kullanılarak buharlaşma-yoğuşma ile sentezlenir. Bu yöntemde ise uygulama esnasında geniş alan kaplanmakta ve ortam sıcaklığı çok yükseltilmektedir. Bu sıcaklık artışı için fazlaca enerji gerektirmesi bu sentez yönteminde dezavantaj oluşturmaktadır. Genel olarak bu yöntemlerin belirli sınırlamaları ve dezavantajları bulunduğundan yerlerini çevre dostu olan yeşil senteze bırakmaktadırlar (Singh ve diğeri, 2018). Yeşil sentez yöntemi atıkların önlenmesine yardımcı olması, kirliliği azaltması, sürdürülebilir olması, düşük maliyetli olması, yüksek verim sağlaması ve toksik olmaması gibi yenilikçi özellikleriyle öne çıkmaktadır (Thakkar ve diğerleri, 2010). Yeşil sentezde indirgeyici ajan olarak genellikle bitkiler, mantarlar, algler ve bakteriler kullanılmaktadır (Rafique ve diğerleri, 2017). Yapılan çalışmalarda bitkilerin tüm kısımları nanopartikül sentezinde kullanılabilir. Nanopartiküllerin oluşumu için bitki

kullanmasının çeşitli avantajları vardır. Bunlar bitkilerin kolayca erişilebilir olması, kullanımının sıklıkla güvenli olması ve metal iyonunun azaltılmasını ilerletebilecek geniş bir aktif madde yelpazesine sahip olmasıdır. Bitki atıklarından yeşil sentez yöntemiyle nanopartikül sentezi de son zamanların dikkat çeken konularındandır (Basavegowda, 2013).

Teknolojinin ilerlemesiyle birlikte nüfus çoğalmakta ve şehirleşme artmaktadır. Bunun doğal bir sonucu olarak atık miktarı da gün geçtikçe çoğalmaktadır. Türkiye’de 2018 yılında kişi başına düşen atık miktarı günlük 1,16 kg’dır. Üç büyük şehirde ise toplanan kişi başı günlük ortalama atık miktarının İzmir için 1,36 kg, Ankara için 1,18 kg ve İstanbul için 1,28 kg olduğu tespit edilmiştir. 2020 yılında ise kişi başına düşen atık miktarı 1,13 kg’dır (URL-1). Bu atık miktarını azaltmak ve hatta atık oluşumunu önlemek amacıyla pek çok proje yürütülmekte ve farkındalık oluşturulmaya çalışılmaktadır. Türkiye çay tüketiminde dünyada 1. sırada yer aldığından çay atığı da ülkemizde önemli miktarda açığa çıkmaktadır. Söz konusu çay atığının geri kazanımı da oldukça önemli olmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada çay atığı nanopartikül sentezinde kullanılmış olup söz konusu nanopartiküller biyosensör tasarımında kullanılmıştır.

Biyosensörler, analitlerin konsantrasyonuyla orantılı ölçülebilir sinyal üretmek amacıyla biyolojik bir tanıma elemanını bir fiziksel dönüştürücü ile kombine eden biyoanalitik cihazlardır. Bir biyosensörün genel şemasında, biyolojik tanıma elemanı hedef bileşiğe yanıt verir ve dönüştürücü söz konusu biyolojik yanıtı elektrokimyasal, mekanik, optik, akustik, kalorimetrik veya elektronik olarak ölçülebilen ve daha sonra analit konsantrasyonu ile ilişkilendirilebilen, saptanabilir bir sinyale dönüştürür (Su, Jia, Hou ve Lei, 2011). "International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC) tanımlarına göre ise “biyosensörler, sinyal üretmek için biyolojik reaksiyon kullanan kimyasal sensörlerdir” şeklinde tanımlanmaktadır (Faridbod, Ganjali, Larijani, Norouzi ve Hosseini, 2014).

Biyosensörün kullanıldığı alanlara tıp, ilaç, çevre, mühendisliğin pek çok dalı, biyoloji, kimya, fizik ve nanoteknoloji örnek verilebilmektedir (Arslan ve Keskin, 2020). Biyosensörler; tıp alanında teşhis ve tedavide yüksek duyarlılık ve hızlı cevap süresine sahip olmanın yanı sıra basit ve ucuz olmasının sağladığı avantajlar sayesinde kullanılmaktadır.

Glukoz, vücudumuzda meydana gelen pek çok metabolik olayda önemli bir role sahip olmasının yanında, vücudun enerji üretiminde aktif rol oynamakta olup vücut dokularının

bakımı ve büyümesi için gerekli metabolik ara maddelere dönüştürülür. Bununla birlikte glukoz bitkilerde fotosentez esnasında da çok önemli bir yere sahiptir (Erbaş, 2023). Tüm canlılar için kritik öneme sahip böylesi bir molekülün tayini de büyük önem taşımaktadır. İnsanlarda kanda glukoz tayini pek çok hastalığın teşhis ve tedavisinde önemli bir yere sahiptir. Kandaki glukoz seviyesindeki bozukluklar çeşitli hastalıklara yol açmaktadır. Bu hastalıklar içerisinde en çok karşılaşılan ise *Diabetes Mellitus*. *Diabetes mellitus*, modern dünyada en sık görülen maliyetli ve DALY'si yüksek olan hastalıklardan biridir (Karagöllu ve diğerleri, 2013). Beslenme bozuklukları ve hareketsiz yaşam ile birlikte her geçen gün insanların diyabet hastalığına yakalanma ihtimali artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü yaptığı araştırmaya göre 2020 yılında dünya üzerinde 171 milyon kişinin diyabet hastası olduğunu belirtirken bu sayının 2030 yılında 366 milyona yaklaşacağını öngörmüşlerdir (URL-2). Bu nedenle glukoz biyosensörlerinin geliştirilmesine diyabet hastalığının tedavisinin doğru şekilde yapılabilmesi ve kontrolü için kan şekerinin hızlı ve doğru şekilde tespitine olanak sağladığından ve aynı zamanda mali açıdan avantajlı olduğundan çok önem verilmekte ve çaba harcanmaktadır (Arslan, Ustabas ve Arslan, 2011).

Bu tez çalışmasında, yüksek miktarda oluşan evsel atıkların sağlık ve teknoloji alanında kullanım potansiyelini de ortaya çıkarabilmek amacıyla yeşil sentez yöntemiyle gümüş nanopartiküller sentezlenerek biyosensör tasarımında kullanıldı. Bu amaçla ülkemizde ve dünyada sudan sonra en çok tüketilen ikinci içecek olan çayın atığı olan siyah çay posası nanopartikül sentezinde gümüş iyonlarını indirgeyici olarak kullanıldı (Vinson, Teufel ve Wu, 2004). Sentezlenen nanopartiküller Ultraviyole Görünür Spektrofotometri (UV-VIS Spektroskopisi) , Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Enerji Dağıtım X-Işını Spektroskopisi (EDX) ile karakterize edilerek yeni bir biyosensör tasarımında kullanıldı. Ardından gümüş nanopartikül kullanılarak karbon pasta elektrot modifiye edildi. Modifiye karbon pasta elektrodun yüzeyine glukoz oksidaz enzimi çapraz bağlanarak immobilize edildi.

Glukoz tayini, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksidin +0,40 V'da yükseltgenmesi esasına dayanılarak yapıldı. Bu amaçla elektrodu modifiye etmede kullanılan optimum gümüş nanopartikül miktarı belirlendi. Gümüş nanopartikül modifiye edilmiş glukoz biyosensörünün optimum çalışma koşulları belirlendi. Tasarlanan glukoz biyosensörün cevabına pH, sıcaklık ve substrat derişimi etkisi incelendi. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrü çalışması yapıldı. Hazırlanan biyosensörün doğrusal çalışma

aralığı, $K_{m(göz)}$ ve $I_{maks(göz)}$ değerleri tespit edildi. Biyosensörün cevabına girişim yapan türlerin etkisi araştırıldı. Hazırlanan biyosensörün gerçek bir numuneye uygulanabilirliğini belirlemek amacıyla hem sentetik kan serumunda hem de meyve suyunda glukoz miktarı test edildi. Atık çay kullanılarak gümüş nanopartikül eldesi ve elde edilen nanopartiküllerin glukoz biyosensörü tasarımında kullanılması tez çalışmasını yenilikçi ve özgün yapmaktadır. Bu çalışma ayrıca Sürdürülebilir Kalkınma Amaçlarına (SKA) ve Toplumsal Katkı Önceliklerine de hizmet etmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nanopartikül

Nanoteknoloji, nano ölçekte yeni malzemeler üretmeyi amaçlayan bilim ve teknolojideki uygulamalarla yükselen ve büyüyen bir alandır (Rajeshkumar ve diğerleri, 2019). Bu alan pek çok alan uygulamasına yardımcı olmaktadır. Nanoteknoloji terimi Tokyo Bilim Üniversitesi'nden Taniguchi tarafından 1974 yılında ortaya atılmıştır (Vadlapudi ve Kaladhar, 2014).



Şekil 2.1. Lycurgus kupası.

Şekil 2.1.'te görülen Lycurgus kupası, 4. yüzyıl Roma dönemine aittir ve bu cam kupa, içinden aydınlatıldığında renk değiştirmektedir. Bunun nedeni, camda nanometre boyutlarında yer alan altın ve gümüş parçacıklarının içeriden gelen ışık ile etkileşime girdiğinde renginin değişmesidir.

Nanoteknoloji; nano boyutta maddeleri inceleyen, araştıran ve birçok alana uygulamalarıyla yenilikler katan bir bilim alanıdır. Nanoteknoloji alanının yapıtaşı olan maddeler, boyutu 1-100 nm arasında olan nanopartiküllerdir (Parthiban, Manivannan, Ramanibai ve Mathivanan, 2019). Nanopartiküllerin son yıllarda çok büyük öneme sahip olduğu görülmektedir. Nanopartiküller neden bu kadar ilginç sorusunun cevabı ise, sahip oldukları fiziksel, kimyasal ve biyolojik benzersiz özelliklerde yatmaktadır.

"Nano", son derece küçük anlamına gelen cüce ile eş anlamlı Yunanca bir kelimedir (Vadlapudi ve Kaladhar, 2014). Matematiksel olarak kullanıldığında ise 10^{-9} anlamına gelmektedir. Nanometre (nm) bir metrenin milyarda biri veya kabaca üç atomun yan yana uzunluğudur. Bir DNA molekülü 2,5 nm genişliğindedir, bir protein yaklaşık 50 nm ve bir grip virüsü yaklaşık 100 nm'dir. Bir insan saçı yaklaşık 10.000 nm kalınlığındadır (Thakkar ve diğerleri, 2010). Nanopartiküller farklı boyut, şekil ve yapıya sahiptirler. Küresel, silindirik, konik, spiral ve boru şeklinde olabilirler (Ealia ve Sravanakumar, 2017). Nanoboyutlu malzeme olarak tanımlanan yapılar; nano ince filmler, nanotüpler, nanokristaller, nanopartiküller, nanoteller veya nanoçubuklar gibi farklı sınıflara ayrılmaktadır (Bekem ve diğerleri, 2023).

Nanopartiküller genel olarak organik ve inorganik nanopartiküller olarak ikiye ayrılabilir. Karbon nanopartiküller (quantum dotlar, fullerenler, nanotürler) organik nanopartiküller iken; yarı iletken nanopartiküller (ZnS, CdS, ZnO gibi), metalik nanopartiküller (Ag, Au, Al, Cu gibi) ve manyetik nanopartiküller (Co, Ni, Fe gibi) inorganik nanopartiküllerdir (Rafique ve diğerleri, 2017).

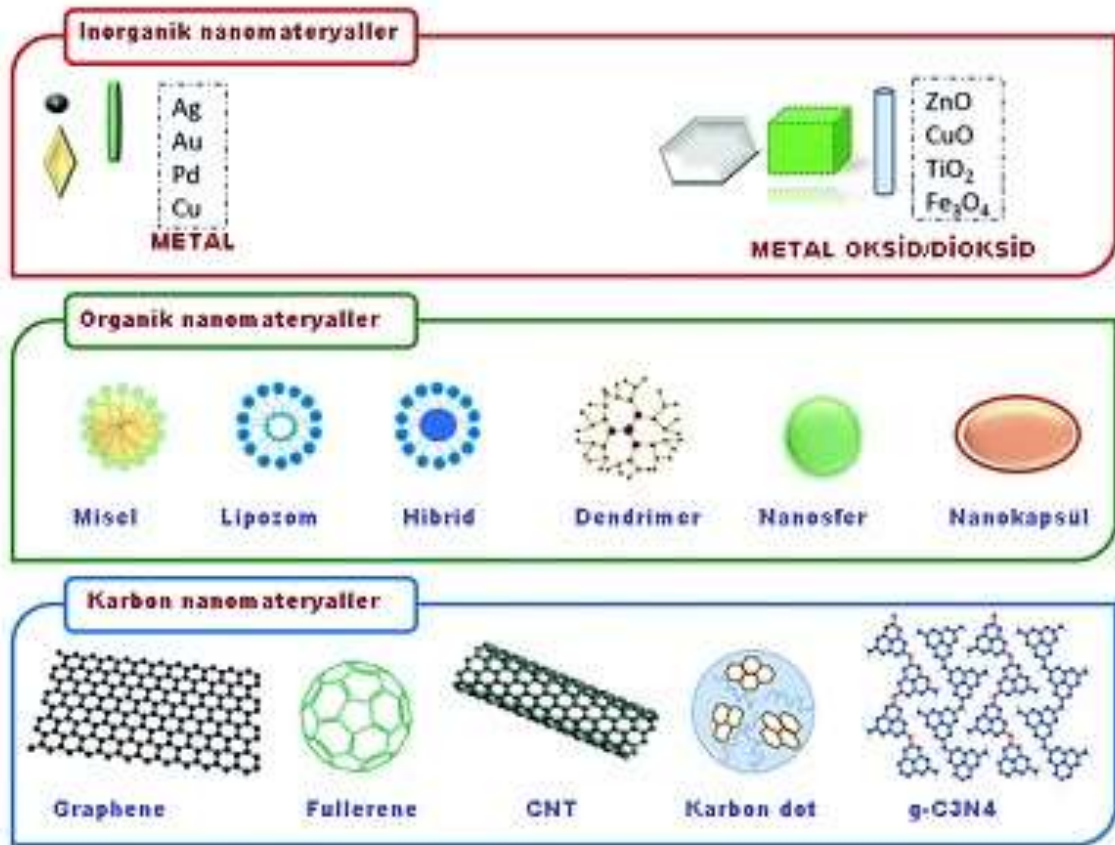
Altın ve gümüş gibi metal nanopartiküllere, fonksiyonel çok yönlülükle üstün malzeme özellikleri sağladıkları için artan bir ilgi vardır. Bu metalik nanopartiküller en umut verici ve dikkat çekici biyomedikal ajanlardır. Nanopartiküllerin sentezi için gümüş, alüminyum, altın, çinko, karbon, titanyum, paladyum, demir, fullerenler ve bakır rutin olarak kullanılmıştır. Nanopartikül geliştirmede yeşil sentez ve diğer biyolojik yaklaşımlarla çevre dostu süreçler geliştirmeye artan bir ihtiyaç vardır (Vadlapudi ve Kaladhar, 2014; Rafique ve diğerleri, 2017).

Gümüş nanopartiküller (AgNPs), aynı kimyasal bileşime sahip daha büyük parçacıklara kıyasla kayda değer biyokimyasal reaktivite, katalitik aktivite ve atomik davranışa yol açan önemli bir yüzey bölgesine sahiptir (Zhi, 2006). AgNP'ler, çeşitli alanlarda uygulanmaları nedeniyle önemli ilgi görmüştür (Stefan ve Maier, 2001) Kataliz (Kamat, 2002), optoelektronik (Boncheva, Gracias, Jacobs ve Whitesides, 2002), biyolojik sensörler (Cao, Jin ve Mirkin, 2001; Han, Gao, Su ve Nie, 2001), antimikrobiyal aktiviteler (Savithramma, Rao, Rukmini ve Devi, 2011; Rai, Yadav ve Gade, 2009), DNA dizilimi (Cao ve Mirkin, 2001), Yüzey Arttırılmış Raman Saçılması (SERS) (Matejka ve diğerleri, 1992), iklim değişikliği ve kontaminasyon kontrolü (Shan ve diğerleri, 2009), temiz su teknolojisi

(Savage ve Diallo, 2005), enerji üretimi (Zäch, Hägglund, Chakarov ve Kasemo, 2006), bilgi depolama (Caruthers, Wickline ve Lanza, 2007) ve biyomedikal uygulamalar (Hullmann, 2007) bu nanopartiküllerin potansiyelini ortaya koyarak nanoteknoloji alanında bize kayda değer gelişmeler sağlamıştır ve sağlamaya devam edecektir.

2.1.1. Nanopartiküllerin sentezi

Genel olarak nanopartiküller, birtakım biyolojik risklerden sorumlu toksik ve tehlikeli kimyasalların kullanımını içeren, oldukça pahalı ve çevre için potansiyel olarak tehlikeli olan çeşitli kimyasal ve fiziksel yöntemlerle hazırlanırlar. Nanoyapıdaki malzemeler kendi özelliklerine göre sınıflara ayrılmaktadır. Bu yapıların sentez yöntemleri birbirinden farklıdır. Gümüş nanopartiküller, inorganik nanomateriyaller sınıfında yer alan metalik nanopartiküllerdir.



Şekil 2.2. Nanopartiküllerin sınıflandırılması

Genellikle metalik nanopartiküllerin sentezinde iki farklı temel sentez yöntemi bulunmaktadır. Birincisi yukarıdan aşağıya sentez (top down), ikincisi aşağıdan yukarıya sentez (bottom up) yöntemidir (Ahmed ve diğerleri, 2016).

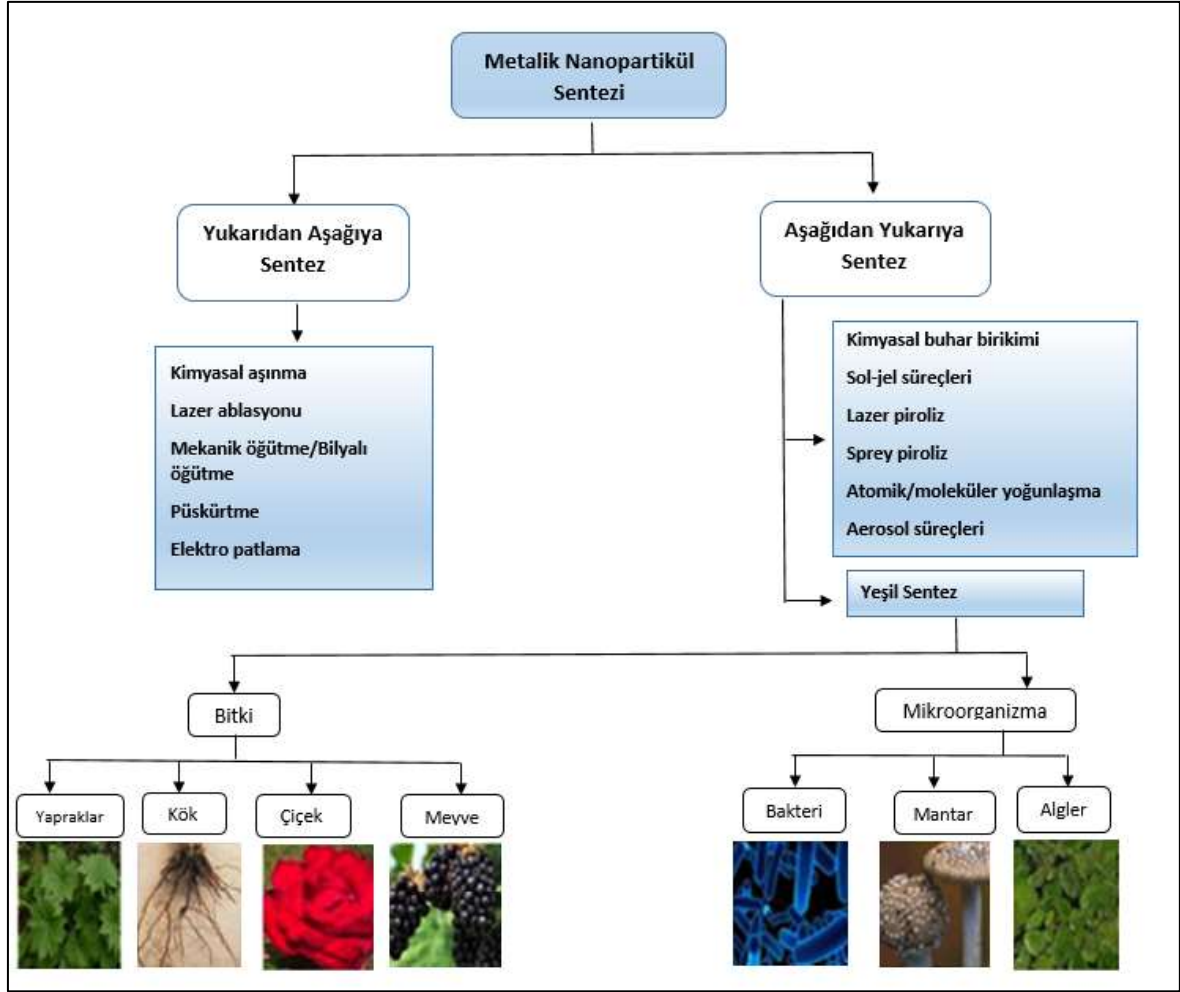
Yukarıdan aşağıya sentez

Fiziksel veya kimyasal araçlar kullanılarak uygun bir başlangıç malzemesi boyut olarak küçültülür. Bu yöntemde uygulama esnasında geniş alan kaplanmakta ve ortam sıcaklığı çok yükseltilmektedir. Bu sıcaklık artışı için fazlaca enerji gerektirmesi bu sentez yönteminde dezavantaj oluşturmaktadır. Yukarıdan aşağıya yaklaşımın diğer bir dezavantajı ise, yüzey yapısındaki kusurdur. Üretilen yapıların yüzeyindeki bu kristolografik kusurlar, yüksek en boy oranı nedeniyle metalik nanopartiküllerin fiziksel özellikleri ve yüzey kimyası üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilir. Metalik nanopartiküllerin fiziksel sentezi için, yaygın olarak kullanılan yıpranma ve piroliz dahil olmak üzere çeşitli yöntemler kullanılabilir (Thakkar ve diğerleri, 2010).

Nanopartiküller; litografik teknikler, mekanik öğütme, aşındırma ve püskürtme gibi çeşitli sentez yaklaşımları ile de hazırlanır (Thakkar ve diğerleri, 2010).

Aşağıdan yukarıya sentez

Atom veya moleküllerin kümelenmesi şeklinde gerçekleşir. Bu yaklaşımda, başlangıçta nanopartiküller oluşturulur ve daha sonra sentez için kimyasal veya biyolojik prosedürler kullanılarak nihai malzemeye monte edilir. Aşağıdan yukarıya yaklaşımın belirgin bir avantajı, nispeten daha az kusur ve daha homojen kimyasal bileşimler ile metalik nanopartiküller elde etme olasılığının artırılmasıdır (Thakkar ve diğerleri, 2010). En büyük avantajlarından birisi de, çok miktarda nanopartikülün kısa sürede sentezlenebilmesidir. Bu sentez sırasında kullanılan kimyasallar toksiktir ve çevre dostu olmayan yan ürünlere yol açar (Ahmed ve diğerleri, 2016). Kimyasal buhar biriktirme, sol-jel yöntemi, sprey piroliz, lazer piroliz ve atomik/moleküler yoğunlaşma aşağıdan yukarıya sentez yöntemleridir.



Şekil 2.3. Nanopartiküllerin sentez yöntemleri

Nanopartiküllerin sentezi, geniş uygulama yelpazesi nedeniyle bilim dünyasında büyük ilgi görmektedir. Yeşil sentez yönteminin benimsenmesinden önce genel olarak nanopartiküller, çeşitli biyolojik risklerden sorumlu toksik ve tehlikeli kimyasalların kullanımını içeren, oldukça pahalı ve çevre için potansiyel olarak tehlikeli olan çeşitli kimyasal ve fiziksel yöntemlerle hazırlanırken genel olarak bu yöntemlerin belirli sınırlamaları ve dezavantajları bulunduğundan yerlerini çevre dostu olan yeşil senteze bırakmaktadırlar (Singh ve diğeri, 2018). Nanopartiküllerin sentezi için biyolojik deneysel süreçlerin geliştirilmesi, nanoteknolojinin önemli bir dalına dönüşmektedir.

2.1.2. Yeşil kimyanın ilkeleri

- **Önleme:** Atıkları önlemek, oluşumu sonrası arıtmaya ya da temizlemeye tercih edilmelidir.

- Enerji Verimliliği Amacıyla Tasarlama: Kimyasal süreçlerin enerji ihtiyaçları en düşük seviyeye indirilmelidir.
- Türevleri Azaltın: Gereksiz türevlendirme en düşük seviyeye indirilmeli, hatta önlenmelidir.
- Atom Ekonomisi: Tüm malzemeler işlemde kullanılırken nihai ürüne dahil edilmesi durumu en üst düzeye çıkarılmalı bunun için sentetik yöntemler oluşturulmalıdır.
- Yenilenebilir Hammaddelerin Kullanımı: Ekonomik ve teknik açıdan uygulanabilir her hammadde yenilenebilir olmalıdır.
- Kataliz: Katalitik reaktifler kullanılmalıdır.
- Daha Güvenli Kimyasallar Oluşturmak: İşlevlerini gerçekleştirirken toksisiteleri en düşük seviyede olan kimyasallar tasarlanmalıdır.
- Bozulma için Tasarlama: İşlevlerinin gerçekleşmesi sonucunda kimyasal maddeler, zararsız bozunma ürünlerine ayrılacak ve çevrede kalmayacak biçimde oluşturulmalıdır.
- Daha Güvenli Çözücüler ve Yardımcı Maddeler: Mümkün olan her yerde yardımcı madde (çözücüler, ayırma maddeleri vb.) kullanımı zararsızlaştırılmalıdır.
- Kaza Önleme İçin Doğal Olarak Daha Güvenli Kimya: Kimyasal kaza potansiyelini en aza indirecek biçimde kimyasal süreçte kullanılacak olan maddeler seçilmelidir (Ivanković ve diğerleri, 2017).

2.2. Yeşil Sentez

Yeşil sentez, nanopartiküllerin sentezinde yenilikçi bir yaklaşım olarak kullanılmaya başlanmıştır. Diğer sentez yöntemlerinin çeşitli zararlarının aksine yeşil sentez yöntemi doğa ve insan dostudur (Thakkar ve diğerleri, 2010).

Yeşil sentez yöntemi ile gümüş, altın, çinko oksit, bakır oksit, bakır, palladyum gibi birçok metal ve metal oksit nanopartikül sentezlenmektedir. Yeşil sentez yöntemi ile sentezlenen nanopartiküller ilaçlarda ve klinik uygulamalarda önemli rol oynamaktadır (Shadab Ali Khan, 2013). Söz konusu nanopartiküller önemli antikanser, antimikrobiyal ve antibakteriyel etkiye sahiptir (Geetha ve diğerleri, 2013).

Nanopartikül sentezlemede aşağıdan yukarıya sentez yöntemi ve yukarıdan aşağıya sentez yöntemlerinin zararlı ve zaman alıcı özellikleri nedeniyle çevre dostu “yeşil sentez” yöntemi kullanılmaya başlanmıştır.

2.2.1. Yeşil sentezin avantajları

- Atıkların önlenmesi
- Kirliliğin azaltılması
- Toksik olmayan malzemelerin kullanılması
- Sürdürülebilir olması
- Düşük maliyetli olması
- Yüksek verimli olmasıdır (Thakkar ve diğerleri, 2010).

2.2.2. Yeşil sentezde kullanılan indirgeyiciler

- Mantarlar
- Bakteriler
- Algler
- Bitkiler

Mantarlar

Metal/metal oksit nanopartiküllerin mantar aracılı biyosentezi, nanopartiküllerin üretilmesi için çok etkili bir işlemdir. Çeşitli hücre içi enzimlerin varlığından dolayı metal ve metal oksit nanopartiküllerinin hazırlanması için oldukça iyi biyolojik ajanlar olarak görev yaparlar (Wang ve diğerleri, 2009). Mantarlar, bakterilere kıyasla daha büyük miktarlarda nanopartikül sentezleyebilirler (Mohanpuria ve Yadav, 2008). Dahası, mantarların hücre yüzeylerinde enzim/protein/indirgeyici bileşenler bulunması nedeniyle diğer organizmalara göre birçok faydası vardır (Narayanan ve Sakthivel, 2011). Metalik nanopartiküllerin oluşumu için muhtemel mekanizma, hücre duvarında veya mantar hücresinin içinde enzimatik indirgemedir. Birçok mantar türü gümüş, altın, titanyum dioksit ve çinko oksit gibi metal/metal oksit nanopartiküller sentezlemek için kullanılır (Singh ve diğerleri, 2018).

Bakteriler

Bakteriler, metal iyonlarını azaltma yeteneğine sahiptir ve nanopartiküllerin hazırlanmasında önemli biyosentez araçlarıdır (Iravani, 2014). Nanopartiküllerin hazırlanması için çeşitli bakteri türleri kullanılır. Prokaryotik bakteriler ve aktinobakteriler, metal/metal oksit nanopartikülleri sentezlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Farklı boyut/şekil morfolojilerine sahip biyoredüklenmiş gümüş nanopartiküllerin sentezi için yaygın olarak kullanılan bazı bakteri suş örnekleri şunlardır: *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas* sp., *Phaeocystis antartika*, *Pseudomonas proteolytica*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus indicus*, *Bacillus cecembensis*, *Enterobacter cloacae*, *Geobacter* spp., *Artrobacter gangotriensis*, *Corynebacterium* sp. ve *Shewanella oneidensis* (Remya ve diğerleri, 2017).

Algler

Metalik nanopartiküllerin sentezi için “biyofaktör” olarak kullanılan alglerin raporları azdır. Dünyanın her bölgesinde bulunan deniz mikroorganizmaları olan algler metal nanopartikülleri oluşturmak amacıyla indirgeyici ajan olarak işlem yapan hidroksil, karboksil ve amin fonksiyonel gruplarına sahip biyoaktif moleküller bakımından zengindir. Son zamanlarda, nanopartikül sentezinde alglerin kullanıldığı raporlar artmaktadır (Shankar ve diğerleri, 2016).

Bitkiler

Bakteriler, aktinomisetler, mayalar ve mantarlar gibi mikroorganizmalar metalik nanopartiküllerin sentezinde araştırılmaya devam edilmektedir. Benzer nanopartikül biyosentez metodolojileri için bitkilerin tüm kısımlarının kullanılması, nispeten keşfedilmemiş ve yeterince kullanılmamış olmasının heyecan verici bir durum olduğu bilinmektedir (Thakkar ve diğerleri, 2010). Yapılan çalışmalarda bitkinin tüm kısımları nanopartikül sentezi çalışmalarında çokça biyofaktör olarak kullanılmaya başlanmıştır (Basavegowda ve Lee, 2013).

Nanopartiküllerin oluşumu için bitki kullanmanın faydaları, bitkilerin kolayca erişilebilir olması, kullanımının güvenli olması ve metal iyonunun azaltılmasını ilerletebilecek geniş

bir aktif madde yelpazesine sahip olmasıdır. Esas olarak kökler, lateks, gövde, tohumlar ve yapraklar gibi bitki kısımları nanopartikül sentezi için kullanılmaktadır (Thakkar ve diğerleri, 2010).

Bitki özütünün seçilmesinden sonra, özüt konsantrasyonu, sıcaklık, metal tuzu, pH ve temas süresi de nanopartikül sentezinin optimum koşulların belirlenmesinin diğer parametreleridir. Oluşum parametrelerine ek olarak asıl konu, ekstraktın kullanılabileceği bitkinin seçilmesidir (Rafique ve diğerleri, 2017).

Nanopartiküllerin oluşumunu etkileyen ana bileşikler olan biyomoleküller; terpenoidler, polisakkaritler, fenolikler, alkaloidler, flavonlar, amino asitler, alkollü bileşikler, enzimler ve proteinlerdir. Benzer şekilde klorofil pigmentleri ve quinal, metil chavicol, linalool, kafein, öjenol, askorbik asit, teofilin ve diğer vitaminler de araştırılmıştır (Sharma ve diğerleri, 2009).

Bitki ve bitki özleri kullanılarak yapılan yeşil sentezin diğer mikroorganizmalara göre nanopartikül sentezinin daha hızlı olduğu araştırılmaktadır. Bitki kullanılarak sentezlenen AgNP'ler, bakteri veya mantar kullanılarak sentezlenen AgNP'ler ile karşılaştırıldığında, bitki özü ile Ag^+ iyonlarının azalması oldukça hızlı gerçekleşmektedir (Thakkar ve diğerleri, 2010).

Bakteri ve mantarlar gibi, bitki ve bitki özlerinin de yeşil sentezde kullanımı; hızlı büyüme sağlaması, nanopartikül sentezinin tek adımlı ve ekonomik olması, patojenik olmaması ve çevre dostu olması nedeniyle dikkat çekmiştir (Rafique ve diğerleri, 2017).

2.2.3. Nanopartiküllerin karakterizasyonu

Nanopartiküllerin karakterizasyonunda pek çok yöntem kullanılmakla beraber bu tez çalışmasında kullanılan yöntemler bu bölümde açıklanmaktadır.

Ultraviyole görünür (UV Görünür) spektrofotometri

UV-Vis ışığın molekül tarafından emildiği bir tür absorpsiyon spektroskopisidir. Çözeltide yer alan bir bileşen tarafından emilen görünür ya da ultraviyole radyasyon miktarını ölçer.

UV ile görülebilen bölgedeki iki ışık demetinin yoğunluğunun oranını veya oranının işlevini ölçer (Rajeshkumar ve diğerleri, 2019). Metalik nanopartiküller, sentezlenen nanopartiküllerin boyutundan, morfolojisinden, şeklinden, bileşiminden ve dielektrik ortamından etkilenen yüzey plazmon rezonans bantlarını görüntüleyerek UV görünür spektrofotometre ile tanımlanabilir ve karakterize edilebilir. Reaksiyon karışımındaki elektronların yüzey plazmon rezonansı zirveyi belirler. Çok sayıda çalışma gümüş nanopartiküllerin, UV görünür spektrumlarının yaklaşık 200-800 nm'de absorpsiyon bantlarına katkıda bulunduğunu göstermiştir ve 400-450 nm aralığında gümüş nanopartiküller spesifik bir absorbans verirler (Sriranjani, 2016).

Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), yüksek enerjili bir elektron ışını kullanan görüntüleme tekniğidir. Ancak ışın yüzey üzerinde taranır ve elektronların geri saçılması gözlenir. SEM, morfolojik ve yüzey karakterizasyonunu incelemek ve metal parçacıklarının boyutunu nano ila mikro düzey ölçeğinde incelemek için kullanılan yaygın bir tekniktir. Bu teknik büyük bir alan derinliği sağlar, bu da numunenin odakta aynı anda görüntülenebilen alanının oldukça büyük olduğu anlamına gelir (Rajeshkumar ve diğerleri, 2019). SEM analizi, yüksek çözünürlüklü görüntüleme ve büyütme, küçük parçacıkların boyutu, sayısı ve morfolojisinin belirlenmesini sağlayarak malzemelerin özelliklerinin tespit edilmesini sağlar.

Enerji dağıtım X-Işını spektroskopisi (EDX)

Enerji dağıtıcı X-ışını spektroskopisi, analiz edilen numunenin temel bileşimini belirlemek amacıyla SEM ile kombinasyon halinde kullanılan analiz yöntemidir. EDX, EDS ve EDAX olarak adlandırılır. EDX tekniği, bir elektron ışını ile bombardıman sırasında numuneden yayılan X ışınlarını algılar ve EDX X ışını detektörü, boşaltılan X ışınlarının enerjilerine göre nispi bolluğunu ölçer (Rajeshkumar ve diğerleri, 2019).

Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi, metal nanopartikül yüzey kimyasının karakterizasyonu için çok yararlıdır çünkü metal nanopartiküllerin yüzeyinde hangi organik

fonksiyonel grupların yer aldığının belirlenmesini sağlar (Jabbar, 2020). Bir numuneden kızılötesi radyasyon geçirildiğinde, radyasyonun bir kısmı numune tarafından emilirken bir kısmı içinden geçer. Elde edilen spektrum, numunenin kimliğini temsil eden bir örnek moleküler parmak izi oluşturarak absorpsiyon ve iletimi ifade eder. Ayrıca FTIR, gümüş, karbon nanotüpler, grafen ve altın nanoparçacıklarına kovalent olarak aşılanmış fonksiyonel moleküllerin doğrulanması veya katalitik işlem sırasında enzim ve substrat arasında meydana gelen etkileşimler gibi nano ölçekli malzemelerin incelenmesine de olanak sağlar (Zhang ve diğerleri, 2016).

Bu yöntemlerin yanısıra X-Işını Kırınım Analizi (XRD), Dinamik Işık Saçılması (DLS) ve Zeta Potansiyel Ölçümü de nanopartikül karakterizasyonunda kullanılabilmektedir.

2.2.4. Nanopartiküllerin kullanım alanları

Teknolojinin gelişmesi ve teknolojik ürünlerin hayatımızdaki rolünün artması ile birlikte nanoteknoloji alanı da gün geçtikçe dikkatleri üzerine çekmektedir. Nanoteknoloji alanında çalışmaların artmasının sonucu olarak; nanoteknolojinin temel unsuru nanopartiküllerin ise yoğun ilgi görmesine neden olmaktadır (Zhang ve diğerleri, 2016).



Şekil 2.4. Nanoteknolojinin ilişkili olduğu bilim dalları (Gurunathan, 2015)

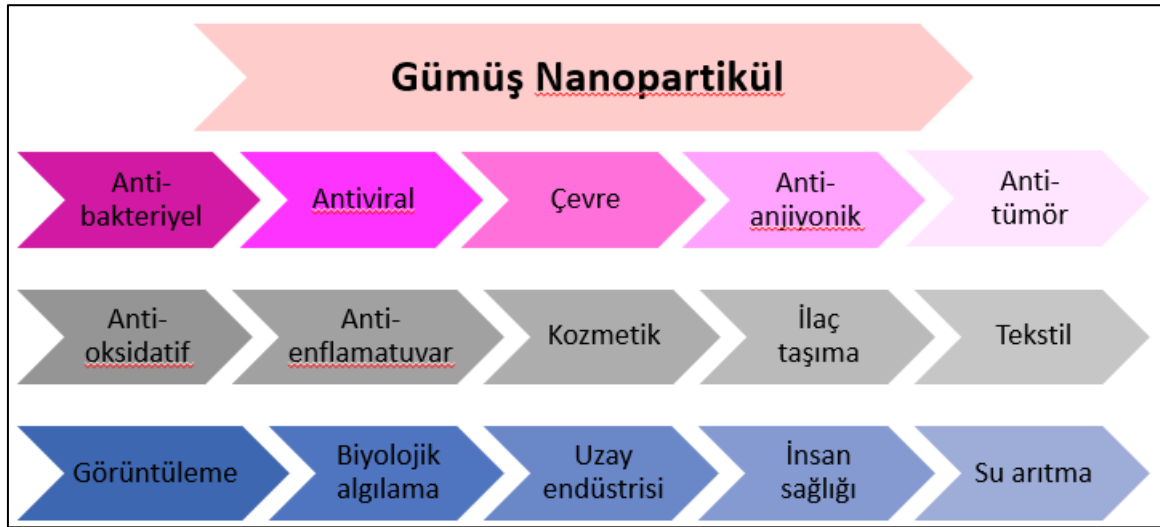
Nanopartiküller, elektriksel, termal ve optik yüksek elektriksel iletkenlik ve biyolojik özelliklerindeki benzersiz kimyasal ve fiziksel özellikleri nedeniyle Şekil 2.3'te görüldüğü üzere tıp, gıda, sağlık hizmetleri, tüketici ve endüstriyel amaçlar dahil olmak üzere çeşitli

alanlarda her geçen gün daha fazla kullanılmaktadır (Gurunathan, Park, Han ve Kim, 2015). Kendine özgü özellikleri dolayısıyla, endüstriyel, evsel ve sağlıkla ilgili ürünlerde, tüketici ürünlerinde, tıbbi cihaz kaplamalarında, biyosensör uygulamalarında, optik sensörlerde ve kozmetiklerde, ilaç endüstrisinde, çevre, tekstil, kimya endüstrileri, uzay endüstrisi, enerji bilimi gibi alanlar da hızla kullanımı artmaktadır.

Nano boyuttaki metalik parçacıklar benzersizdir ve yüzey-hacim oranlarından dolayı fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri önemli ölçüde değiştirebilir. Bu nedenle, bu nanopartiküller çeşitli amaçlar için kullanılmıştır (Zhang ve diğerleri, 2016).

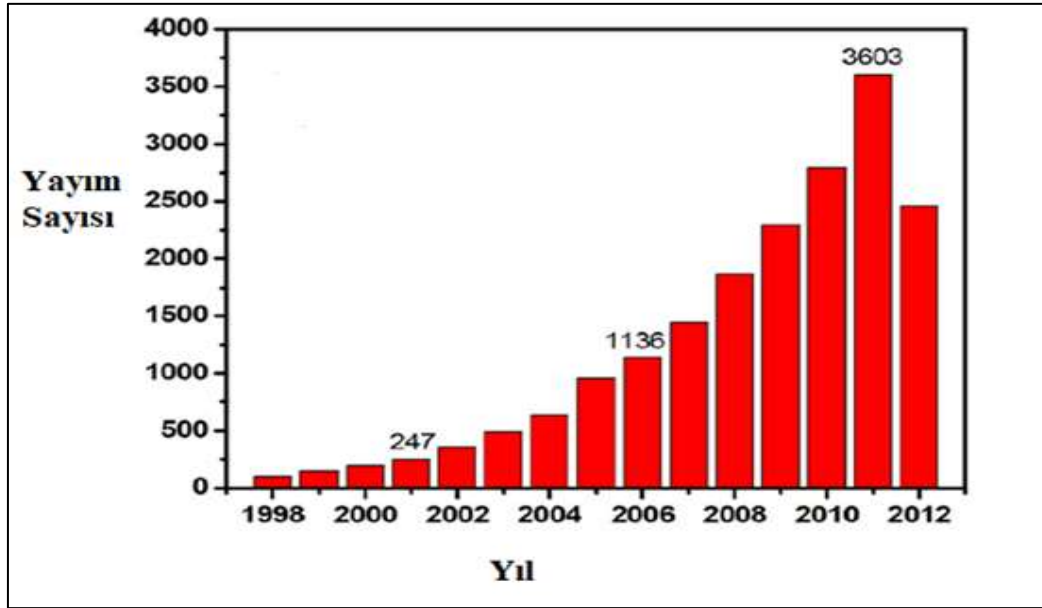
2.2.5. Gümüş nanopartikül

Gümüş nanopartiküller eşsiz özellikleri nedeniyle tarihler boyunca yüksek öneme sahip olmakla birlikte, hayatımızın pek çok bölümünde yer almaktadır. Şekil 2.5'te gümüş nanopartiküllerin uygulamasının çeşitli alanlarda kullanımı vurgulanmaktadır.



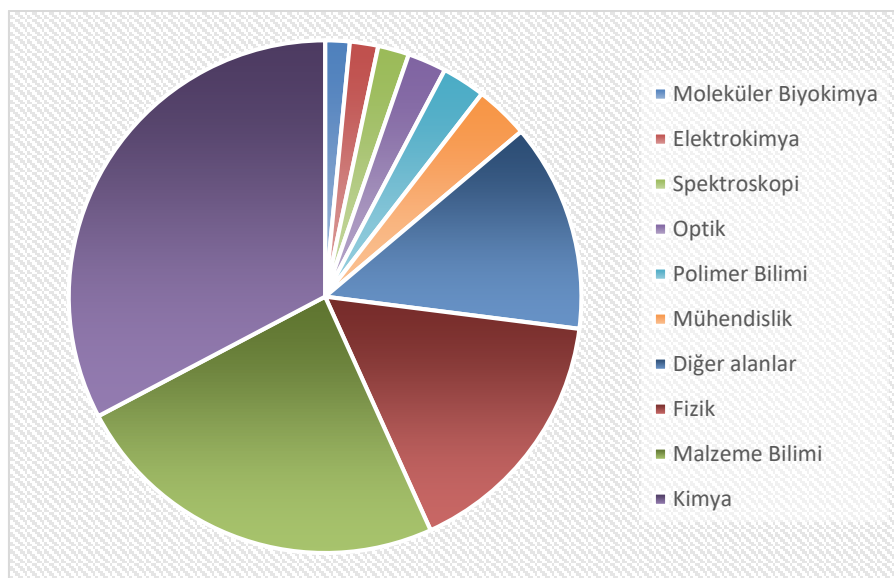
Şekil 2.5. Gümüş nanopartiküllerin kullanım alanları (Zhang ve diğerleri, 2016).

Yaygın uygulamaları nedeniyle, bilimsel topluluklar ve endüstri, AgNP'lerin araştırma konusuna özel önem vermiştir.



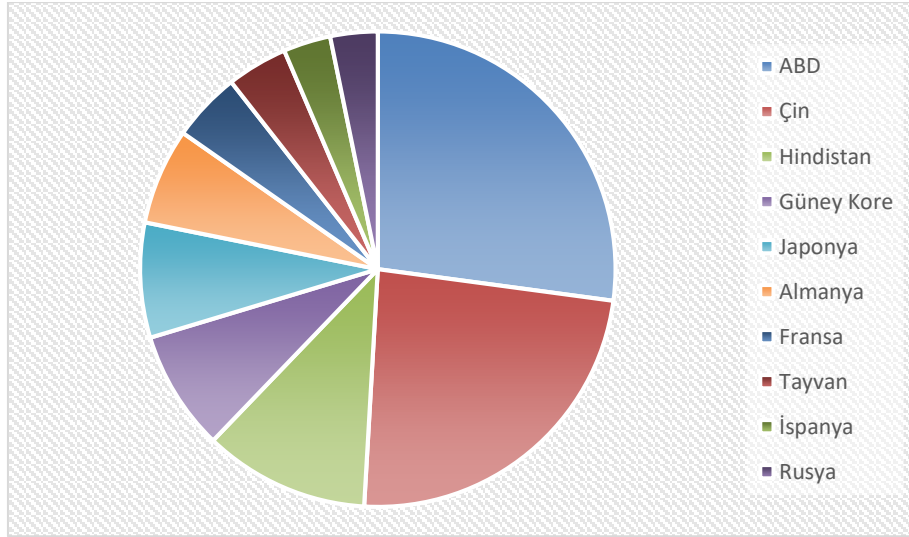
Şekil 2.6. Gümüş nanopartiküller konusunda yayımlanmış araştırma makalelerindeki eğilim.

Şekil 2.6 bu alandaki yayınlanmış araştırma makalelerindeki eğilimin istatistiksel veri analizini göstermektedir. Bu veritabanları, ‘gümüş nanopartikül’ anahtar kelimesini kullanarak ‘ISI Web of Science’den 30 Eylül 2012’ ye kadar toplanmıştır. Toplam 18825 kayıt olduğu tespit edilmiştir. 2001'den 2011'e kadar geçen 10 yıl boyunca, yayımlanan makale sayısı yaklaşık % 93 artmıştır (2001'e kadar 247 makaleden 2011'e kadar 3603 makaleye).



Şekil 2.7. Gümüş nanopartiküllerin araştırma alanları (Tran ve Le, 2013)

Şekil 2.7. AgNP'lerle ilgili araştırma alanlarının konusunu göstermektedir. Kimya (% 55), malzeme bilimi (% 40,4), fizik (% 27,3), mühendislik (% 5,7), polimer bilimi (% 4,6), optik (% 4,1), spektroskopi (% 3,6), elektrokimya (% 3,0), moleküler biyokimya (% 2,6) ve diğer konular (% 2,1). Kimya ve malzeme bilimi şu anda AgNP'lerin araştırma alanlarında en büyüğüdür.



Şekil 2.8. Nanopartikül ile ilgili yayımlanan makalaların ülkelere göre dağılımı (Tran ve Le, 2013)

Veri analizi ayrıca 96 farklı ülkeden yayınlanmış makaleleri de içermektedir. Şekil 2.8.'de makalelerin ülkelere göre dağılımını göstermektedir. AgNP'ler konusunda toplam 4434 (% 23,6) ile Çin'in en çok yayınlanmış makaleye sahip olduğunu, bunu ABD 3809 (% 20,7), Hindistan 1842 (% 9,8), Güney Kore 1331 (% 7,1), Japonya 1283 (% 6,8), Almanya 1079 (% 5,7), Fransa 770 (% 4,1), Tayvan 669 (% 3,6), İspanya 540 (% 2,8) ve Rusya 539 (% 2,8). Çin ve ABD şu anda AgNP'lerle ilgili yayınlanmış makalelerde en büyük ülkelerdir. Bu sentezlerin ve özelliklerin incelenmesine paralel olarak tüketici ürünlerinde AgNP kullanan çok sayıda pratik uygulamanın geliştirildiği vurgulanmaktadır (Tran ve Le, 2013).

2.3. Atık

Atık kavramı ilk kez 2872 sayılı Çevre Kanununda "herhangi bir faaliyet sonucunda oluşan, çevreye atılan veya bırakılan her türlü madde" şeklinde tanımlanmıştır (Çevre Kanunu, 1983. 1 Temmuz 1983 Tarihli 18132 Sayılı Resmi Gazete). Yine atık kavramı 2015 yılında yayımlanan Atık Yönetimi Yönetmeliğinde ise "üreticisi veya fiilen elinde bulunduran

gerçek veya tüzel kişi tarafından çevreye atılan veya bırakılan ya da atılması zorunlu olan herhangi bir madde veya materyal,” olarak tanımlanmıştır (Atık Yönetimi Yönetmeliği, 2015).

Atıklar, zaman içerisinde kullanıcısına fayda sağlamış olan ancak zamanla önemini kaybeden, artık kullanıcısı tarafından faydası görülmeyen insan eliyle ve doğal yollarla kurtulmak istenen maddelerdir.

Artan nüfus ve gelişen teknoloji ile birlikte üretilen maddelerin çeşitliliğine bağlı olarak atık miktarı her geçen gün artmaktadır. 23 Aralık 2021 yılında Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) tarafından yayımlanan rapora göre termik santraller, imalat sanayi alanları, organize sanayi bölgeleri (OSB), maden işletmeleri, sağlık merkezleri ve hane halklarında 2020 yılı boyunca toplamda 104,8 milyon ton atık oluşurken bunun 30,9 milyon tonu tehlikeli atıktır. Toplam atık miktarı ise 2018'e göre %10,5 artmıştır (URL-1).

Türkiye için 2018 yılında kişi başına düşen atık miktarı günlük 1,16 kg'dır. Üç büyük şehirde ise toplanan kişi başı günlük ortalama atık miktarının İstanbul için 1,28 kg, Ankara için 1,18 kg ve İzmir için 1,36 kg olduğu tespit edilmiştir. 2020 yılında ise kişi başına düşen atık miktarı 1,13 kg'dır. 2020 yılında geri kazanım ve atık bertaraf tesislerinde işlenen 127,4 milyon ton atığın 49,1 milyon tonu geri kazanılırken, 78,3 milyon tonu bertaraf edilmiştir. 2018'e göre toplam işlenen atık miktarı %22 artış göstermiştir (URL-1).

Atıklar özelliklerine göre katı, sıvı ve gaz atıklar olarak 3 gruba ayrılmaktadır. Katı atıklar özelliklerine, bileşimine ve kaynağına göre sınıflandırılabilir. Bu ayrım atıkların doğru şekilde değerlendirilmesi için önemlidir.

Katı atıklar bileşimine göre; kompostlanabilir ve yanabilir organik atıklar (bitkisel, hayvansal, kağıt, tekstil atıkları), biyokimyasal ayrışması imkansız ya da çok yavaş olan organik atıklar (lastik, kemik, plastik atıklar) ve inert maddeler (cam porselen, taş, kil atıkları) şeklinde 3 gruba ayrılmaktadır (Milli Eğitim Bakanlığı, 2009; Çevre Koruma Katı Atık Toplama).



Şekil 2.9. Evsel atık

Evsel katı atıklar

Şehirleşmenin artmasıyla birlikte evsel katı atıklar yerleşim merkezlerinde karşılaşılan en büyük sorunlardan biridir. Bu grubun içerisine; evlerde meydana gelen atıklar, ambalaj atıkları, poşetler, bahçe ve yiyecek atıkları, cam, gazete, dergi atıkları, kâğıtlar, plastikler, kıyafet parçaları ve tekstil atıkları girmektedir.

Organik katı atıklar, evsel atıkların %68 ini oluşturuyorken; kalan %32 sini karton, kağıt, plastik, ağaç, tekstil, deri ve kıyafet, metal, kül ve cam gibi maddeler meydana getirmektedir (Saraç, 2015).

Atık önleme

Sıfır atık olarak da bilinen atık önleme, kaynakların en verimli şekilde kullanılmasını, oluşan atık miktarının azaltılmasını ve atıkların geri dönüşümünü kapsayan yaklaşımdır (URL-3).



Şekil 2.10. Sıfır atık projesi görseli (URL-3)

Atık miktar artışının önlenmesinin veya atıkların geri kazanımının son derece önemli olduğu her geçen gün görülmektedir. Sürdürülebilir Kalkınma Amaçlarından olan “sürdürülebilir şehirler ve topluluklar” ve “sorumlu üretim ve tüketim” ilkeleri kapsamında her insanın atık oluşumuna katkıda bulunmasının yanında, önlenmesine de katkısı bulunmalıdır. Bu amaçla pek çok çalışma ve proje yürütülmektedir. Sıfır atık projesi de son zamanlarda yürütülen projelerden biridir.

2.3.1. Çay bitkisi atığı

Çay, ilk defa Hindistan ve Çin arasında kalan bölgelerde görüldüğünden anavatanının bu bölge olduğu kabul edilmektedir. İlk zamanlarda çay içeceği, çayın yaş yapraklarının kaynatılması ile hazırlanırken, sonrasında ise kurutulup demleme ile içilmeye başlanmıştır (Demir, 2018).

Sudan sonra Dünya’da en çok tüketilen ikinci içecek olan çay, *Camellia sinensis* bitkisinin yapraklarından üretilmektedir (Meng ve diğerleri, 2019). Çayın bileşimi mevsime, yaprağın yaşına, iklime, bahçecilik uygulamalarına ve üretim tekniklerine göre değişir (Vinson ve Dabbagh, 1998).



Şekil 2.11. Çay bitkisi (URL-4)

Camellia sinensis' ten üretilen fermente edilme oranlarına göre ayrılan üç farklı çay türü vardır: yeşil çay (fermente edilmemiş), oolong çay (kısmen fermente edilmiş) ve siyah çay (tamamen fermente edilmiş) (Vinson ve diğeleri, 2004) . Dünya üzerinde üretilen çayın % 2'si oolong çay, %22'si yeşil çay, % 76'sı ise siyah çaydır (Tiftik, 2006).

Çayın kimyasal yapısında pek çok bileşik bulunmaktadır (Demir, 2018). Bunlar:

- Enzimler; polifenol oksidaz enzimi, peroksidaz enzimi, dehidroksihikimat redüktaz enzimi, peptidaz enzimi, fenilalanin amonyak liyaz enzimi, klorofilaz enzimi, leusin-a-kettoglutarat transaminaz enzimi, pektin metilesteraz enzimidir.
- Polifenoller; flavoneller, flavanoller ve flovonol glukozidler, flavonlar, asitler ve despitlerdir.
- Alkoloidler; Kafein, teobromin ve teofilindir.
- Azotlu Bileşikler; proteinlerdir.
- Karbohidratlar,
- Klorofil ve pigmentler,
- Vitaminler,
- Uçucu Maddeler,
- Mineral Maddeler.

Dünya çay üretiminin %41'ine Çin, % 2'sine Hindistan, % 8'ine Kenya, % 5'ine Sri Lanka, % 4'üne Türkiye, % 4'üne Vietnam, % 2'sine Endonezya, % 2'sine İran ve %13'lük paya

ise diğer ülkeler sahiptir (FAO, 2018). Çay tüketiminde ise Türkiye; yıllık kişi başı 3,5 kg çay tüketimi ile Dünya’da ilk sırada yer almaktadır.

Bu nedenle bu çalışmada ülkemizde sudan sonra en çok tüketilen ikinci içecek olan siyah çay atığı kullanıldı ve siyah çay atığının teknoloji ve sağlık alanına kazandırılması amaçlandı.

2.4. Biyosensörler

Biyosensörler, seçici bir analizin temeli olarak biyokimyasal moleküler tanıma özelliklerini kullanan küçük cihazlardır (Wang, 2005).

Genel olarak biyosensörler, biyokimya, biyoloji, kimya, fizik ve mühendislik gibi pek çok bilimsel alan bilgisini multidisipliner bir anlayış çerçevesi aracılığıyla kullanarak hem modern elektronik tekniklerin süreç yeteneklerini hem de biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özelliklerini birleştirerek geliştirilen biyoanalitik cihazlar olarak bilinmektedir (Kurbanoglu, 2020).

Her canlı organizma çevresindeki değişimleri algılama ve yanıt oluşturma mekanizmalarına sahiptir. Canlıların sahip oldukları bu işlevsellik, biyosensörlerin geliştirilmesinin temelini oluşturmaktadır. Canlı varlıklarda uyarıları algılamaya olanak sağlayan biyolojik maddelerin analiz sistemleri ile birleştirilmesi biyosensör teknolojisinin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Yaşamaya devam edebilmek için tüm organizmalar çevrelerindeki değişiklikleri hemen algılayarak uyarlamaya çalışırlar. Biyosensörlerin in vitro olarak kullanılması için bu algılama mekanizması temeli oluşturur.

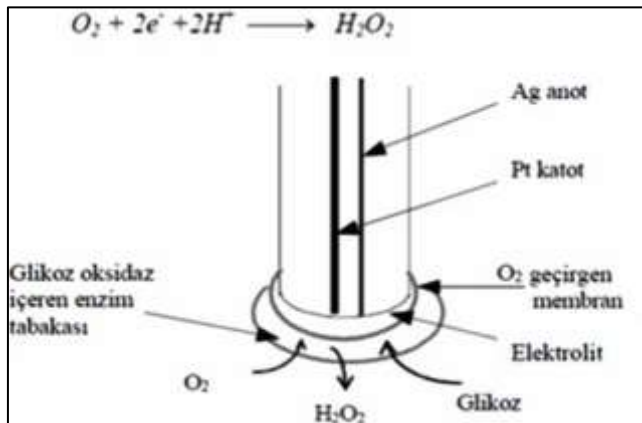
Canlı organizmalar, teknoloji uzmanlarının hayal edemeyeceği olağanüstü duyarlılık özelliklerine sahiptir. Örneğin, bazı köpeklerin koku alma duyusu insana oranla yüz bin kat fazladır. Yılan balığı, bin litre suda çok az miktarda bulunan yabancı maddeyi hemen hissedebilir. Kelebekler, ortaklarının saldırdığı bazı molekülleri hissedebilir. Algiler toksik maddelere karşı oldukça hassastır. Canlı organizmaların bu tür dürtüleri analiz sistemleriyle algılamasını sağlayan biyolojik maddelerin kombinasyonu, biyosensörlerden kaynaklanmaktadır (Kurbanoglu, 2020).

Biyosensörler, analitlerin konsantrasyonu ile orantılı ölçülebilir bir sinyal oluşturmak için biyolojik tanıma elemanını fiziksel dönüştürücü ile kombine eden biyoanalitik bir cihazlardır (Su ve diğerleri, 2011). "International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC) tanımlarına göre ise “biyosensörler, sinyal üretmek için biyolojik reaksiyon kullanan kimyasal sensörlerdir” şeklinde tanımlanmaktadır (Faridbod ve diğerleri, 2014).

Bir biyosensörün genel şemasında, biyolojik tanıma elemanı hedef bileşiğe yanıt verir ve dönüştürücü söz konusu biyolojik yanıtı elektrokimyasal, mekanik, optik, akustik, kalorimetrik veya elektronik olarak ölçülebilen ve daha sonra analit konsantrasyonu ile ilişkilendirilebilen, saptanabilir bir sinyale dönüştürür (Su ve diğerleri, 2011).

2.4.1. Biyosensörlerin tarihçesi

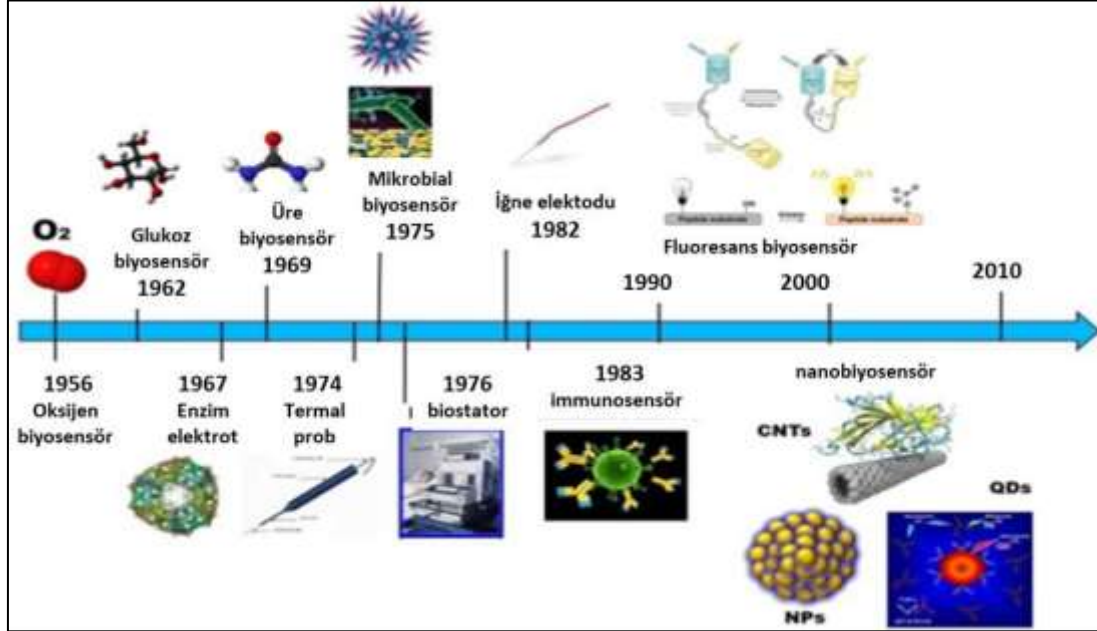
Clark'ın bir oksijen elektrodunu meydana getirmesi ve bu elektrot ile insan vücudunda yer alan çeşitli analitlerin ölçülmesi ile biyosensörlerin tarihi 1956 yılında başlamış oldu. Şekil 2.12'de görülen çalışmayla oksijen temelli bir biyosensörde bir diyaliz membranı kullanılması ile glukoz oksidasyonu ve oksijenin konsantrasyonundaki azalmanın ölçülmesi ile glukoz konsantrasyonu tespit edilmiştir.



Şekil 2.12. Glukoz tespiti için bir Clark enzim elektrotunun şematik diyagramı

Clark ve Lyon, 1962'de glukoz tespiti için ilk biyosensörü geliştirdiğinden beri biyosensörler; halk sağlığı ve çevresel izlemeden, iç güvenlik ve gıda güvenliğine kadar

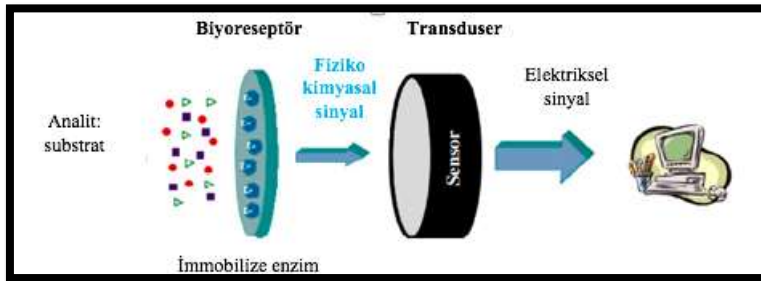
çeşitli uygulamalarda yoğun bir şekilde çalışılmış ve yaygın olarak kullanılmıştır (Su ve diğerleri, 2011).



Şekil 2.13. Biyosensörlerin tarihsel gelişimi (Morris, 2015)

2.4.2. Biyosensörlerin yapısı

Biyosensörler genellikle bir biyoreseptör, bir dönüştürücü (transducer) ve bir sinyal işleme biriminden oluşan üç elementli bir sistem olarak tanımlanmaktadır. Analit, biyoreseptör ile etkileşime girdiğinde, ölçülebilir bir sinyal üretilmektedir (Goode ve diğerleri, 2015).



Şekil 2.14. Bir biyosensörün genel şematik gösterimi (Sassolas, Blum ve Leca-Bouvier, 2011)

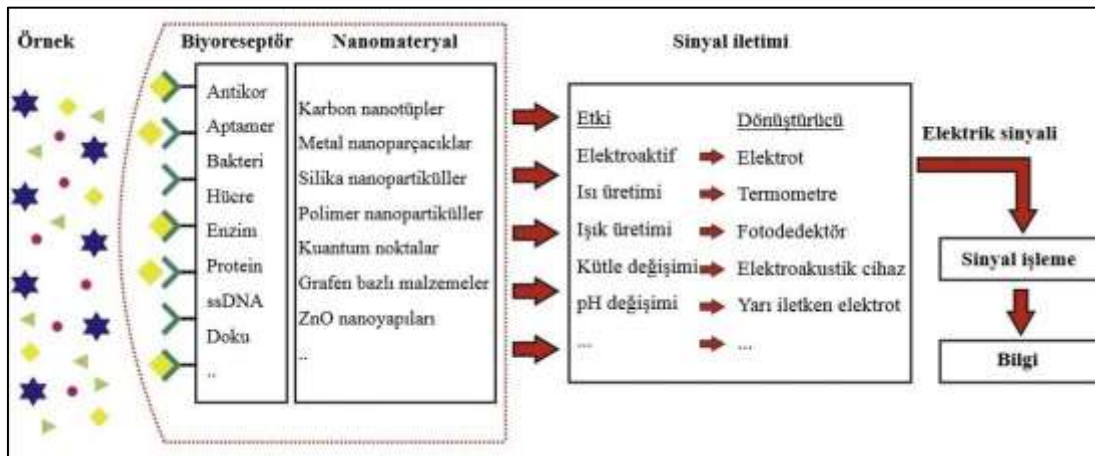
Biyoreseptörler

Biyosensörlerde hedef analitle seçici bir biçimde etkileşime giren maddeler biyoreseptörlerdir (biyoajan). Biyosensörün seçiciliğinde ve hassasiyetinde etkili olan biyoreseptörler tek substrat ile etkileşimde olmalıdır. Bu nedenle diğer substratlara karşı herhangi bir hassasiyet göstermemelidir. Biyoreseptörler, analiz edilecek olan hedef maddeye özgü olmalı ve hedef maddeyi biyolojik sistemde kolayca tanımalıdır. Biyosensörlerin reseptör bölgelerinde algılayıcı olarak en çok tercih edilen maddelerden biri de yüksek spesifik özellik gösteren enzimlerdir (Gemici, 2019).

Dönüştürücü (Transducer)

Biyolojik algılayıcı ile hedef analit arasındaki etkileşmeye bağlı olarak meydana gelen fiziksel cevabı, ölçülebilir sinyale dönüştüren cihazlardır. Hedef analit ile biyoreseptör arasında meydana gelen kimyasal reaksiyon, ısı oluşumu, renk değişimi, ışıma, iletkenlik özelliğindeki değişim ya da bir osilatörün frekansındaki değişim gibi bir sinyal üretmektedir.

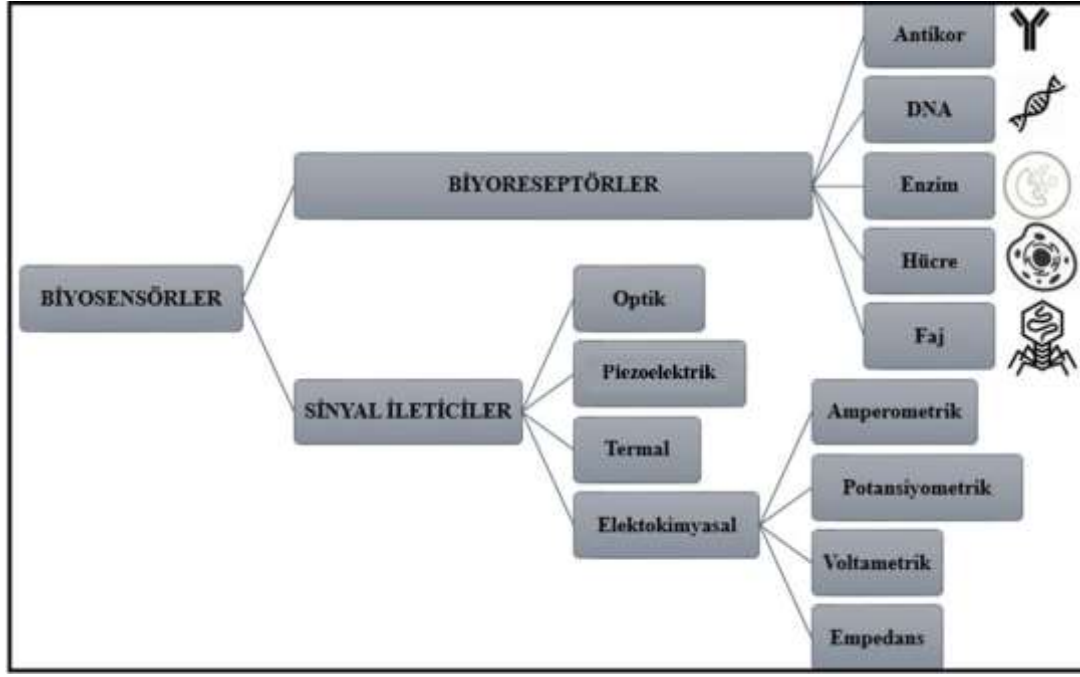
Biyosensörün oluşturulması aşamasında, biyolojik algılayıcı ile dönüştürücünün seçimi sırasında birbirlerine uyumlu olmaları gerektiğinden seçim buna göre yapılır. Örneğin; ısı değişimine bağlı olarak elektriksel sinyal üretimi yapan bir termometrik dönüştürücünün kullanılması için, analit ile biyolojik algılayıcı arasında meydana gelen reaksiyon sonucunda entalpi değişimi olması gerekmektedir (Birnur Sağdaş, 2009).



Şekil 2.15. Biyosensörlerin yapısı ve bileşenleri (Di Pietrantonio, 2019)

2.4.3. Biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörler biyobileşenine ve dönüştürücüsüne göre iki sınıfta sınıflandırılabilir.



Şekil 2.16. Biyosensörlerin sınıflandırılması (Perumal, 2013)

Elektrokimyasal biyosensörler

Ortamdaki biyoreseptör ile analit arasındaki sinyali elektrokimyasal bir yanıtla dönüştürebilen cihazlardır. Çoğunlukla bir referans elektrot, karşıt elektrot ve çalışma elektrodundan oluşan üçlü sistemlerdir. Elektrokimyasal yöntemlerden en çok kullanılan ikisi potansiyometrik ve amperometrik yöntemlerdir (Wang, 2005).

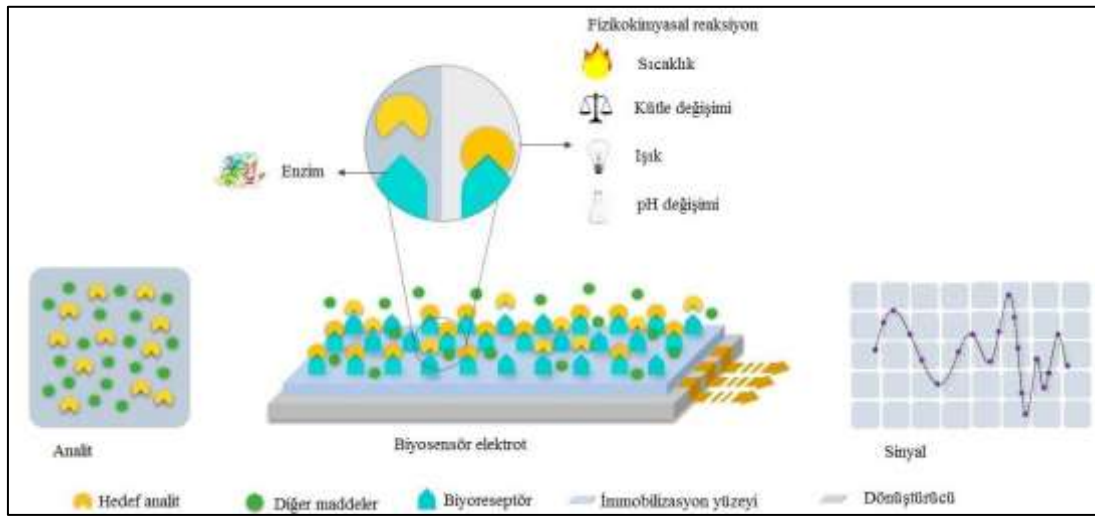
Amperometrik biyosensörler

Amperometrik biyosensörler, sabit uygulanan potansiyel üzerine üretilen redoks reaksiyonlarından kaynaklanan akım değişimini ölçer. Yani analiz edilecek maddenin yükseltgenmesi veya indirgenmesi için gerekli olan sabit potansiyel elektronik hücreye uygulanır ve akımda keskin bir yükselme veya düşme meydana gelir. Bu zirvenin yüksekliği, elektroaktif türlerin konsantrasyonu ile orantılıdır. Ayrıca amperometrik ölçümlerde zamanın bir fonksiyonu olarak akım değişimi takip edilir (Uzun, 2014).

Biyomalzemeler ve elektrot yüzeyi arasındaki elektron transfer mekanizmasının tanımlanması, bir amperometrik biyosensörün tasarlanmasında ve üretilmesinde kilit role sahiptir. Oksidazlar ve dehidrojenazlar, ölçümlerde katalitik moleküller olarak yaygın olarak kullanılır. Bu enzimler, aktif taraflarındaki kofaktörleri veya metal türleri ile oksidasyon-indirgeme reaksiyonlarını onaylarlar. Böylece bu redoks reaksiyonları sonucunda oluşan elektronlar elektrot yüzeyine aktarılır.

Biyosensör tasarımındaki birçok karmaşık algılama mekanizmasının yanı sıra, analitteki azalmanın veya redoks tarafından üretilen ürünlerdeki artışın doğrudan izlenmesi en basit yöntemlerdir. Ayrıca, enzimatik reaksiyonlarda elektron transferini arttırmak için bir arabulucu katılabilmektedir (Gerard, 2001).

Enzim biyosensörleri



Şekil 2.17. Enzim esaslı biyosensörlerin çalışma şeması (Campaña, 2019)

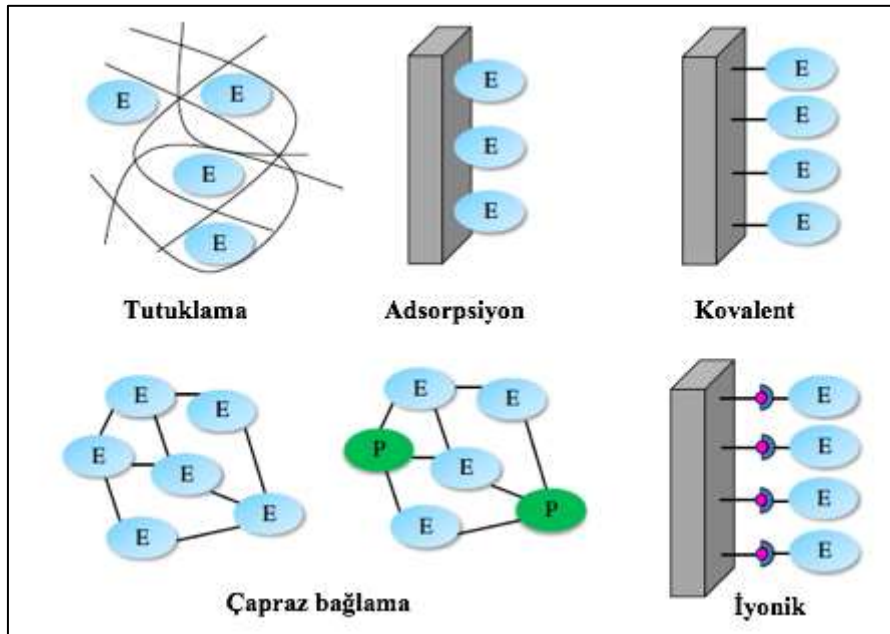
Belirli reaksiyonlar için enzimler, biyolojik katalizörler olarak görev yaparlar. Kendilerini spesifik bir substrata bağlayabilirler. Bu katalitik etki, enzim esaslı biyosensörlerde kullanılır. Enzim bazlı biyosensörlerin temel özelliklerini ve uygulamalarını anlamak için enzimin biyo algılama teknolojisindeki rolünü bilmek esastır. Biyolojik elementler olarak enzimler, biyosensörlerde ana seçici elementi sağlar. Bu biyolojik elementler, kendilerini belirli bir alt tabakaya bağlayabilen ancak başkalarına bağlayamayan maddeler olmalıdır. Bunu yapabilen dört ana malzeme grubu enzimler, antikorlar, nükleik asitler ve

reseptörlerdir. Biyosensörlerde kullanılan enzimler için etki şekli, elektrokimyasal olarak tespit edilebilen oksidasyon veya indirgemeyi içerir.

Enzim bazlı biyosensörlerin tasarımında en yaygın kullanılan enzim türleri peroksidazlar, polifenol oksidazlar, oksidoredüktazlar ve amino oksidazlardır (José Antonio Contreras Pérez, 2018).

2.4.4. Biyosensörlerin immobilizasyonu

Biyosensörlerin çalışma prensibinde, transduser ve biyobileşenlerin birlikte çalışmaları yer alır. Biyobileşenler, uygun bir immobilizasyon yöntemiyle transdusere bağlanır. Biyobileşenin yapısına uygun olarak immobilizasyon yöntemi seçilir. İmmobilizasyon, enzimin katalitik aktivitesinde değişikliğe sebep olmadan, tekrar kullanılmasına izin verecek biçimde katı desteğe/taşıyıcıya bağlaması ya da tutuklanması işlemidir. Bunun için çok çeşitli immobilizasyon yöntemleri vardır. Adsorpsiyon, çapraz bağlama, tutuklama ve kovalent bağlama yöntemleri bulunmaktadır. Bunlardan tutuklama ve adsorpsiyon fiziksel yöntemlere dayanırken, çapraz bağlama ve kovalent bağlama kimyasal yöntemlere dayanmaktadır (Bhardwaj, 2014).



Şekil 2.18. İmmobilizasyon teknikleri, E: enzim, P: protein (Sassolas, Blum ve Leca-Bouvier, 2011)

Kovalent bağlama

Kovalent immobilizasyon doğrudan transduser yüzeyine veya transduser üzerine sabitlenmiş ince bir zar üzerine gerçekleştirilen kimyasal bir immobilizasyon yöntemidir. Bu nedenle biyokatalizörler, içerdikleri ve katalitik aktivitede rol oynamayan fonksiyonel gruplar aracılığıyla yüzeye bağlanırlar (Sassolas, Blum ve Leca-Bouvier, 2011).

Katı desteğe bağlanma işlemi enzimler için sırasıyla, çok işlevli reaktifler (örneğin glutaraldehit veya karbodiimid) kullanılarak yüzeyin ilk aktivasyonunun gerçekleşmesi, ardından enzimin aktif desteğe bağlanması, sonrasında ise fazla olan ve bağlanmayan biyomoleküllerin uzaklaştırılmasıyla gerçekleştirilir.

Taşıyıcı destek, doğal polimer (örneğin selüloz) veya sentetik polimer (örneğin naylon) ya da inorganik bir malzeme (örneğin kontrollü gözenekli cam) olabilir. Önceden aktive edilmiş immünodin ve ultrabind gibi membranlar da kullanılmıştır.

Adsorpsiyon yöntemi

Adsorpsiyonu açıklamanın en basit yolu, atomların, iyonların, biyomoleküllerin ya da gaz, sıvı veya çözünmüş katı moleküllerin bir yüzeye yapışmasıdır. Bu, algılama molekülü ve yüzey arasındaki elektrostatik, van der Waals, hidrofobik gibi kovalent olmayan etkileşimlerle gerçekleştirilir. Bu etkileşimler daha zayıf kuvvetlere bağlı olduğundan immobilizasyon işlemi, çözücünün sıcaklığı, pH'ı, iyonik gücü ve polaritesi gibi çevresel koşullar değiştirilerek tersine çevrilebilir. Böylece biyosensörlerin biyo-tanım performansı, kararlılığı ve raf ömrü bu koşullardan kolaylıkla etkilenir (Bhardwaj, 2014).

Çapraz bağlama

Glutaraldehit, glyoxal veya hekzametilendiamin gibi iki işlevli ajanlarla çapraz bağlanarak gerçekleştirilen enzimlerin immobilizasyonu, biyosensörler geliştirmek için iyi bilinen bir başka yaklaşımdır. Enzim ya birbiriyle çapraz bağlanabilir veya sığır serum albümini gibi işlevsel olarak inert bir proteinin varlığında olabilir. Bu yöntem, sadeliği ve biyomoleküller arasında elde edilen güçlü kimyasal bağlanma nedeniyle çekicidir. Ana dezavantaj, çapraz

bağlanma sırasında aktif bölgenin kimyasal değişimleri ve aktif enzim konformasyonunun bozulması nedeniyle aktivite kaybı olasılığıdır (Sassolas ve diğerleri, 2012).

Tutuklama

Tutuklama (Entrapment), biyolojik materyallerin elektrot yüzeyindeki üç boyutlu ağa sabitlenmesiyle sağlanır. Bu teknikle yapılan immobilizasyon oldukça basit ve kolaydır. Enzimler, bir elektropolimerize film, polidimetilsiloksandan (PDM'LER) oluşan bir amfifilik ağ, bir fotopolimer, bir silika jel, bir polisakkarit veya bir karbon macunu gibi üç boyutlu matrislerde hareketsiz hale getirilebilir. Bu immobilizasyonun gerçekleştirilmesi kolaydır. Enzim, araçlar ve katkı maddeleri aynı anda aynı algılama katmanında biriktirilebilir. Biyolojik elementin modifikasyonu yoktur, böylece immobilizasyon işlemi sırasında enzimin aktivitesi korunur.

Fiziksel olarak hapsolmuş enzimlere dayanan biyosensörler genellikle artan operasyonel ve depolama kararlılığı ile karakterize edilir. Bununla birlikte, biyolojik bileşenin sızması ve olası difüzyon engelleri gibi sınırlamalar, sistemlerin performanslarını kısıtlayabilir (Sassolas ve diğerleri, 2012).

İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere göre üstünlükleri

Biyosensör çalışmasında, biyoaktif materyalin uygun olarak seçilmesinden sonra birbirine bağlanması işlemi karşılaşılan en önemli problemlerden olup çözümlenmesi gerekmektedir. Bu bağlanma, biyosensör immobilizasyonu olarak bilinmektedir.

Serbest enzim ve immobilize enzim karşılaştırılması yapıldığında, immobilize enzim üstünlükleri aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- *Reaksiyon bitiminde bulunduğu ortamdan kolaylıkla uzaklaştırılabilir (santrifüj, süzme) ve bununla beraber oluşan ürünlerin enzim sebebiyle kirletilmesi mümkün olmamaktadır.
- *Birden fazla adımda gerçekleşen reaksiyonlar için uygundur.
- *Çevre koşullarına (sıcaklık, pH vb.) karşı dayanıklılığı güçlenir.
- *Kararlılığı daha çoktur.
- *Ürün oluşumu kontrollü olarak gerçekleşebilir.

- *Bazı durumlarda serbest enzimden daha iyi aktivite gösterebilirler.
- *Uzun süre ve pek çok kez kullanım imkanı olur.
- *Art arda devam eden işlemlere uygulanabilir.
- *Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığı azalır (Bodur, 2019).

2.5. Enzimler

Katalizörler, reaksiyonların aktivasyon enerjisini azaltarak reaksiyon hızını artıran maddelerdir. Enzimler, kendileri kalıcı bir değişime uğramadan reaksiyon oranlarını hızlandıran katalizörlerdir (Nicholas ve Lewis, 1999). Ayrıca enzimler, canlı organizmalardaki reaksiyonları hızlandıran biyolojik katalizörlerdir.

2.5.1. Enzimlerin sınıflandırılması

Uluslararası Biyokimya Birliği, enzimlerin isimlendirilmesindeki uyumun ortadan kalkması ve bilinen enzim sayısının artması nedeniyle, enzim isimlendirmesi yapılması amacıyla Enzim Komisyonu'nu (E.C) 1984 yılında kurdu. Bu komisyon sistematik bir isimlendirme önerdi. E.C, tüm enzimleri katalize ettikleri reaksiyona göre altı ana gruba ayırdı. Her enzim, 3.5.1.5 gibi dört birimden oluşan sayısal bir kodla belirlendi. İlk sayı ana grubu, ikinci ve üçüncü sayı alt sınıfları ve son sayı enzimin reaksiyona girdiği substratı tanımlar. Katalize edilen altı ana grup ve reaksiyon türü aşağıda verilmiştir (Carr ve Mirkin, 2001).

- 1) Oksidoredüktazlar (EC1): Yükseltgenme-indirgenme tepkimelerini katalize eder.
- 2) Transferazlar (EC2): Belirli bir grubun bir maddeden diğerine transferini katalize eder.
- 3) Hidrolazlar (EC3): Çeşitli bağları hidrolize edebilen enzimlerdir.
- 4) Liyazlar (EC4): Hidrolitik olmayan bağ kırma tepkimeleri yoluyla kimyasal grupların eklenmesini veya çıkarılmasını katalize eder.
- 5) İzomerazlar (EC5): Molekül içi yeniden düzenlemeleri veya izomerizasyon tepkimelerini katalize eder.
- 6) Ligazlar (EC6): Hücresel düzeyde merkezi metabolizmada biyolojik olarak gerekli tepkimelerde yer alır.

Bu 6 kategoriye Ağustos 2018'de yeni bir sınıf olan translokazlar (EC7) eklenmiştir (Tao ve diğerleri, 2020).

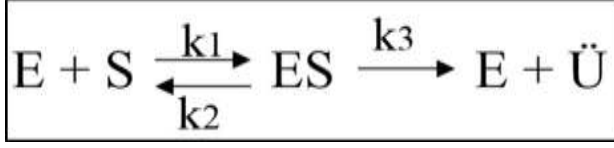
2.5.2. Enzimlerin yapısı

Enzimler yüzyıldan fazla bir süredir bilinmektedirler. Enzimlerin katalitik etkileri ilk kez 1835'te İsveçli kimyager John Jacob Berzelius tarafından tanınmıştır. İlk enzim üreaz, 1926'da James Summer tarafından jack fasulyesinden izole edilmiş ve kristalize edilmiştir. Bu çalışma Summer'a 1947 yılında Nobel Ödülü'nü kazandırmıştır.

Tüm enzimler genellikle protein yapısındadır ve peptit bağları ile birbirine bağlanan amino asit zincirlerinden oluşurlar. Molekül ağırlıkları 10.000 ile 2.000.000 arasında olan yüksek molekül ağırlığına sahip maddelerdir. Enzimler, koenzim ve apoenzim olarak adlandırılan iki kısımdan oluşur. Koenzim, enzimin protein olmayan kısmı iken apoenzim enzimin protein kısmıdır. Enzimin protein olmayan kısmı metal iyonu ise kofaktör; organik bir madde ise koenzim olarak adlandırılır. Tamamen aktif bir enzim olmak için bu iki yapının da bulunması gerekir. Bu toplam aktif enzim sistemine tüm enzim veya haloenzim denir. Substratına özgü olan her bir enzim, Fischer'in anahtar-kilit benzetmesi ile açıklanmaktadır (Fischer, 1894). Bu benzetmeye göre, enzim bir kilit ve substrat ise bir anahtar olarak düşünülebilir. Anahtar kilide doğru şekilde geçerse, kilit açılacaktır. Bir başka deyişle, söz konusu enzimin aktif bölgesine uyan bir substrat, ürüne dönüştürülecektir (Ekinci, 2006).

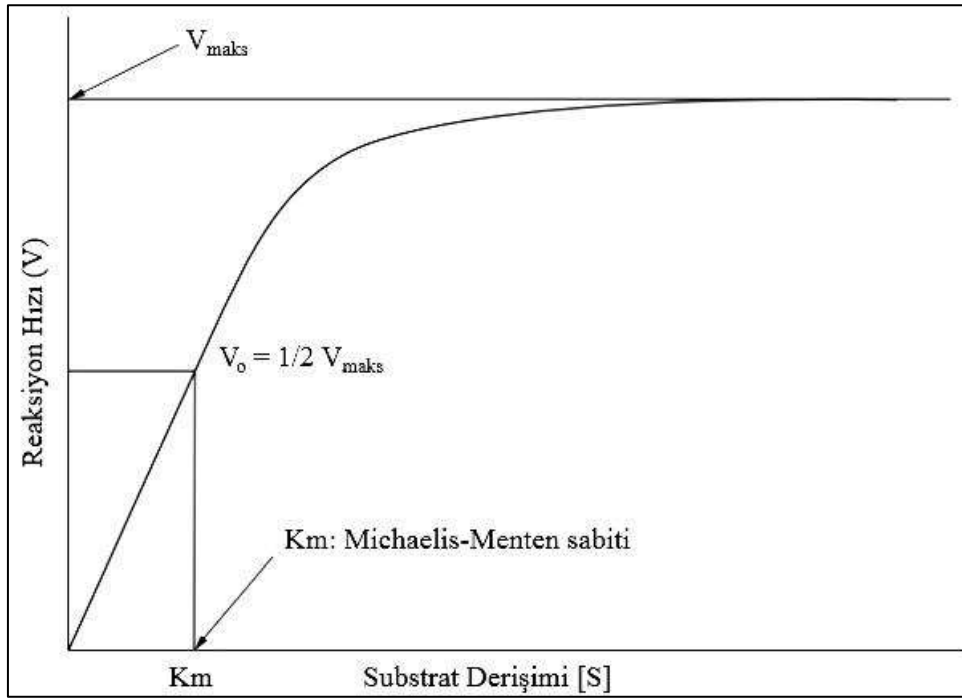
Enzimlerin tıp, ilaç, gıda ve kimya endüstrilerinde kullanımı katalitik özelliklerinden dolayı artmaktadır. Enzimler alkollü içeceklerde, ekmek yapımında, peynir yapımında, tatlandırıcılarda, binaların, şarapların ve meyve sularının berraklaştırılmasında kullanılır (Çil, 2006).

Enzim katalizli reaksiyonun kinetik özellikleri, enzim davranışı hakkında bilgi sahibi olmak için önemlidir. Enzim kinetiği ile ilgili ilk çalışma 1903'te Henri, 1913'te Michaelis ve Menten tarafından yapılmıştır. Aynı model üzerinde çalışmışlar yapılmış olsa da Michaelis ve Menten'in çalışması deneysel veriler ile belirlenmiştir. Bu çalışmaların enzim kinetiğinin temeli olduğuna inanılmaktadır. Enzimlerin kinetik mekanizması, Michaelis ve Menten tarafından önerilen basit bir modelle tek substrat için açıklanmaktadır.



Şekil 2.19. Enzimin substrat ile tepkimesi

Burada E serbest enzimi temsil ederken, S substratı, ES enzim substrat kompleksini ve $\ddot{U}$ ürünü göstermektedir. Substrat ilavesiyle enzim ve substrat birleşerek ES kompleksini oluşturmaktadır. Bu kompleksin konsantrasyonu, tüm serbest enzim molekülleri tüketilene kadar artacaktır. Substratın daha fazla eklenmesi, ES konsantrasyonunu ve reaksiyon hızını ihmal edilebilir miktarlarda arttırmaktadır (Tze, 1975) Enzimatik tepkimenin hızını, başlangıç hızı (k_1) belirlemektedir. ES kompleks yapısının E+S' ye dönüşme hızı (k_2) E+ $\ddot{U}$ ' ye dönüşme hızından (k_3) çok daha fazladır.



Şekil 2.20. Michaelis-Menten grafiği (Litwack, 2018)

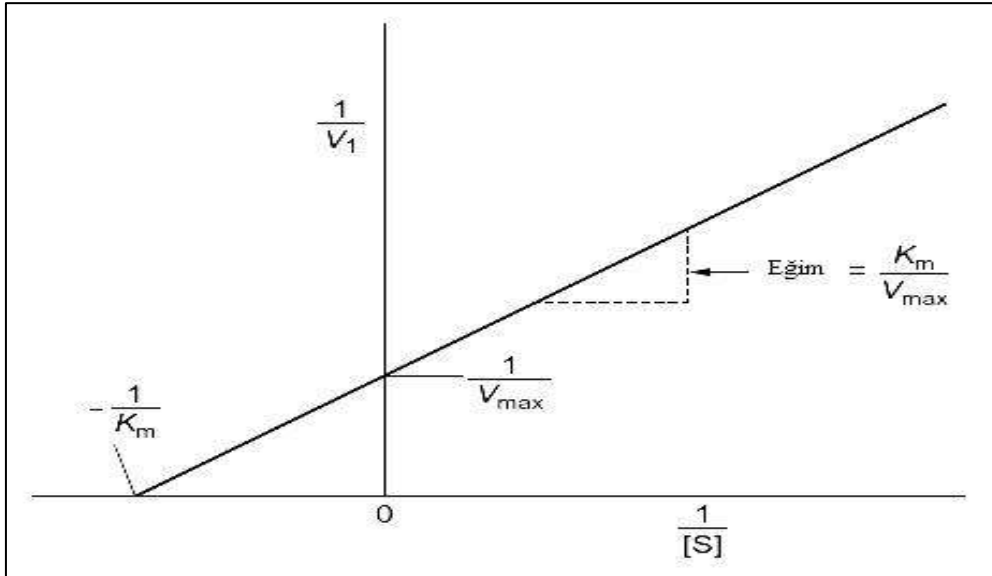
K_m (Michaelis sabiti), tepkime hızı ve substrat derişimi arasındaki bağlantıyı anlamak için kullanılmaktadır. K_m , her enzim için farklı bir değere sahiptir. Michaelis ile Menten tarafından türetilen aşağıdaki denklem Hiperbolik enzim-substrat doygunluğu olarak tanımlanır (Akbıyık, 2022):

$$V = \frac{V_{maks} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Burada Vmax, maksimum hızı tanımlar. Denklem ters çevrilirse aşağıdaki denklem bulunur:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{maks}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}}$$

Bu son denklem Lineweaver-Burk denklemidir ve doğrusal bir çizime karşılık gelmektedir. Başlangıç hızın tersinin (1/V); substrat derişiminin tersine (1/[S]) karşı grafiğı, doğrusal bir çizgi vermektedir. Söz konusu doğrunun eğimi K_m/V_{maks} 'a eşit olmaktadır. Dikey eksenle kesişim noktası $1/V_{maks}$ 'a karşılık gelmekte iken yatay eksenle kesişim noktası $-1/K_m$ 'yi vermektedir (Blanco ve Blanco, 2017).



Şekil 2.21. Lineweaver-Burk grafiğı (Litwack, 2018)

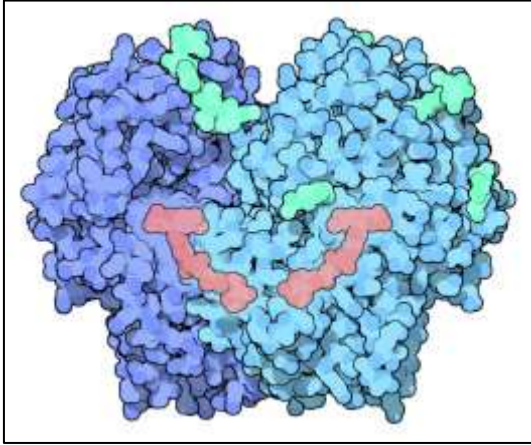
2.5.3. Glukoz oksidaz enzimi

Glukoz oksidaz ilk olarak 1904 yılında Maksimow tarafından Aspergillus niger ekstraktlarında keşfedilmiştir. Müller ise 1928 yılında enzimin oksidatif etkisi olduğunu tespit etmiştir. Glukoz oksidaz geninin DNA dizisi Kriechbaum ve diğerleri tarafından 1989

yılında (Kriechbaum ve diğ erleri, 1989) yapısı ise Wohlfahrt ve diğ erleri tarafından (Wohlfahrt ve diğ erleri, 1999) 1999 yılında tespit edilmiştir.

Glukoz oksidaz, kaynağına ve moleküler kütlesine bağılı olarak 120 kDa ila 290 kDa arasında çeşitlilik gösteren, dimerik veya tetramerik bir proteindir. *Aspergillus niger* kaynaklı GOD enzimleri ise molekül kütlesi 150 kDa ila 186 kDa arasında değı en dimerik bir proteinlerdir.

Yapısal olarak glukoz oksidaz, her monomerinde kofaktör olarak kovalent bağılanmamış iki flavin adenin din kleotidinden (FAD) oluşan bir homodimerdir. FAD koenzimi kataliz sırasında elektron taşıyıcı görevi görür (Wilson ve Turner, 1992). FAD olmaksızın apoenzim biyolojik aktivite gösteremez. Ama doğıal veya yapay olarak modifiye FAD kofaktörü tekrar apoenzim molekülüne bağılanabilir.



Şekil 2.22. Glukoz oksidaz, Glukoz oksidaz iki alt birimi ile koyu ve açık mavi, FAD koenzimi ise pembe olarak tasvir edilmiştir (DS, 2006).

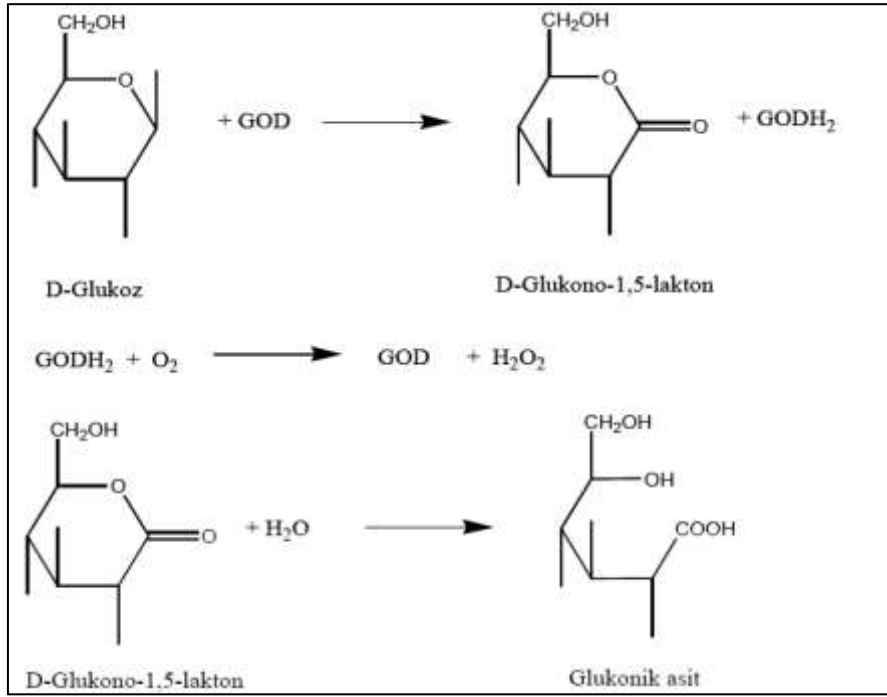
Glukoz oksidaz, bazı mantarlar ve böcekler tarafından doğıal olarak üretilen bir enzimdir. Beklendiğı gibi, doğıal işlevi katalitik aktivitesi ile yakından ilgilidir. Glukoz oksidazın temel işlevi, hidrojen peroksit üretimi yoluyla antibakteriyel ve mantar önleyici ajan görevi görmektir (Wong, 2008).

Glukoz oksidaz, monosakkaritleri, nitroalkanları ve hidroksil bileşiklerini oksitleyebilir. Glukozun reaksiyon hızını referans olarak kullanarak (%100), yalnızca 2-deoksi-D-glukoz (%20-30), 4-O-metil-D-glukoz (%15) ve 6-deoksi-D-glukoz (%10) glukoz oksidaz

tarafından önemli bir oranda oksitlenir. Glukoz oksidazın diğer substratlara karşı aktiviteleri tipik olarak zayıftır ve reaksiyon oranları glukozun %2' sinden düşüktür.

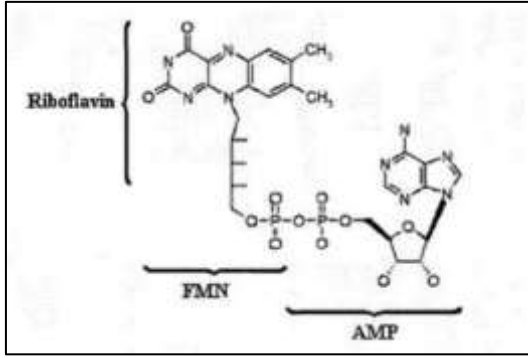
Glukoz oksidaz tepkime mekanizması

Şekil 2.23'te görülen reaksiyon glukoz oksidazın, glukozu glukonik aside oksitleme reaksiyonudur. Flavoenzimin öncesinde indirgendiği ve sonrasında yükseltgendiği iki basamak üzerinden reaksiyon yürür. İndirgenmenin gerçekleştiği yarı basamakta glukoz 2 proton ve elektronu enzime aktararak glukonolaktone dönüşür. Yükseltgenmenin gerçekleştiği yarı basamakta ise enzim moleküler oksijen ile yükseltgenirken hidrojen peroksit oluşur.



Şekil 2.23. Glukoz oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon

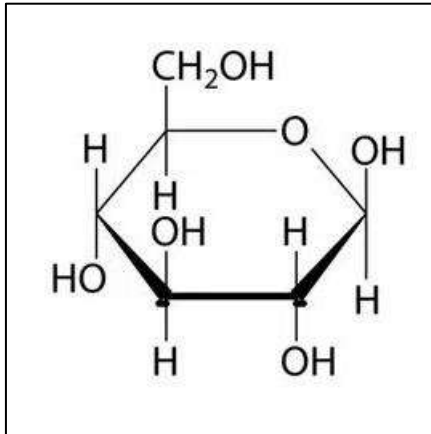
Glukoz oksidaz enziminde bulunan FAD grubu üzerinden Şekil 2.23'deki reaksiyon yürümektedir. FAD molekülünün kimyasal yapısı Şekil 2.24'de verilmiştir. FAD'ın indirgenme özelliği riboflavinin indirgenmesi prensibine dayanır. FAD elektron alıcısı olarak davranarak glukozu yükseltir. Sonrasında moleküler oksijeni indirgeyerek hidrojen peroksit oluşturur ve FAD tekrar oksitlenmiş haline dönüşür (Uzumer, 2015).



Şekil 2.24. Glukoz oksidaz enziminde yer alan FAD grubu

2.6. Glukoz

Sakaritler doğada bulunan en yaygın organik bileşikler arasındadır ve glukoz açık ara en bol bulunan monosakkarittir. Glukozun kimyasal formülü $C_6H_{12}O_6$ şeklindedir. D-glukoz, çoğu meyvenin suyunda bulunan altı karbonlu şekerdir (Schenck, 2020).



Şekil 2.25. Glukozun molekül yapısı

Saf glukoz ilk olarak 1747'de Alman Kimyager Marggraf tarafından üzüm suyundan elde edilmiştir. Proust, 1801'de üzüm suyundan D-glukoz kristallerini çökelten ilk kişilerden biri olmuştur. 19. Yüzyılın sonunda glikozun genel yapısı Emil Fischer tarafından aydınlatılmıştır (Schenck, 2020). Nişastadan üretilen ilk tatlandırıcı, pirincin enzimatik hidrolizi ile Çin'de MÖ 1000 civarında yapılan disakkarit olan maltozdur.

Glukoz, vücudumuzda meydana gelen metabolik olaylarda önemli bir role sahiptir. Organizmada enerji üretiminde aktif bir rolü vardır. Glukoz kan dolaşımına emilir, kan

dolaşımına geçer ve organizma tarafından enerji üretimi için kullanılır. Organizma dokularının büyümesi ve bakımı için gerekli olan diğer metabolik ara maddelere dönüştürülür. Bu kadar önemli bir molekülün tayini de yine büyük bir önem taşımaktadır. Öyle ki kanda bulunan glukozun tayini pek çok hastalığın tespiti için kritik öneme sahiptir.

Kandaki glukoz seviyesindeki bozukluklar çeşitli hastalıklara yol açmaktadır. Bu hastalıklar içerisinde doğrudan olan ise Diabetes Mellitustur. Diabetes mellitus, modern dünyada en sık görülen maliyetli hastalıklardan biridir. Diabetes mellitus; mikrovasküler (retinopati, nefropati ve nöropati) ve makrovesküler (kalp hastalığının (IKH), hipertansiyon vb.) komplikasyonların baş faktörleri arasında yer almaktadır (Karagollu ve diğerleri, 2009).

Yetersiz ve dengesiz beslenme ile hareketsiz yaşam kaynaklı her geçen gün insanların diyabet hastalığına yakalanma ihtimali artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) yaptığı araştırmaya göre 2020 yılında Dünya üzerinde 171 milyon kişinin diyabet hastası olduğunu belirtirken bu sayının 2030 yılında 366 milyona yaklaşacağını öngörmüşlerdir (URL-5).

Kandaki glukoz seviyesinin belirlenmesi, diabetes mellitusun erken teşhisi ve yönetimi için kilit bir faktördür. Glukzo tayini; spektrometri, HPLC, palometri, kapiler elektroforez gibi geleneksel yöntemler ile yapılabilmektedir. Ancak bu yöntemler zaman alıcı, maliyetli, numune için ön hazırlık ve tayin için uzmanlık gerektiren yöntemler olduğundan son yıllarda, hızlı yanıt vermeleri, küçük boyutları, yüksek hassasiyetleri ve seçicilikleri nedeniyle biyosensörlerin tasarımına ve geliştirilmesine büyük ilgi olmuştur. Bu nedenle, kısa yanıt süresine sahip seçici ve hassas glukoz biyosensörlerinin üretilmesine önemli miktarda bilimsel çaba harcanmıştır. Düşük maliyetli ve uzun ömürlü olması, biyosensörlerin istenen diğer özellikleridir (Çolak ve diğerleri, 2012).

2.7. Karbon Pasta Elektrotlar

Günümüz biyosensör çalışmalarında camsı karbon elektrot, karbon nanotüp içeren elektrotlar, kompozit elektrotlar, karbon fiber elektrot ve bizmut, altın, gümüş, platin gibi metal elektrotlar ve karbon pasta elektrotlar kullanılmaktadır. Kendine özgü özellikleri dolayısıyla karbon pasta elektrotlara sıkça rastlanılmaktadır (Hočevar ve diğerleri, 2005).

Organik ve inorganik bileşiklerin analizi için kullanılan karbon pasta elektrot (CPE), yaygın olarak kullanılan elektrokimyasal bir detektördür. CPE; düşük akımı, geniş potansiyel aralığı, düşük maliyeti, kolay hazırlanabilmesi ve toksik olmama gibi avantajlar bulundurmaktadır. Ayrıca yüzeyin tekrarlanabilirliği, stabilitesi ve yenilenebilirliği sayesinde karbon pasta elektrotları hazırlanması en çekici malzemelerden biri yapar. Ek olarak, bu elektrotların modifikasyonu, değiştiricinin karbon pasta ile karıştırılmasıyla elde edilir. Bu nedenle, elektrokimyasal analiz tekniğinin hassasiyetini ve seçiciliğini arttırmak için değiştirici malzeme olarak çok çeşitli bileşikler (organik ve inorganik) kullanılabilir (Piovesan ve diğerleri, 2020).

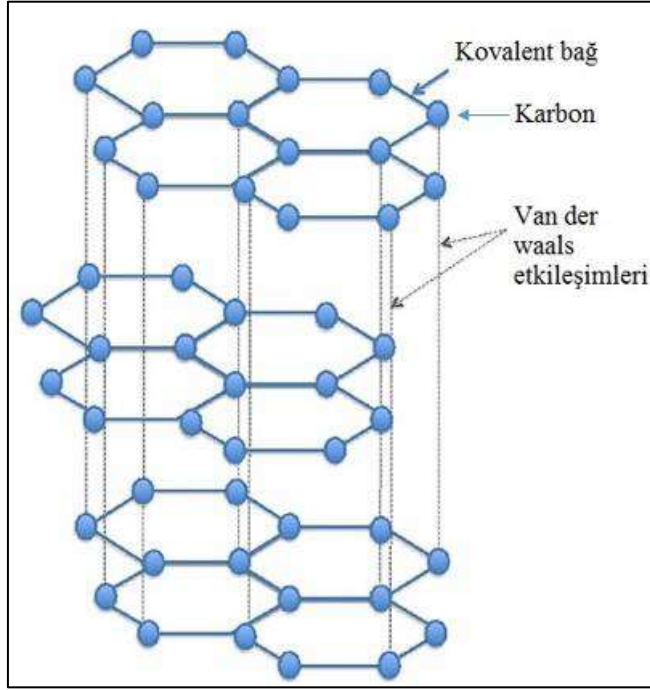
Karbon pasta elektrot karbonun (grafit tozu) ve birleştirici malzemenin (parafin, nujol, organik sıvı veya bunlara benzer iletken olmayan bir minarel yağ) karıştırılmasıyla elde edilir. Kullanılan birleştirici sıvı yüksek viskozite, uçucu olmama ve topaklanmaya engel bir yapıya sahip olmalıdır. Bu nedenle nujol mineral yağı, karbon pasta elektrot hazırlamada sıkça tercih edilmektedir (Hočevan ve diğerleri, 2005).

Karbon pasta hazırlarken karbonun çoğunlukla tercih edilmesi, geniş bir yükseltgenme potansiyel aralığı, düşük artık akım, tekrarlanabilir yüzey yapısı, düşük elektriksel direnç ve sulu ortamda hem indirgenme hem yükseltgenme alanında uygun bir çalışma aralığı sağlamasıdır. Bununla birlikte yaygın olarak kullanılan karbon türleri; yüksek düzenlilikte pirolitik grafit (HOPG), gömme karbon, karbon siyahı, lif karbon, tek kristalli grafit, camısı veya seramik karbon ve toz grafitir. Bu çalışmada ise; grafit tozunun yüksek saflığa sahip olması, mikron boyutlarda partiküller bulundurması ve düşük soğurma kapasitesine sahip olması nedeniyle, toz haline getirilmiş grafit tercih edilmiştir.



Şekil 2.26. Karbon pasta elektrot

Grafitler, altıgen karbon dizilimi içeren levhaya benzeyen petek şeklinde bir yapıya sahiptir (Şekil 2.27). Bu yapısı sayesinde farklı türler karbon levhalar arasında değişik şekilde konumlanabilirler.



Şekil 2.27. Grafit molekülü (Akbıyık, 2022)

2.8. Kaynak Araştırması

2013 yılında yapılan bir çalışmada Satsuma mandalina (*Citrus unshiu*) kabuğu kullanılarak gümüş nanopartiküller sentezlenmiştir. Bol miktarda bulunan meyve kabuğu atıklarına dayanan bu uygun maliyetli, basit, hızlı, toksik olmayan ve çevre dostu teknikle üretilen nanopartiküller, çeşitli standart analitik tekniklerle karakterize edilmiştir. Bu gümüş nanopartiküllerin biyomedikal alanda potansiyel uygulamaları olduğunu ve kullanılan basit prosedürün büyük ölçekli bir ticari üretim için çeşitli avantajları olacağı savunulmuştur (Basevegowda ve Lee, 2013).

Umadevi ve diğerlerinin 2011 yılında yaptığı çalışmada *Daucus carota* bitkisi gümüş nanopartiküllerin biyosentezinde kullanılmıştır. Gümüş nanopartiküller UV Görünür Spektroskopisi, Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), X-Işını Kırınımı (XRD) ve Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ölçümleri ile karakterize edilmiştir. XRD ölçümleri, gümüş nanopartiküllerin ortalama boyutunun 20 nm olduğunu göstermiştir.

UV ile görülebilen spektrumlar, gümüşün maksimum absorbas zirvesinin 415 nm'de gözlemlendiğini göstermiştir. FTIR ölçümleri, biyoredüklenmiş gümüş nanopartiküllerin azaltılmasından sorumlu olan askorbik asidin *Daucus carota* ekstraktındaki varlığını gösterirken; TEM ölçümü, gümüş nanopartiküllerin çoğunun küresel bir şekle sahip olduğunu göstermektedir. Tehlikeli ve toksik çözücülerin ve atıkların varlığından kaçınarak verimli yeşil nanokimya metodolojisi ile gümüş nanoyapılar üretilmiştir (Umadevi ve diğerleri, 2012).

Vijayaraghavan ve diğerlerinin 2012 yılında yaptığı çalışmada *Trachyspermum ammi* ve *Papaver somniferum*'un sulu ekstraktları kullanılarak gümüş nanopartiküller için yeni bir biyosentez yolu denenmiştir. *Trachyspermum ammi*'deki ana bileşenler timol, p-simen ve terpinendir, *Papaver somniferum* ise morfin ve kodeinden oluşur. *Trachyspermum ammi*'deki uçucu yağın, biyoyumlu gümüş nanopartiküllerin oluşumu için *Papaver somniferum*'da bulunan alkaloidlerden daha iyi bir indirgeyici madde olduğu bulunmuştur. Sonuçlar, aynı ekstrakt dozu için *Trachyspermum ammi*'nin, 87 nm'den 998 nm boyutuna kadar çeşitli boyutlarda üçgen şekilli nanoparçacıkları sentezlediğini göstermiştir. *Papaver somniferum*'de, boyut olarak 3,2 ila 7,6 nm arasında değişen neredeyse küresel şekilli partiküller görülmüştür. Reaksiyon durumunun optimizasyonuna dayanan ve boyuta özgü nanoparçacıkların sentezi gelecekteki araştırmalar için ilginç bir alan olacağını belirtmişlerdir (Vijayaraghavan ve diğerleri, 2012).

Ngeontae ve diğerlerinin 2008 yılında yaptığı çalışmada gümüş nanopartiküller sentezlenerek glukoz biyosensöründe potansiyometrik bir redoks markörü olarak kullanılmıştır. H_2O_2 konsantrasyonu ile gümüş nanopartiküllerden serbest Ag^+ salınımının aktivitesi arasındaki doğrusal ilişki doğrudan potansiyometri ile gözlenmiştir. Çalışma doğrusal aralığı 0,1-3 mM bulunmuştur (10 mM magnezyum asetat tamponu pH 6). Alt algılama sınırı 10^{-5} M bulunmuştur. % RSD <7 ile çok iyi tekrarlanabilirlik ve sensörden sensöre yüksek tekrarlanabilirlik sergilemiştir. Bu nedenlerle içeceklerdeki glukozu iyi doğruluk ve hassasiyetle belirlemek için kullanılabileceğini savunmuşlardır (Ngeontae ve diğerleri, 2009).

Ravichandran ve diğerlerinin 2019 yılında yayımlanan çalışmasında *Parkia speciosa* yaprak özü aracılı gümüş nanopartiküllerin yeşil sentezi, karakterizasyonu, antibakteriyel, antioksidan ve fotokatalitik aktivitesini incelemişlerdir. Gümüş nanopartiküllerin (PAgNPs)

yeşil sentezi, *Parkia speciosa* yaprağı sulu ekstresi kullanılarak gümüş nitratin biyo-indirgenmesiyle sağlanmıştır. PAgNPs oluşumu UV–Vis spektroskopisi ile doğrulanmış ve çözeltideki sentezlenmiş gümüş nanopartikülleri, spektrofotometrik olarak 410.5 nm'de maksimum absorpsiyon göstermiştir. SEM, TEM ve DLS analizi, sırasıyla 31 nm, 35 nm ve 155.3 d.nm olduğu tespit edilen PAgNPs'lerin ortalama partikül büyüklüğünü doğrulamak için kullanılmıştır (Ravichandran ve diğerleri, 2019).

Tarımsal atık olan *Annona squamosa* kabuğu ekstresi ile gümüş nanopartiküller yeşil sentez yönemi ile sentezlenmiştir. Gümüş nanopartiküllerin kontrollü büyümesi 4 saat içinde oda sıcaklığında (25 °C) ve 60 °C'de oluşturulmuştur. Partikül boyutlarının 20 nm ile 60 nm arasında değişen düzensiz küresel AgNP'lerin olduğu ve ortalama partikül boyutunun 32 ± 5 nm olduğu ve XRD Scherrer denklemi ile elde edilen değerlerle tutarlı olduğu belirtilmiştir (Kumar ve diğerleri, 2012).

Gümüş nanopartiküllerin atık çim aracılı yeşil sentezi ile antikanser, antifungal ve antibakteriyel aktivitelerinin değerlendirilmesi 2018 yılında Khatami ve diğerleri tarafından yapılmıştır. AgNP'lerin antikanser, antifungal ve antibakteriyel etkisi in vitro olarak incelenmiştir. AgNP'lerin *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii*'ye karşı minimum inhibitör konsantrasyonu yaklaşık 3 µg/ml olarak hesaplanmıştır. AgNP'lerin *Fusarium solani*'ye karşı en yüksek inhibitör etkisi, 20 µg/ml AGNP konsantrasyonunda % 90'a yakın bulunmuştur. AGNP konsantrasyonunu 5 µg/ml'ye çıkararak kanser hücresi büyümesi üzerinde engelleyici bir etkiye ulaşılırken kanser hücrelerinin hayatta kalması yaklaşık % 30 azalmıştır (Khatami ve diğerleri, 2018).

Saranyaadevi ve diğerlerinin 2014 yılında yaptığı çalışmada ise AgNP'lerin sentezi için kolay, uygun maliyetli ve yetkin bir yol sağlanmıştır. *Capparis zeylanica* bitki yaprakları kullanılarak AgNP'lerin sentezi için çevre dostu, hızlı bir biyolojik yaklaşım oluşturulmuştur. Biyolojik sentez, bitki yapraklarının kullanımını içermektedir. Nanopartiküllerin sentezi için kullanılan bitki yapraklarının başka bir kullanımı yoktur ve ürün, atık olarak kabul edilmiştir. Bu çalışmada çözeltinin görünümü ve UV-vis spektroskopisi ile AgNP'lerin gelişimi gözlenmiştir. XRD paterni, sentezlenen AgNP'lerin kristal doğası ile oldukça kararlı olduğunu doğrulamak için kullanılmıştır. FTIR analizi, AgNP'lerin azaltılmasından sorumlu olan yaprak ekstresinde bulunan fonksiyonel grubu tanımlamak için kullanılmıştır. Hem SEM hem de TEM çalışmaları ile sentezlenen

AgNP'lerin 50-90 nm aralığında küresel bir şekle sahip olduğunu doğrulanmıştır (Saranyaaadevi ve diğerleri, 2014).

Jia ve diğerleri tarafından gümüş nanopartikül ile modifiye edilmiş bir elektrot tasarlanmış ve enzimatik olmayan glukoz algılamada uygulamışlardır. Bu yöntem, başka hiçbir kimyasal kullanılmadan kolay, düşük maliyetli ve çevre dostudur. Gümüş iyonu implantasyonunun, endüstriyel büyük ölçekte AgNP ile modifiye edilmiş elektrotları imal etmenin kolay ve etkili bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır. Önerilen elektrot, glukoz tayinine yönelik yüksek elektrokatalitik aktivite sergilemiş ve glukozun tespitinde geniş bir doğrusal aralık göstermiştir. Bu rapor ile yeni yöntemin, enzimatik olmayan glukoz biyosensörlerinin geliştirilmesi için arzu edilen bir platform sağlayacağını gösterdiğini savunmuşlardır (Jia ve diğerleri, 2012).

Wang ve diğerleri tarafından 2012 yılında gümüş nanotellere ve glukoz oksidaza dayalı amperometrik glukoz biyosensörü geliştirilmiştir. Glukoz biyosensörü yüksek hassasiyet, düşük algılama sınırı, hızlı yanıt ve iyi stabilite göstermiştir. Gerçek numune analizinde; insan kan serumundaki glukoz tayini için biyosensör kullanılmıştır. İyileşme, serum örneğine farklı konsantrasyonlarda glukoz eklenerek araştırılmış ve iyileşme değerleri % 87-92 aralığında bulunmuştur. Bu sonuçlar, modifiye edilmiş biyosensörün serumdaki glukozu belirlemek için kullanılabileceğini göstermiştir (Wang ve diğerleri, 2013).

Kausaite ve diğerleri tarafından 2020 yılında, poli (1,10-fenantrolin-5,6-dion), poli (pirol-2-karboksilik asit) (PPCA), altın nanopartikülleri (AuNP) ve glukoz oksidazdan (GOx) oluşan nanobiyokompozite dayalı yeni bir amperometrik glikoz biyosensörü tasarlanmıştır. Bunu başarmak için, 1,10 fenantrolin-5,6-dion (PD) içeren grafit çubuk elektrot, pirol-2-karboksilik asit (PCA) ve koloidal AuNP içeren bir tampon çözeltisi ile doldurulmuş elektrokimyasal hücreye daldırılmış ve PD ve PCA'nın elektrokimyasal polimerizasyonu siklik voltametri ile gerçekleştirilmiştir. Bu işlem esnasında glukoz oksidaz enzimi kovalent immobilizasyon yöntemiyle immobilize edilmiştir. Hazırlan biyosensör 0,2-150 mM derişiminde geniş doğrusal aralık göstermiştir. Biyosensörün nispeten düşük algılama sınırına 0,08 mM ve iyi tekrarlanabilirliğe sahip olduğu belirtilmiştir. 14 gün sonunda başlangıç aktivitesinin % 3,98'ini kaybetmesi ile raf ömrünün mükemmel olduğu belirtilmiştir. Ürik asite karşı girişim etkisi olmamıştır (Kausatie ve diğerleri, 2020).

Izadyar ve arkadaşlarının 2022 yılında yaptıkları çalışmada mısırdan elde edilen rekombinant bir enzim ve basit bir modifikasyon kullanarak, glukozu ölçmek için kolay, hızlı ve uygun maliyetli yeni bir biyosensör üretmişlerdir. Bitki tarafından üretilen mangan peroksidaz ile glukoz oksidaz enzimleri kullanılması ile modifiye enzim elektrodu hazırlanmış ve glukoz tespitinde kullanılmıştır. 20,0 μM – 15,0 mM derişimleri arasında modifiye elektrodun çalışma aralığı belirlenmiştir. 2,9 μm 'lik daha düşük bir algılama sınırına sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışmalar 0,1 M fosfat tamponunda, pH 7,0'de yapılmış ve çalışma potansiyeli 0,84 V olarak belirtilmiştir. Girişim etkisi askorbik asit ve sitrik asit ile tayin edilmiştir. Mevcut amperometrik yanıt, bu biyosensörün çok çeşitli glukoz konsantrasyonlarını (3,1 μM ila 13,2 mM) tespit etme kabiliyetinin yüksek olduğunu göstermiştir. Ayrıca tekrar kullanılabilirliğin yüksek olduğu belirtilmiştir (Izadyar ve diğerleri, 2022).

Yang ve diğerleri 2013 yılında yaptıkları çalışmada gümüş nanoküplere (AgNC'ler), yaban turpu peroksidazına (HRP) ve kitosan (CS) ile glikoz oksidaza (Gox) dayalı bir amperometrik glukoz biyosensörünü ürettiklerini bildirmişlerdir. Karakterizasyon, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen peroksit biyosensörünün performansını incelemek ve optimize etmek için siklik voltametri (CV) ve amperometrik ölçümler kullanılmıştır. 10 μM - 1,5 mM derişim aralığında ve 0,6977 μM tespit sınırı ile glukoz ölçümü yapılmıştır. Hazırlanan elektrotun, yüksek hassasiyet, düşük algılama sınırı, hızlı tepki gibi bir dizi çekici özellik sunduğu belirtilmiştir. Optimum pH aralığı 6,0 – 8,5 aralığı olarak belirlenmiştir. Biyosensörün raf ömrü incelemesinde 9 gün sonunda başlangıç aktivitesinin % 93'ünü, iki hafta sonunda ise % 70'ini koruduğu belirlenmiştir (Yang ve diğerleri, 2014).

Ren ve diğerleri tarafından 2004 yılında biyosensörün mevcut tepkisini arttırmak için gümüş nanopartiküller kullanmışlardır. Gümüş solusyonu içinde glukoz oksidazın immobilizasyonuna dayanan bir amperometrik glukoz biyosensörünün fizibilitesi araştırılmıştır. Glukoz oksidaz basitçe gümüş nanopartikülleri ile karıştırılmış ve bir polivinil bütiral ortamında glutaraldehit ile çapraz bağlanmıştır. Daha sonra karışık çözelti ile bir platin elektrot kaplanmıştır. Kullanılan gümüş partikül miktarının, enzim elektrotları için mevcut tepkiye göre etkileri incelenmiştir. Kararlı durum akımı tepkisine ulaşma süresi, gümüş partikülü olmayanlara göre üç kat daha az (60 saniyeden 20 saniyeye düşüş) tespit

edilmiştir. Gümüş nanopartikülleri içeren enzim elektrodu, gümüş nanopartikülleri içermeyen elektrotlara kıyasla yanıt akımını önemli ölçüde arttırmıştır. Biyosensörlerin yanıt verme hızı da geliştirilmiştir (Ren ve diğerleri, 2005).

Sistani ve diğerleri tarafından 2014 yılında yapılan çalışmada gümüş nanopartiküller kullanılarak penisilin biyosensörü geliştirilmiştir. Gümüş nanopartiküller kullanılarak penisilinin seçici tespiti enzimatik biyosensöre dayanmaktadır. XRD, TEM ve boyut dağılım teknikleriyle araştırılmış ve gümüş nanopartiküllerin ortalama boyutu 90 ± 10 nm civarında olduğu belirtilmiştir. Verilen sensörün tekrarlanabilirliğini araştırmak için 5, 10, 20 ve 30 mM penisilin solüsyonlarındaki beş sensör elektrotunun hepsinin potansiyometrik yanıtını incelenmiş ve bağıl standart sapmanın %4'ten az olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada, çapraz bağlayıcı olarak penisilinaz enzimi ANB-NOS (N-5-Azido-2-nitrobenzoyloxysuccinimide) ile kullanılmıştır. Penisilin için, enzim-analit reaksiyonu, önerilen sensör tarafından seçici olarak değerlendirilen yüklü iyonlar için de oldukça karakteristik olduğu belirtilmiştir. Penisilinaz, diğer müdahale eden türlerin varlığında bile penisilin ile reaksiyonda çok özeldir. Sensörün Na^+ , K^+ , D-glukoz, askorbik asit, ürik asit, üre, sukroz, laktoz, glisin, penisilloik asit ve sefalosporinlerle kesin bir antagonisti tespit edilmemiştir (Sistani ve diğerleri, 2014).

Khumngern ve diğerleri 2021 yılında yaptıkları çalışmada bir politiramin tabakası (AuNPs/Pty) üzerine adsorbe edilen altın nanopartiküller üzerinde glukoz oksidazın (GOx) immobilizasyonuna dayanan yeni bir oksidaz enzim sensörü üretmişlerdir. Söz konusu biyosensörü üretmek için Prusya mavisini (PB) ile modifiye edilmiş karbon elektrot üzerine kaplanmıştır. Amperometrik glukoz biyosensör yanıtı -0,1 V'da ölçülmüştür. Geliştirilen biyosensör, 1.0 μM –1.0 mM glukoz derişimi aralığında doğrusallık ve 1.0 μM tespit sınırı göstermiştir. Michaelis sabiti K_m 0.21 mM olarak tespit edilmiş olup, immobilize edilmiş Gox'in glukoz için yüksek afiniteye sahip olduğu belirlenmiştir (Khumngern ve diğerleri, 2021).

Yang ve diğerleri tarafından 2009 yılında Fe_3O_4 nanopartiküllerine ve kitosan/naftion kompozit filme dayalı pratik bir glukoz biyosensörü hazırlanmıştır. Yeni glukoz biyosensörü nispeten hızlı tepki, yüksek hassasiyet, geniş doğrusal aralık, düşük algılama sınırı, iyi tekrarlanabilirlik ve uzun süreli stabilite göstermiştir. Fe_3O_4 nanopartiküller H_2O_2 'nin reaksiyonunu katalize edebileceğinden, geniş algılama aralığı ve yüksek hassasiyet ile akım

tepkisinin büyüklüğünün yükseltilmesini sağlayabileceği görülmüştür. Bu özelliğin kandaki, ilaçlardaki ve gıdalardaki glukozun belirlenmesinde çeşitli karakteristik iyileştirmelerin potansiyel uygulamasını açıklayacağını belirtmişlerdir. Dahası, bu biyosensörün paraziti neredeyse ortadan kaldırdığı ve diğer analitleri içeren numunelerdeki glukozu tespit etmek için faydalı olabileceği belirtilmiştir. Bu nedenle, bu yeni biyosensör, diğer basit ve pratik biyosensörleri geliştirmek için Fe_3O_4 nanopartikülleri kullanılarak klinik olarak önemli diğer antijenlerin tespitine kolayca genişletileceği belirtilmiştir (Yang ve diğerleri, 2009).

Cano ve diğerleri 2007 yılında, glukoz tayini için PVC / TTF-TCNQ kompozit elektrota dayalı basit ve etkili bir amperometrik biyosensör tasarlanmıştır. Glukoz oksidaz enzimi, gluteraldehit ile çapraz bağlama yöntemiyle immobilize edilmiştir. TTF-TCNQ tuzu, başka bir maddenin eklenmesine gerek kalmadan iletken bir faz ve bir redoks aracısı görevi gördüğü belirtilmiştir. Hazırlanan biyosensörün doğrusal aralığı 0,1- 80 mM arasında olup, $8,5 \times 10^{-6}$ M tespit sınırı olduğu belirtilmiştir. Çalışma potansiyeli +0,15 V olarak belirlenmiştir ve pH 7,4' te çalışmalar gerçekleştirilmiştir. $K_m = 9,0 \pm 0,5$ mM olarak hesaplanmıştır ve biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin iyi olduğu belirtilmiştir (Cano ve diğerleri, 2008).

Wang ve diğerlerinin 2009 yılında yaptığı çalışmada glukoz oksidazın altın nanopartiküllerle modifiye edilmiş Pb nanotelleri üzerine immobilizasyonuna dayanan yeni bir glukoz biyosensörü geliştirdiği belirtilmiştir. Pb nanotelleri (Pb nw'ler), bir L-sistein desteği ile sentezlenmiş ve ardından altın nanoparçacıklar, nanotel yüzeyine tutturulmuştur. Elde edilen biyosensörün elektrokimyasal performansını incelemek ve optimize etmek için dönüşümlü voltametri ve kronoamperometri kullanılmıştır. Nanokompozit, glukoz oksidazın immobilizasyonu için mükemmel bir substrat sağlayan geniş aktif yüzey alanını işlemiştir. Biyosensör mükemmel elektrokatalitik aktivite ve glukozu iyi yanıt performansı sergilemiştir. Altın nanopartiküllerle modifiye edilmiş Pb nanotellerin yüksek hassasiyet, düşük tespit limiti ve iyi stabiliteye sahip biyosensörler tasarlamak için çok umut verici bir platform sunduğu belirtilmiştir (Wang ve diğerleri, 2009).

Yola ve diğerleri 2014 yılında yaptıkları çalışmada demir ve altın nanopartiküllerin dekore edildiği grafen oksite dayalı yeni ve hassas bir elektrokimyasal DNA biyosensörü geliştirmişlerdir. Diğer elektrokimyasal DNA biyosensörleriyle karşılaştırıldığında, önerilen biyosensörün basitlik, seçicilik, kararlılık ve yüksek hassasiyet gibi birçok avantajı olduğu

ve geliştirilen DNA biyosensörünün bir dizi gerçek numunenin analizi için kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Yola ve diğerleri, 2014).

Tian ve diğerleri tarafından 2014 yılında yapılan çalışmada H_2O_2 tespiti için elektrokimyasal sensör olarak azot katkılı grafende gümüş nanopartiküllerin yeşil sentezi gerçekleştirilmiştir. Gümüş nanopartiküller katkı maddesi olarak üre indirgeyicisi askorbik asit kullanılmıştır. AgNPs/NG tabanlı sensör, hızlı tepki süresi (<2 sn), geniş doğrusal aralık (0,1-126,4 mM) ve düşük algılama sınırı (1,2 M) sergilemiştir. Ayrıca, önerilen sensör tatmin edici seçicilik, tekrarlanabilirlik ve kararlılık sergilemiştir. Bu sonuçlar, AgNPs/NG modifiye elektrotun, H_2O_2 tespiti için umut verici bir enzimatik olmayan sensör görevi görebileceğini göstermiştir (Tian ve diğerleri, 2014).

3. GEREKÇE VE YÖNTEM

3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan tüm kimyasal maddeler ve temin edildikleri üreticiler Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan tüm kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	Temin Edildiği Üretici Firma
Grafit tozu	Merck
Mineral yağ (nujol)	Sigma
Glukoz (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Sigma-Aldrich
Monosodyum dihidrojen fosfat (NaH ₂ PO ₄)	Merck
Disodyum hidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Glisin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Sigma
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck
Asetik asit (CH ₃ COOH)	Merck
Glutaraldehit (C ₅ H ₈ O ₂)	Aldrich
Sığır serum albümin (BSA)	Sigma
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich
Üre	Sigma
Ürik Asit (C ₅ H ₄ N ₄ O ₃)	Sigma
Askorbik Asit (C ₆ H ₈ O ₆)	Sigma

3.2. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler

Glukoz çözeltisi: Glukoz katısından belirli miktar tartıldı ve tampon çözeltide çözülerek glukoz çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözelti kullanılmadığı durumlarda buzdolabında +4 °C'de tutuldu.

Enzim çözeltisi: 100 ünite toplam aktiviteye sahip olan glukoz oksidaz enzimi alındı. Saf suda çözülmesinden sonra 10 mL'ye hacim ölçülü balonda tamamlandı (10 ünite/mL). Deneylerde kullanılacak olan hazırlanan enzim çözeltisi buzdolabına koyuldu. Uzun süre kullanılmadığı durumlarda ise çözelti derin dondurucuda tutuldu.

Glisin tamponu: 9,0 pH değeri olan tampon çözelti hazırlamak için glisin belirli bir miktar tartıldı ve saf suda çözüldü. Hazırlanan tampon çözeltinin pH'ı, 0,1 M NaOH ile ayarlandı. Tampon çözeltiler kullanılmadığı durumlarda buzdolabında +4 °C'de tutuldu.

Fosfat tamponu: 6,0; 7,0; 8,0 pH değeri olan 0,1 M fosfat tamponu çözeltileri hazırlamak amacıyla monosodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) ile disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) belirli bir miktar tartıldı ve saf suda çözüldü. Hazırlanan tampon çözeltilerin pH'ı 0,1 M NaOH ile ayarlandı. Tampon çözeltiler kullanılmadığı durumlarda buzdolabında +4 °C'de tutuldu.

Glutaraldehit çözeltisi: %5,0'lik glutaraldehit çözeltisi, %25'lik glutaraldehit çözeltisinden seyreltildi. Sonrasında %2,5'luk glutaraldehit çözeltisi %5,0'lik glutaraldehit çözeltisinden seyreltilerek hazırlandı, çözelti +4 °C'de buzdolabında tutuldu.

Asetik asit - asetat tamponu: pH'ı 5,0 olan tampon çözelti hazırlamak için sodyum asetat belirli bir miktar tartıldı ve saf suda çözüldü. Hazırlanan tampon çözeltinin pH'ı, 1 M CH_3COOH ile ayarlandı. Tampon çözeltiler kullanılmadığı durumlarda buzdolabında +4 °C'de tutuldu.

Sodyum hidroksit çözeltisi: Katı sodyum hidroksitten belirli bir miktar tartıldı ve saf suda çözülerek derişimi 0,1 M olarak ayarlandı.

Askorbik asit çözeltisi: Askorbik asit katısından belirli bir miktar tartıldı ve tampon çözeltide çözülerek askorbik asit çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözelti kullanılmadığı durumlarda buzdolabında +4 °C'de tutuldu.

Ürik asit çözeltisi: Ürik asit katısından belirli bir miktarda tartıldı ve tampon çözeltide çözülerek askorbik asit çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözelti kullanılmadığı durumlarda buzdolabında +4 °C'de tutuldu.

Gümüş Nitrat çözeltisi: 0,1 M derişimde gümüş nitrat çözeltisi hazırlamak için katı gümüş nitrattan belirli bir miktar tartıldı ve saf suda çözüldü. Hazırlanan çözelti kullanılmadığı durumlarda buzdolabında +4 °C'de tutuldu.

3.3. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

3.3.1. Elektrokimyasal analiz cihazı

Elektrokimyasal deneylerin tümü bilgisayar bağlantısı ile çalışan CHI firmasının 1230-A modeli elektrokimyasal analiz cihazı kullanılarak yapıldı.

3.3.2. Hücre ve elektrotlar

Deneyler esnasındaki tüm amperometrik ölçümler, üç elektrotlu elektrokimyasal bir hücrede gerçekleştirildi. Çalışma elektrodu 0,3 cm çapındaki (malzemesi teflon olan ve özel olarak hazırlanan) karbon pasta elektrot (Şekil 3.1), referans elektrot BAS RE-5B kodlu Ag/AgCl ve karşıt elektrot ise MW-1032 kodlu platin tel elektrottur. Çalışma elektrodu kullanılmadığında durumlarda, çalışmanın gerektirdiği şekilde saf suda veya tampon çözeltide buzdolabında +4 °C’de tutuldu.



Şekil 3.1. Malzemesi teflon olan ve özel olarak hazırlanan karbon pasta elektrot

3.3.3. Su banyosu

Grant GD120 marka termostatlı su banyosu ısıtma, soğutma ve su döngüsü gereken çalışmalarda kullanıldı.

3.3.4. pH metre

Hazırlanan çözeltilerin pH'ı, HANNA HI-8424 pH metre ile ölçüldü.

3.3.5. Mikro pipet

2,0 µL – 1000,0 µL çözeltilerin hazırlanmasında ve çözeltilerin hücreye eklenmesinde Brand marka $\pm 0,05$ µL hassasiyeti olan mikro pipetler kullanıldı.

3.3.6. Saf su cihazı

GFL marka saf su cihazından elde edilen saf su ile tüm deneylerde kullanılan çözeltiler hazırlanıp kullanıldı.

3.3.7. SEM cihazı

ZEISS/Supra 40 VP markalı cihaz kullanıldı. Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Merkezi Araştırma laboratuvarı uygulama ve araştırma merkezi (BARUM) hizmet alımı yapıldı.

3.3.8. FTIR cihazı

Thermo Fisher markalı cihaz kullanıldı.

3.3.9. Hassas terazi

Tüm ağırlık tartımları Radwag markalı WAA 200/C/2 kodlu terazi ile gerçekleştirildi.

3.3.10. UV-VIS spektroskopi cihazı

Absorbans ölçümleri Hach marka DR/4000U model cihaz ile yapıldı.

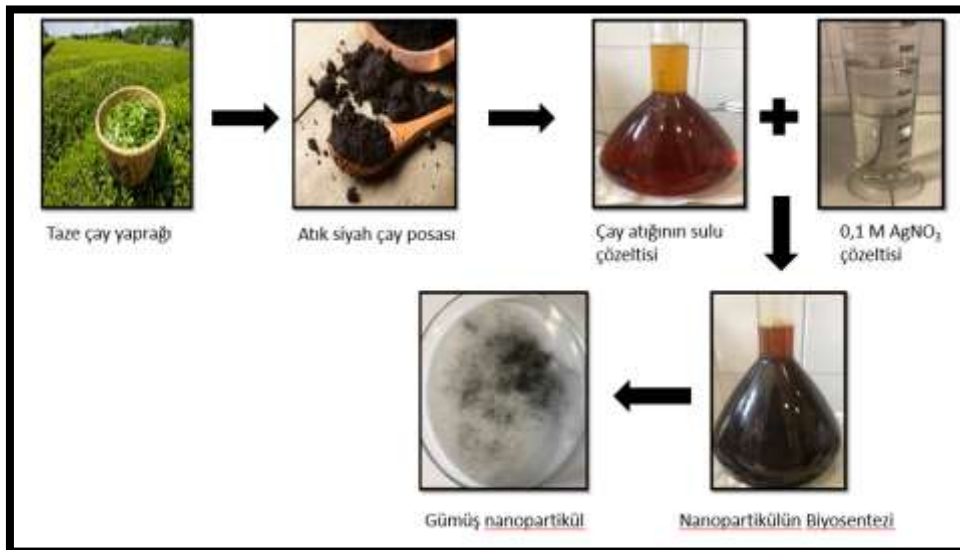
3.4 Nanopartikül Sentezi

3.4.1. Çay ekstraktının hazırlanması

Bu çalışmada marketten temin edilen siyah çay kullanılmıştır. Siyah çay atığı oluşturabilmek için öncelikle oda sıcaklığında kaynamış su ile demleme yapıldı. Demleme sonrası kalan çay süzülerek çay posası elde edildi. Elde edilen çay posası ile çalışmaya devam edildi.

3.4.2. AgNP'nin yeşil sentezi

AgNP sentezi için siyah çay atığı özütü ile gümüş nitrat (AgNO_3) çözeltisi kullanıldı. 100 gram çay 2 litre su ile 20 dakika demlendi. 20 dakika sonunda çay süzüldü ve kalan çay posası ile çalışmaya devam edildi. Kalan posa, 300 mL saf su ile 4 defa ekstraksiyon yapıldı. Whatman No 1 filtre kağıdı ile süzüldü ve buzdolabında saklanarak deneylerde kullanılmak üzere hazır hale getirildi. Buzdolabından alınan bitki özütünden 1 litre alındı. Daha sonra çözeltiliye AgNO_3 çözeltisi eklenerek $40\text{ }^\circ\text{C}$ ' de 40 dakika boyunca karıştırıldı. Sürenin sonunda birlikte çözelti renginin koyulaştığı gözlemlendi. Hazırlanan nanopartiküllü karışım 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası karışım safsızlıklardan arındırılmak amacıyla saf su ile 2 kez yıkanarak aynı işlem tekrarlandı ve süzüntü atılıp elde edilen nanopartikül çökeltisi saat camı üzerine alınarak kurumaya bırakıldı. Bu sayede gümüş nanopartiküller yeşil sentez yöntemi ile elde edildi.



Şekil 3.2. Siyah çay atığı özütü kullanılarak AgNP sentezi

3.4.3. Nanopartiküllerin karakterizasyonu

İndirgeyici ajan olarak siyah çay atığı özütü kullanılarak, yeşil sentez yöntemi ile sentezlenen gümüş nanopartiküllerin sentezi gerçekleştirildi. Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FT- IR) ile bu gümüş nanopartiküllerin fonksiyonel grupları hakkında bilgi edinildi. Gümüş nanopartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM-Scanning Electron Microscope) ile SEM görüntüleri alındı ve nanopartiküllerin boyutları belirlendi. Gümüş nanopartiküllerinin UV-Vis spektrumu alınarak absorbanans ölçümü yapıldı.

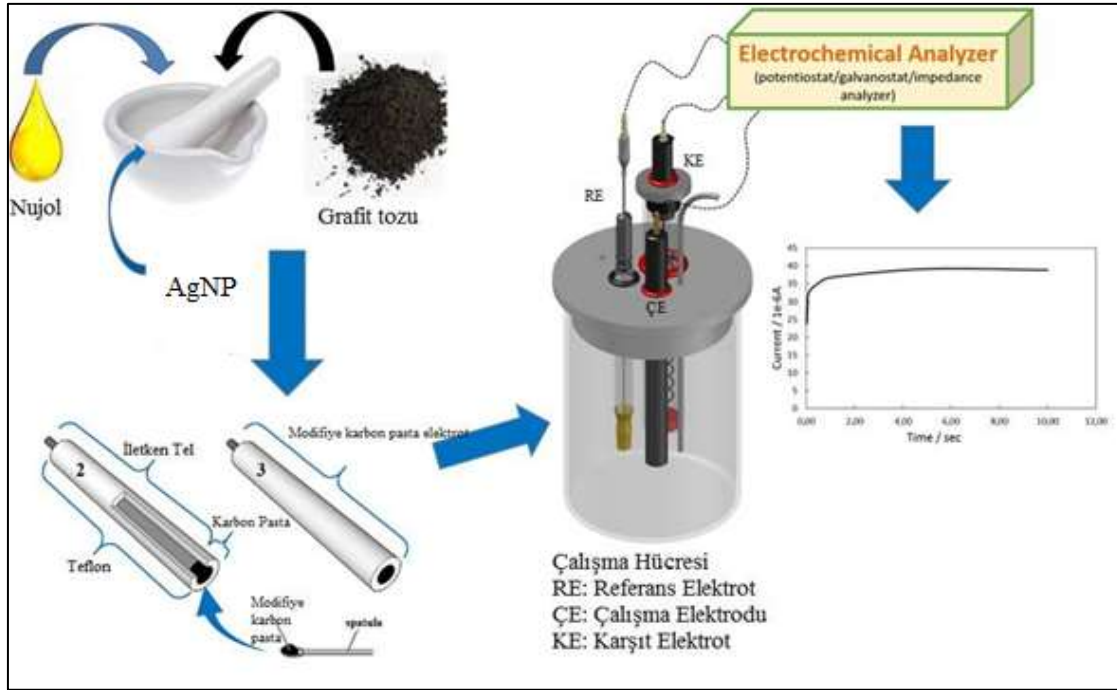
3.5. Glukoz Biyosensörünün Hazırlanması ve En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

Hazırlanan biyosensörün; glukoz duyarlılığı, çalışma potansiyeli, kullanılan AgNP miktarı, sıcaklık etkisi, pH etkisi, girişim etkisi, glukoz derişiminin etkisi, glutaraldehit miktarı, raf ömrü ve tekrar kullanılabilirlik değişkenleri incelenerek en iyi çalışma koşulları belirlendi.

3.5.1. Çalışma elektrodunun hazırlanması: Karbon pasta elektrot (CPE) ve modifiye karbon pasta elektrot (MCPE) hazırlanması

Karbon pasta elektrot hazırlamak için belirli bir miktar grafit tozu, hassas terazide tartılıp saat camı üzerine koyuldu. Grafit tozunun üstüne birleştirme özelliği olan mineral yağ (nujol) mikro pipet ile damlatılarak belirli bir miktar eklendi. Grafit tozu ile nujol belirli bir kıvam alana kadar karıştırıldı. Hazırlanan bu karışım daha önce saf su ile temizlenip kurutulmuş olan karbon pasta elektrot içindeki boşluğa hiç madde kaybı olmayacak biçimde dolduruldu. Doldurma işlemi tamamlandıktan sonra karbon pasta elektrodun yüzeyi özel bir ped yardımıyla pürüzsüz ve düz duruma getirildi. Sonrasında CPE saf su ile yıkandı ve kullanım için hazır hale getirildi. Yapılan bütün çalışmalarda CPE'ler, grafit tozu miktarı (0,280 g) sabit ve nujol miktarı 170 µL olacak şekilde hazırlandı.

Modifiye karbon pasta elektrot; CPE'nin hazırlanmasından farklı olarak, grafit ve nujol ile hazırlanan karbon pastaya belirli bir miktar AgNP eklenerek karıştırılması ve elektroda boşluksuz doldurulması ile hazırlandı. MCPE bütün deneyler için bu şekilde hazırlandı.



Şekil 3.3. MCPE hazırlanması ve çalışma hücresi şeması (Akbıyık, 2022)

3.5.2. Karbon pasta elektrodun sabit akıma getirilmesi

Elektrokimyasal hücreye pH değeri 7,0 olan 0,1 M fosfat tamponundan 9 mL ve 1,0 M NaCl destek elektrolit çözeltisinden 1 mL koyuldu. Hücreye çalışma elektrodu (MCPE), referans (Ag/AgCl) ve karşıt (Pt tel) elektrot yerleştirildi. Çalışılacak belirli bir potansiyelde akım sabitlenene kadar elektrot bekletildi. Bu sabitlenen akım değeri, denge akımı olarak kaydedildi. CPE, bütün deneylerde bu şekilde sabit akıma getirildi.

3.5.3. CPE ve MCPE'nin Hidrojen Peroksit'e karşı duyarlılığı

H₂O₂'in hücrede oluşturduğu anodik akımların kaydedilmesi ile karbon pasta elektrot ile modifiye karbon pasta elektrot karşılaştırıldı. Elektrokimyasal hücreye pH değeri 7,0 olan 0,1 M fosfat tamponundan 9 mL ve 1,0 M NaCl destek elektrolit çözeltisinden 1 mL koyuldu. Çalışılan belirli bir potansiyelde, CPE ve MCPE'nin sabit akıma getirilmesinden sonra denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresindeki H₂O₂'in derişimi $1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M aralığında olacak şekilde hücreye eklemeler yapıldı. Her ekleme sonrası çözelti 5 dk boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. 200 s sonra ölçülen akım değerleri kaydedildi. Artan derişimlerde yapılan H₂O₂ ilavelerine karşı, artan akım farkları grafiğe geçirildi.

3.5.4. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi

MCPE'nin en iyi çalışma potansiyelinin belirlenmesi amacıyla, +0,1 V - +0,7 V aralığında çalışma potansiyellerinde çalışmalar yapıldı ve akımlar kaydedildi. Elektrokimyasal hücreye pH değeri 7,0 olan 0,1 M fosfat tamponundan 9 mL ve 1,0 M NaCl destek elektrolit çözeltisinden 1 mL koyuldu. Çalışılan belirli bir potansiyelde, MCPE'nin sabit akıma getirilmesinden sonra denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresindeki H_2O_2 'in derişimi $1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M aralığında olacak şekilde hücreye eklemeler yapıldı. Her eklemede çözelti 5 dk boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. 200 s sonra ölçülen akım değerleri kaydedildi. Artan derişimlerde yapılan H_2O_2 ilavelerine karşı, artan akım farkları grafiğe geçirildi. Bu işlemler sırasıyla çalışılan bütün potansiyeller için tekrarlandı.

3.5.5. MCPE'nin Hidrojen Peroksit duyarlılığına AgNP miktarının etkisi

Modifiye karbon pasta elektrodun hazırlanması için oluşturulan karbon pasta içerisine, karbon pasta elektrodun iç hacmine göre literatürde yer alan örneklerin nanopartikül miktarları ile oranlanarak bulunan miktar olan 18 mg, 28 mg ve 38 mg AgNP ilave edildi ve çalışma elektrotları hazırlandı. Elektrokimyasal hücreye pH değeri 7,0 olan 0,1 M fosfat tamponundan 9 mL ve 1,0 M NaCl destek elektrolit çözeltisinden 1 mL koyuldu. MCPE, +0,4 V potansiyelde sabit akıma getirildi ve sonrasında denge akımı kaydedildi. Sonrasında hücreye artan derişimlerde ($1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M) H_2O_2 eklendi. Her eklemeden sonra çözelti 5 dk boyunca karıştırıldı ve 200 s sonra akım değeri ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen akım değerleri denge akımından çıkarılarak akım farkı değerleri (Δi) hesaplandı. Çalışma hücresine eklenen H_2O_2 derişimine karşı akım farkı (Δi) grafiğe geçirildi. Grafik yorumlanarak en uygun AgNP miktarı tespit edildi.

3.5.6. Enzimin MCPE'ye immobilizasyonu

Çapraz bağlama yöntemi ile MCPE'ye glukoz oksidaz enzimi immobilize edildi. 2,0 mg BSA (sığıır serum albumin), 50,0 μ L tampon çözelti, 50,0 μ L glukoz oksidaz ve 30,0 μ L gluteraldehitten (% 2,5) oluşan bir karışım hazırlandı. Bu karışım, hazırlanan modifiye karbon pasta elektrodun yüzeyinin her yerine eşit miktarlarda olacak şekilde damlatıldı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Kuruyan enzim elektrot, yüzeye tutunamayan enzimin elektrottan uzaklaşması için önce saf su sonrasında tampon çözelti ile yıkandı.

Kullanılmadığı durumlarda tampon çözelti içinde +4 °C' de buzdolabında tutuldu. Enzim elektrot her deney aşamasında bu şekilde hazırlandı.

3.5.7. Gluteraldehit miktarının etkisi

Çapraz bağlama için kullanılan gluteraldehit miktarının enzim immobilizasyonunda etkisi incelendi. Bu amaçla karışım içine hacimce % 2,5'luk 20,0 µL, 30,0 µL ve 40,0 µL gluteraldehit eklenmesiyle enzim elektrotlar hazırlandı. Hazırlanan enzim elektrotlar, +0,4 V potansiyelde sabit akıma getirildi ve denge akımı kaydedildi. Sonrasında hücreye artan derişimlerde ($1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M) glukoz çözeltileri eklendi. Yapılan her eklemeden sonra çözelti 5 dk boyunca karıştırıldı. 200 s sonra akım değeri ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen akım değerleri denge akımından çıkarılarak akım farkı değerleri (Δi) hesaplandı. Çalışma hücresine eklenen glukoz derişimine karşı akım farkı (Δi) grafiğe geçirildi. Grafik yorumlanarak en uygun gluteraldehit miktarı tespit edildi.

3.5.8. Enzim elektrodun en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi

pH etkisi

Hazırlanan biyosensörün cevap akımına pH etkisi incelendi. Bu amaçla pH değeri 5,0 olan asetik asit-sodyum asetat tamponu; pH değeri 6,0; 7,0; 8,0 olan fosfat tamponu (NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4) ve pH değeri 9,0 olan glisin tamponu çözeltileri hazırlandı. Hücre içindeki derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olan glukoz çözeltileri, hazırlanan tampon çözeltiler ile aynı pH değerlerinde hazırlandı. Elektrot, +0,4 V potansiyelde sabit akıma getirildi ve denge akımı kaydedildi. Sonrasında hücreye $1,0 \times 10^{-4}$ M glukoz eklendi. Eklemeden sonra çözelti 5 dk boyunca karıştırıldı ve 200 s sonra akım değeri ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen akım değeri denge akımından çıkarılarak akım farkı değeri (Δi) hesaplandı. Grafik yorumlanarak her tampon çözeltisi için kaydedilen akım değerleri karşılaştırıldı. En uygun pH değeri sonraki deney çalışmalarında da kullanıldı.

Sıcaklık etkisi

Hazırlanan biyosensörün cevap akımına sıcaklığın etkisi incelendi. Elektrokimyasal hücreye pH değeri 7,0 olan 0,1 M fosfat tamponundan 9 mL ve 1,0 M NaCl destek elektrolit

çözeltisinden 1 mL koyuldu. Elektrot, +0,4 V potansiyelde sabit akıma getirildi ve denge akımları kaydedildi. Dolaşımli termostatlı su banyosu kullanılması ile hücre içindeki çözeltinin sıcaklığı 20 °C'ye ayarlandı. Sonrasında hücreye $1,0 \times 10^{-4}$ M glukoz eklendi. Eklemeden sonra çözelti 5 dk boyunca karıştırıldı ve 200 s sonra akım değeri ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen akım değeri, denge akımından çıkarılarak akım farkı değeri (Δi) hesaplandı ve grafiğe geçirildi. Bu işlem 30, 40, 50, 60 ve 70 °C için de tekrarlandı. Grafik yorumlanarak immobilize elektrodun en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık değeri bulunsa da sonraki deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Substrat derişimi etkisi

Hazırlanan biyosensörün cevap akımına substrat derişimi etkisi incelendi. Elektrokimyasal hücreye pH değeri 7,0 olan 0,1 M fosfat tamponundan 9 mL ve 1,0 M NaCl destek elektrolit çözeltisinden 1 mL koyuldu. Elektrot, +0,4 V potansiyelde sabit akıma getirildi ve denge akımları kaydedildi. Sonrasında hücre içerisine $1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M derişim aralığında olan glukoz çözeltileri eklendi. Her eklemeden sonra çözelti 5 dk boyunca karıştırıldı ve 200 s sonra akım değeri ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen akım değeri, denge akımından çıkarılarak akım farkı değeri (Δi) hesaplandı ve grafiğe geçirildi (Michaelis-Menten eğrisi). Bu grafikten faydalanılarak biyosensörün kantitatif amaçla glukoz tayini için kullanılabilirlik çalışma aralığı belirlendi. Lineweaver-Burk grafiği, enzimler için spesifik olan K_m ve V_{max} 'ı belirleyebilmek için çizildi.

Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi

Tekrarlanabilirlik için; elektrokimyasal hücreye pH değeri 7,0 olan 0,1 M fosfat tamponundan 9 mL ve 1,0 M NaCl destek elektrolit çözeltisinden 1 mL koyuldu. Elektrot, +0,4 V potansiyelde sabit akıma getirildi ve denge akımları kaydedildi. Sonrasında hücre içerisine $1,0 \times 10^{-6}$ M glukoz eklendi. Eklemeden sonra çözelti 5 dk boyunca karıştırıldı ve 200 s sonra akım değeri ölçüldü ve kaydedildi. Arka arkaya ölçümler alındı. Kaydedilen her akım değeri denge akımından çıkarılarak akım farkları değeri (Δi) hesaplandı ve ölçüm sayısına karşı grafiğe geçirildi. Sonuçların bağıl standart sapması (RDS) hesaplandı.

Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi

Hazırlanan biyosensörün raf ömrünün tayini için, elektrokimyasal hücre içerisine pH değeri 7,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tamponu ve 1,0 M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi koyuldu. Elektrot, +0,4 V potansiyelde sabit akıma getirildi ve denge akımları kaydedildi. Sonrasında belirlenen günlerde hücreye $1,0 \times 10^{-6}$ M glukoz eklendi. Eklemeden sonra çözelti 5 dk boyunca karıştırıldı ve 200 s sonra akım değeri ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen her akım değeri denge akımından çıkarılarak akım farkları değeri (Δi) hesaplandı. Ölçümler 1.;3.;10.;15.;20.; ve 30. günlerde tekrarlandı. Raf ömrü süresine karşı akım farkları grafiğe geçirildi. Grafik yorumlanarak akım değişimleri yardımıyla aktivitedeki azalma hesaplandı.

3.5.9. Biyosensör üzerine girişim yapan türlerin etkisinin incelenmesi

Hazırlanan biyosensör üzerine kan serumunda yer alan, girişim etkisi bulunan bazı türlerin glukoz tayini üzerine etkisi incelendi. Bu türler ve derişimleri; ürik asit ($3,0 \times 10^{-4}$ M), üre ($2,5 \times 10^{-3}$ M) ve askorbik asit ($1,0 \times 10^{-4}$ M) olarak sıralanabilir. Glukoz derişimi 10^{-6} M'da sabit tutuldu. Elektrot, +0,4 V'da sabit akıma getirilerek ve denge akımı kaydedildi, daha sonra hücre içindeki derişimi $1,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde glukoz çözeltisinden eklenerek cevap akımı kaydedildi. Sonrasında girişimi incelenen türün belirtilen derişimdeki çözeltileri ve 10 kat seyreltme olacak şekilde hazırlanan çözeltileri hücreye ilave yapıp tekrar bir cevap akımları okundu. Oluşan cevap akımı, hücredeki glukoz ve çalışılan derişimdeki girişimi incelenen türün oluşturduğu cevap akımlarının toplamıdır. Çalışılan türe karşılık gelen cevap akımı, toplam cevap akımı değerinden glukoz karşılık gelen cevap akımı değerinin çıkarılması ile elde edildi. Hesaplanan ve ayrıştırılan cevap akımları ile girişimi incelenen türlerin yüzde olarak ne kadar girişim yaptığı hesaplandı.

3.5.10. Gerçek numunede glukoz tayini

Hazırlanan biyosensörün gerçek bir numuneye uygulanabilirliğini belirlenmek amacıyla hem sentetik kan serumunda hem de meyve suyunda test edildi.

Meyve suyunda glukoz tayini LC/MS ve GC/MS yöntemleri ile gerçekleştirildi. İçindeki glukoz miktarı bilinen meyve suyu örneği referans olarak alındı. Öncelikle hücre içerisine pH değeri 7 olan 9 mL fosfat tamponu ve 0,1 M 1 mL NaCl eklendi. Hazırlanan biyosensör

25 °C’de, +0,4 V potansiyelde sabit akıma getirildi ve dengeye geldikten sonra denge akımı kaydedildi. Hücre içi glukoz derişimi $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M arasına denk gelen, doğrusal çalışma aralığında olan 4 farklı derişimde glukoz çözeltisi eklendi ve kalibrasyon grafiğı çizildi. Meyve suyu örneğı ise kalibrasyon aralığına girebilmesi için 5×10^{-6} kat seyreltme yapılarak hücre içerisine eklendi. Akım değışimi ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen bu akımdan denge akımı çıkarılarak akım farkı (Δi) hesaplandı. Söz konusu işlem 3 kez tekrarlandı. Yapılan bu işlemler sonucunda kalibrasyon grafiğinden glukoz derişimi hesaplandı.

Serumda bulunan girişim yapan çeşitli türlerin Bölüm 3.5.’te belirtilen derişimlerini içeren sentetik kan çözeltisi hazırlandı. Öncelikle hücre içerisine pH değeri 7 olan 9 mL fosfat tamponu ve 0,1 M 1 mL NaCl eklendi. Hücre içerisindeki glukoz derişimi $1,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde hücre içerisine ilave edildi. Hazırlanan biyosensör 25 °C’de, +0,4 V potansiyelde sabit akıma getirildi ve dengeye geldikten sonra denge akımı kaydedildi. Çalışma hücre içerisinde, 10 kat seyreltme olacak biçimde sentetik kan numunesinden ilave edilerek akım değışimi ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen akımdan denge akımı çıkarılarak akım farkı (Δi) hesaplandı. Söz konusu işlem 3 kez tekrarlandı ve kalibrasyon grafiğı çizildi. Grafikten yararlanılarak glukoz derişimi hesaplandı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

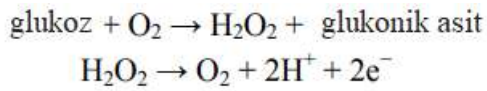
Çizelge 4.1. Çalışma sonuçlarının literatür ile karşılaştırılması

Taşıyıcı	Glukoz tayini metodu	İmmobilizasyon tekniği	Doğrusal aralık	Tayin sınırı	Km	Opt. pH	Opt. sıcaklık	Raf ömrü	Referans
Nafion	Amperometrik (+0,84 V)	Birden fazla teknik	0,02-15,0 mM	2,9 µM	-	-	-	-	Izadyar ve diğerleri, 2022)
Slika/lignin, Tek duvarlı nanotüpler	Voltametri, kronoamperometri (+0,3 V)	Adsorpsiyon	0,5-9mM	145 µM	62 mM (6,2x10 µM)	7,0	25 °C	15 gün %82 21 gün %73	Jedrzak ve diğerleri, 2018)
Poli(1,10-fenantenren-5,6-dion), poli(pirrol-2-karboksilik asit), altın nanopartiküller	Amperometrik (+0,2 V)	Kovalent bağlama	0,2-150,0 mM	0,08Mm (80 µM)	-	4,0-9,0	-	14 gün %96	Kausaite ve diğerleri, 2020
Politiramin tabakası	Amperometrik -0,10 V	Çapraz bağlama	1,0µM-1,0 mM	1,0 mM (1x10 ³ µM)	0,21mM (210 µM)	6,0-8,0	-	% 99, 3 hafta %84, 4 hafta	Khumngem ve diğerleri, 2021
Gümüş nanopartiküller ve kitosan	Amperometrik ve siklik voltametri (-0,15V)	Birden fazla teknik	10 µM-15mM	0,6977 µM	-	6,0-8,5	25 °C	9 gün % 93 15gün %70	Yang ve diğerleri, 2014
PVC/TTF/TCNQ	Amperometri (+0,15 V)	Çapraz bağlama	0,1-8,0mM	8,5x10-6M (8,5 µM)	9,0 mM (9000 µM)	7,4	25 ° C	10 gün %72	Cano ve diğerleri, 2008
Polianilin, nafion, grafen oksit	Amperometrik (+0,3 V)	Birden fazla teknik	0,5-50mM	-	12,0 mM (1,2x10 ⁻⁴ µM)	6,0	-	-	Popov ve diğerleri, 2022
Gümüş nanoteller ve kitosan	Amperometrik ve siklik voltametri (-0,15V)	Birden fazla teknik	10 µM - 0,8 mM	2.83 µM	-	7,5	-	10 gün % 83	Wang ve diğerleri, 2013
Gümüş nanopartiküller	Amperometrik (+0,4 V)	Çapraz bağlama	0.1-2.5 mM	-	-	-	-	-	Ren ve diğerleri, 2004
Bambu iç kabuk membranı	Spektrofotometrik	Çapraz bağlama	0,0-0,6 mM	58 µM	-	7,0	34,8	8 ay % 95	Yang ve diğerleri, 2006
Yumurta kabuğu zarı	Spektrofotometrik	Çapraz bağlama	0,01- 1,3 mM	-	-	3,0-8,0	45	4 ay % 85,2	Wu ve diğerleri, 2004
polypyrrole-polyvinyl sulphonate (Ppy-PVS) kompozit film	Amperometrik (+ 0,7 V)	Çapraz bağlama	-	-	6,25 mM (6,25x10 ⁻³ µM)	7,0	-	-	Gade ve diğerleri, 2006
poly(o-phenylenediamine), Prusya mavisi, Altın nanopartikül	Amperometrik -0,05 V	Çapraz bağlama	0,005-10 mM	8 µM	19,6 mM	7,0	-	30 gün % 88	Deng ve diğerleri, 2006
Gümüş nanopartikül modifiye edilmiş karbon pasta elektrot	Amperometrik (+0,4 V)	Çapraz bağlama	1,0x10 ⁻⁷ - 1,0x10 ⁻⁶ mM	0,016 µM	0,0129 µM	7,0	50	30 gün % 35	Bu çalışma

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçların literatür verileriyle karşılaştırılması çizelge 4.1.'de verilmiştir. Deneysel çalışmalar ile yeşil sentez yöntemiyle atık siyah çay posasından gümüş nanopartiküller sentezlendi ve bu partiküller glukoz biyosensörü tasarımında

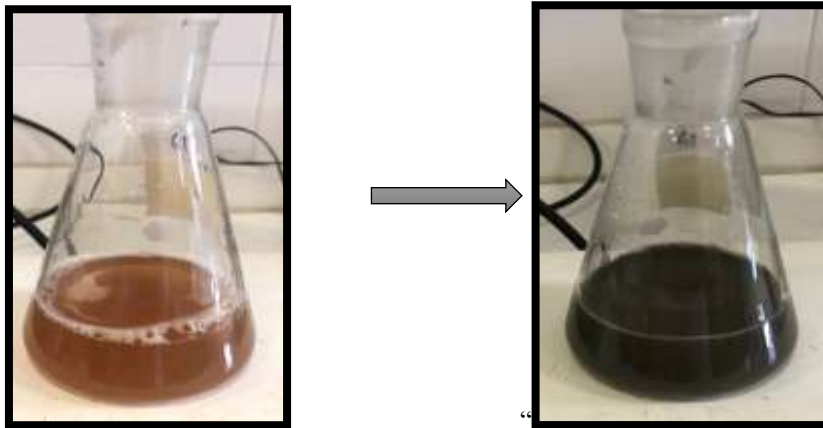
kullanıldı. Bu amaçla öncelikle, karbon pasta elektrot, gümüş nanopartikül (AgNP) ile modifiye edildi. Sonra bu elektrot; glukoz oksidaz enzimi, BSA ve glutaraldehit ile immobilizasyon işlemi çapraz bağlama yöntemi ile yapıldı.

Oksijen varlığında glukozun, glukoz oksidaz ile temas etmesiyle glukonik asit ve hidrojen peroksit oluşmaktadır. Söz konusu enzimatik reaksiyon sonucunda meydana gelen hidrojen peroksit, elektrot yüzeyinde sabit bir potansiyelde yükseltgenmektedir. Hidrojen peroksidin anodik akımındaki artış glukoz derişimiyle orantılıdır.



4.1. Ag Nanopartikülün Yeşil Sentez Sonuçları

Biyolojik kaynak olarak siyah çay özütü kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle gümüş nanopartiküller sentezlenmiştir. Söz konusu nanopartiküllerin oluşumu renk değişimi ile gözlenmiştir. Başlangıçta sarı – turuncu olan siyah çay atığı özütü ile 0,1 M AgNO₃ karışımının rengi, sentez bitiminde koyu kahverengiye dönüşmüştür. Bu işlemde gözlemlenen renk değişimi nanopartikül oluşumunu göstermektedir.

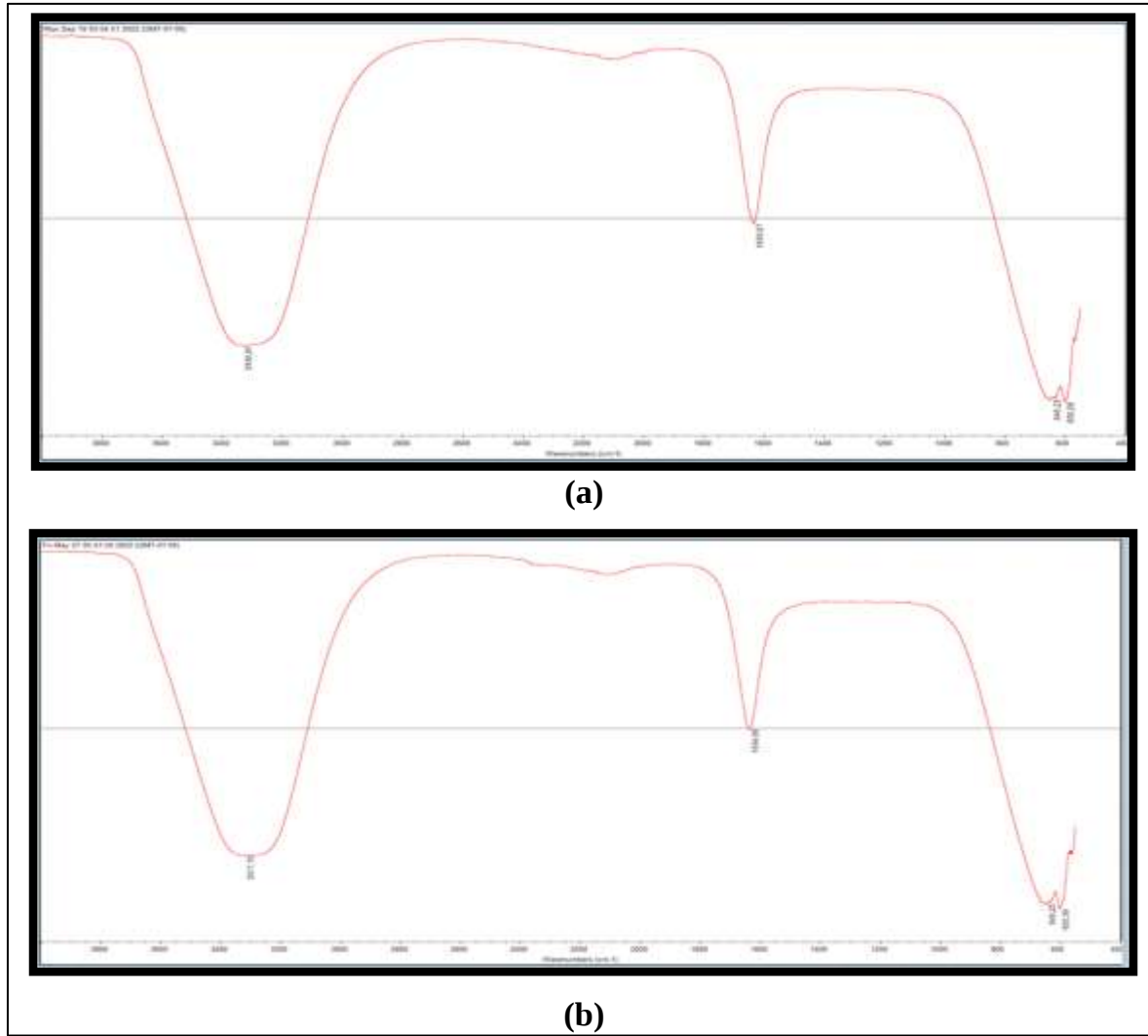


Şekil 4.1. AgNP'nin renk dönüşümü

4.2. Gümüş Nanopartikülün Karakterizasyonu

4.2.1. Ag nanopartikülünün FT-IR karakterizasyonu

Siyah çay atığı özütü kullanılarak sentezlenen Ag nanopartiküllerine ve siyah çay atığı özütüne ait FT-IR spektrumu Şekil 4.2.'de sunulmuştur. Gerçekleştirilen FT-IR analizi sonucunda AgNP'lerin sentezinde kullanılan atık çay özütünde bulunan ve gümüş nanopartiküllerin indirgenmesinden sorumlu olan fonksiyonel grupların varlığı gösterilmiştir. Atık çay özütünde $3330,81\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlenen bant, sentezlenen AgNP'lerde $3317,70\text{ cm}^{-1}$ değerine kaymaktadır. Bu hafif yayvan bant sentezde kullanılan bitki ekstraktından kaynaklı alkol ve fenollerdeki -OH grupları arasındaki moleküllerarası hidrojen bağının varlığını ifade etmektedir. Çay özütünde $1633,87\text{ cm}^{-1}$ 'den AgNP'de $1634,08\text{ cm}^{-1}$ 'ye kayan bant -CO karbonil grubunun -NH amid bağlantısına bağlı gerdirmeye modlarından kaynaklanmaktadır. Ayrıca fenolik ve flavonoid bileşikler de bu dalga boyunda güçlü titreşim gösterir (Jabbar ve diğerleri, 2020). 600 nm'deki pikin ise alkil halojenürlere C-Cl germe titreşimlerine karşılık gelmektedir (Sadeghi ve Gholamhoseinpoor, 2015). Ayrıca elde edilen bu sonuçlar literatürdeki diğer Ag nanopartikül sentezi yapılan çalışmalar ile uyumludur (Geoprincy ve diğerleri, 2013). Siyah çay atığı özütü ile gümüş nanopartikül içeren çay özütü numune spektrumları arasında absorpsiyon bantlarında küçük değişiklikler ortaya çıkarır, $\pm 1-10\text{ cm}^{-1}$ arasında kaymaya neden olur. Bu karşılaştırmaya göre nanopartiküllerin bitki özütü ile sentezinin aminler, alkoller, ketonlar, aldehitler ve karboksilik asitler gibi bazı metabolit fonksiyonel grupları tarafından yapıldığını göstermektedir (Sadeghi ve Gholamhoseinpoor, 2015).



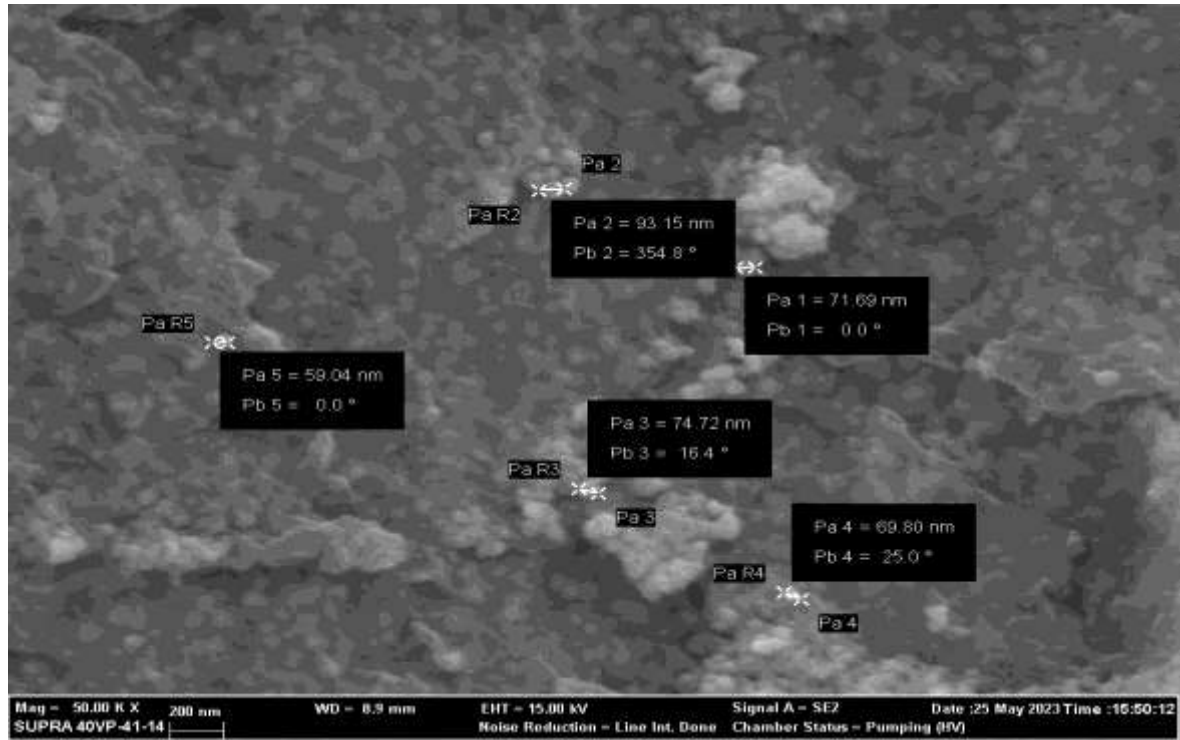
Şekil 4.2. a) AgNP'lere ait FTIR spektrumları b) Çayın sulu ektresine ait FTIR spektrumları c) a ve b şekillerindeki pik tablosu

4.2.2. Ag nanopartikülünün SEM karakterizasyonu

Siyah çay atığı özütü kullanılarak sentezlenen Ag nanopartiküllerine ait Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüsü Şekil 4.3.'te sunulmuştur. Gerçekleştirilen SEM analizi ile gümüş nanopartiküllerin morfolojisi ve boyut ayrıntıları hakkında bilgi edinildi. Genel

olarak yuvarlak şekilli nanopartiküller görüldü. Gümüş nanopartiküllerin boyutu yaklaşık 59-93 nm arasında gözlenmiştir.

Saranyaadevi ve diğerlerinin *Capparis zeylanica* yaprak özütü kullanarak gümüş nanopartikülü sentezledikleri çalışmada, gümüş nanopartikülün SEM analizine küresel ve nispeten düzgün şekilli görülen nanopartiküller 50-90 nm arasında görülmüştür (Saranyaadevi ve diğerleri, 2014).



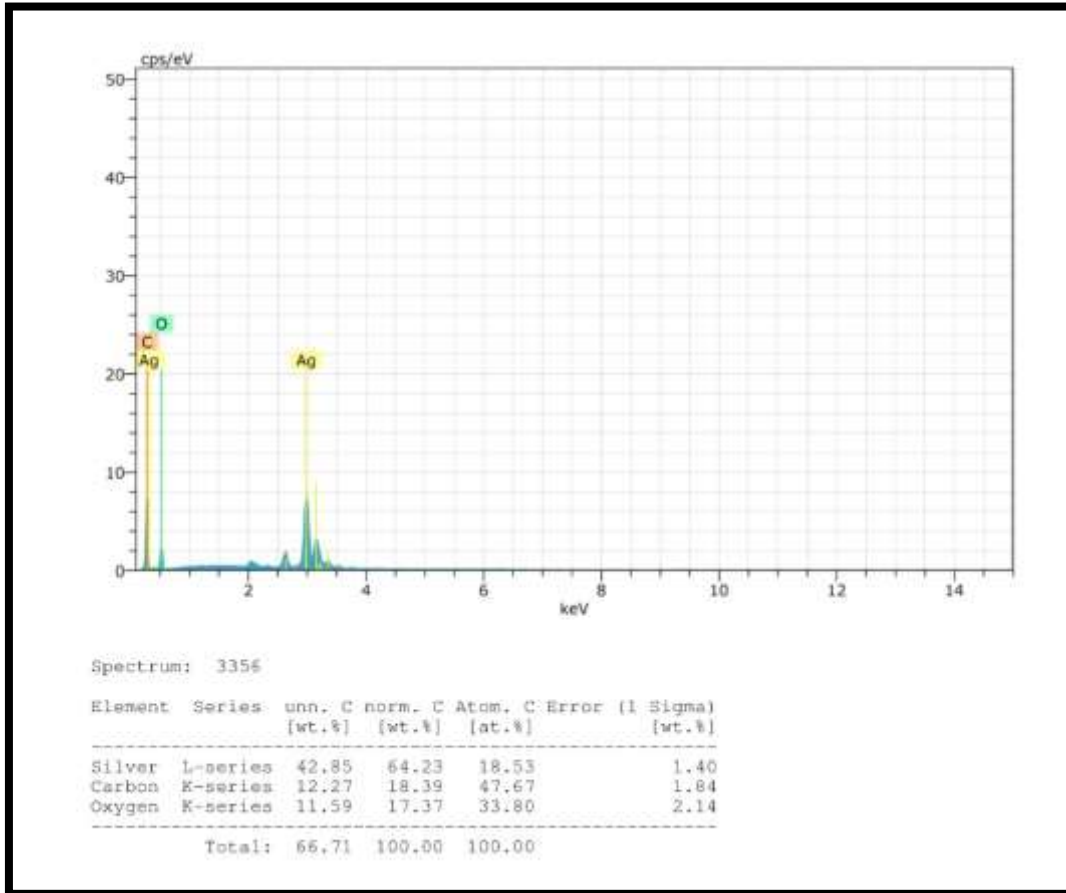
Şekil 4.3. AgNP'lerin SEM analizi

4.2.3. Ag nanopartikülün EDX Karakterizasyonu

Siyah çay atığı özütü kullanılarak sentezlenen Ag nanopartiküllerine ait Enerji Dağıtım X-Işını Spektroskopisi (EDX) görüntüsü Şekil 4.4.'te sunulmuştur. EDX analizi, SEM ile kombine gerçekleştirilir. Gümüş nanopartiküller için EDX analizi, zayıf karbon, oksijen ve azot pikleriyle birlikte yüzey plazmon rezonanslarından dolayı genellikle EDX spektrumlarındaki karakteristik pikleri yaklaşık olarak 3 keV dolaylarında gözlenmektedir. Bu çalışmada da gümüş nanopartiküller 3 keV'de güçlü bir şekilde iyi tanımlanmış bir sinyal gösterdi.

Moodly ve diğerlerinin *Moringo aleifera* yaprak özütü kullanarak gümüş nanopartikülü sentezledikleri çalışmada, elde edilen gümüş nanopartiküllerinin EDX spektrumu 3 keV’de gözlenmiştir (Moodley ve diğerleri, 2018).

Anandalakshmi ve diğerlerinin *pedalium murex* yaprak özütü kullanarak gümüş nanopartikülü sentezledikleri bir başka çalışmada, elde edilen gümüş nanopartiküllerinin EDX spektrumu 3 keV’de gözlenmiştir (Anandalakshmi ve diğerleri, 2016).



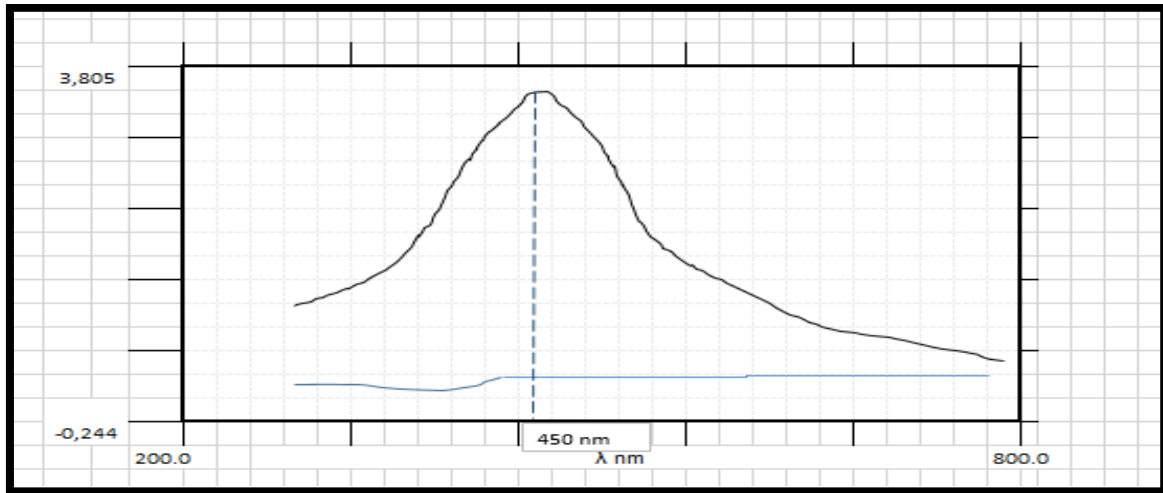
Şekil 4.4. AgNP’lerin EDX analizi

4.2.4. Ag nanopartiküllerinin UV-VIS spektroskopisi

Çay atığı özütü kullanılması ile sentezi yapılan AgNP’lerin sentezi, renk değişimi ve spektroskopik analiz ile doğrulanmıştır. Reaksiyon bitiminde çözelti renginin sarımsı turuncudan, koyu kahverengiye dönüşümü gözlenmiştir. Bu renk değişimi gümüş nanopartikül oluşumunun güçlü bir göstergesidir ve gümüşle ilişkili nanopartikülde yüzey plazmonun uyarılmasına atfedilir (da Silva Ferreira ve diğerleri, 2017). Söz konusu durum

iyonik formdaki gümüşün (Ag^+), metalik gümüşe (Ag^0) dönüştüğünü destekler niteliktedir. AgNP'lerin 200 ve 800 nm aralığında UV-Görünür bölge absorpsiyon spektrumu alınmıştır. Şekil 4.5.'de verilen absorpsiyon spektrumu incelendiğinde, AgNP'lerin 450 nm'de maksimum absorpsiyona sahip olduğu görülmektedir (Sriranjani ve diğerleri, 2016). Gümüş bazlı nanopartiküllerin yüzey plazmon emiliminin beklenildiği gibi 450 nm de maksimum yoğunlukta olduğu tespit edilmiştir.

Sadeghi ve diğerlerinin *Ziziphora tenuior* bitkisinin özütü kullanılarak sentezlenen gümüş nanopartikülün, UV spektrumu 450-460 nm arasında maksimum absorbans verdiği görülmüştür (Sadeghi ve Gholamhoseinpoor, 2015). Anandalakshmi ve diğerlerinin *pedalium murex* yaprak özütü kullanarak gümüş nanopartikülü sentezledikleri bir başka çalışmada, elde edilen gümüş nanopartiküllerinin UV spektrumu 430 nm'de maksimum absorbans verdiği görülmüştür (Anandalakshmi ve diğerleri, 2016).



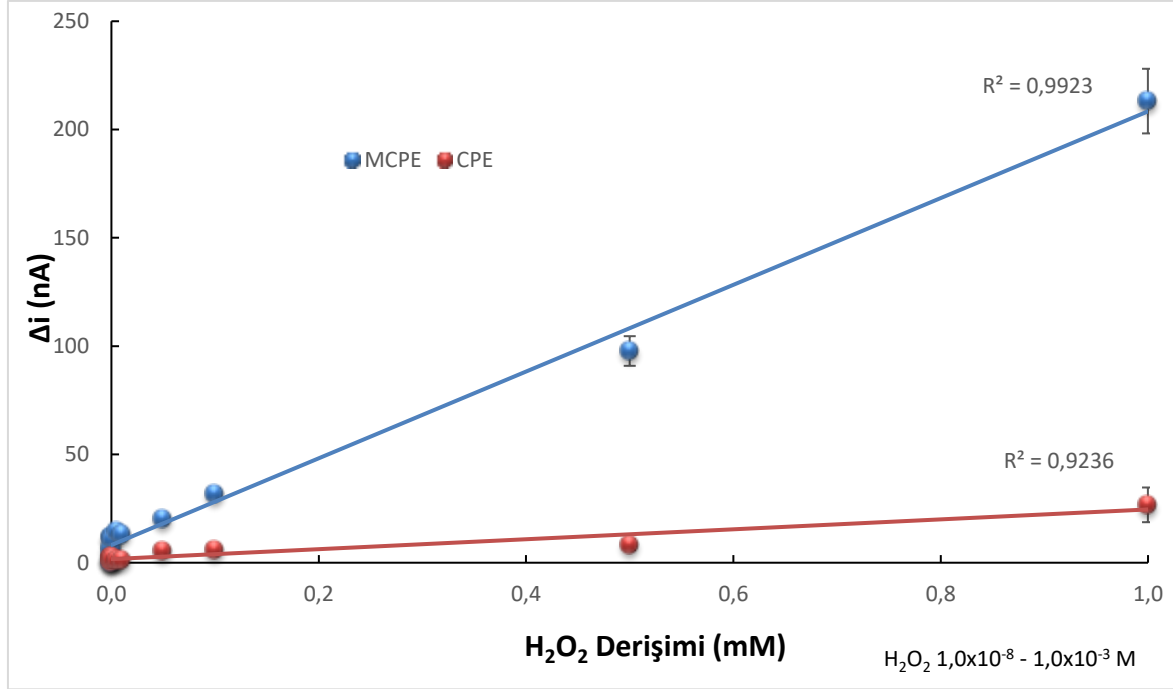
Şekil 4.5. AgNP'lerin UV-Görünür Bölge Spektrumu

4.3. Glukoz Biyosensörünün Hazırlanması

4.3.1. CPE ve MCPE'nin H_2O_2 'e duyarlılıklarının belirlenmesi

Modifiye karbon pasta elektrodun ve karbon pasta elektrodun H_2O_2 'ye duyarlılıklarının karşılaştırılması, H_2O_2 'in çalışma hücresinde oluşturduğu anodik akımların kaydedilmesi yöntemiyle gerçekleştirildi. MCPE ve CPE +0,4 V potansiyelde sabit akıma getirildi ve sonrasında denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresi içerisindeki H_2O_2 'in derişimi $1,0 \times 10^{-3}$

- $1,0 \times 10^{-8}$ M aralığında olacak şekilde eklemeler yapıldı. H_2O_2 derişimine karşı elde edilen cevap akımları grafiğe geçirildi (Şekil 4.6). Grafik incelendiğinde CPE elektoda göre, H_2O_2 'in anodik akımlarının MCPE'de çok daha yüksek olduğu ve MCPE'deki gümüş nanopartikülün iletkenliği arttırarak akımları yükselttiği görüldü.



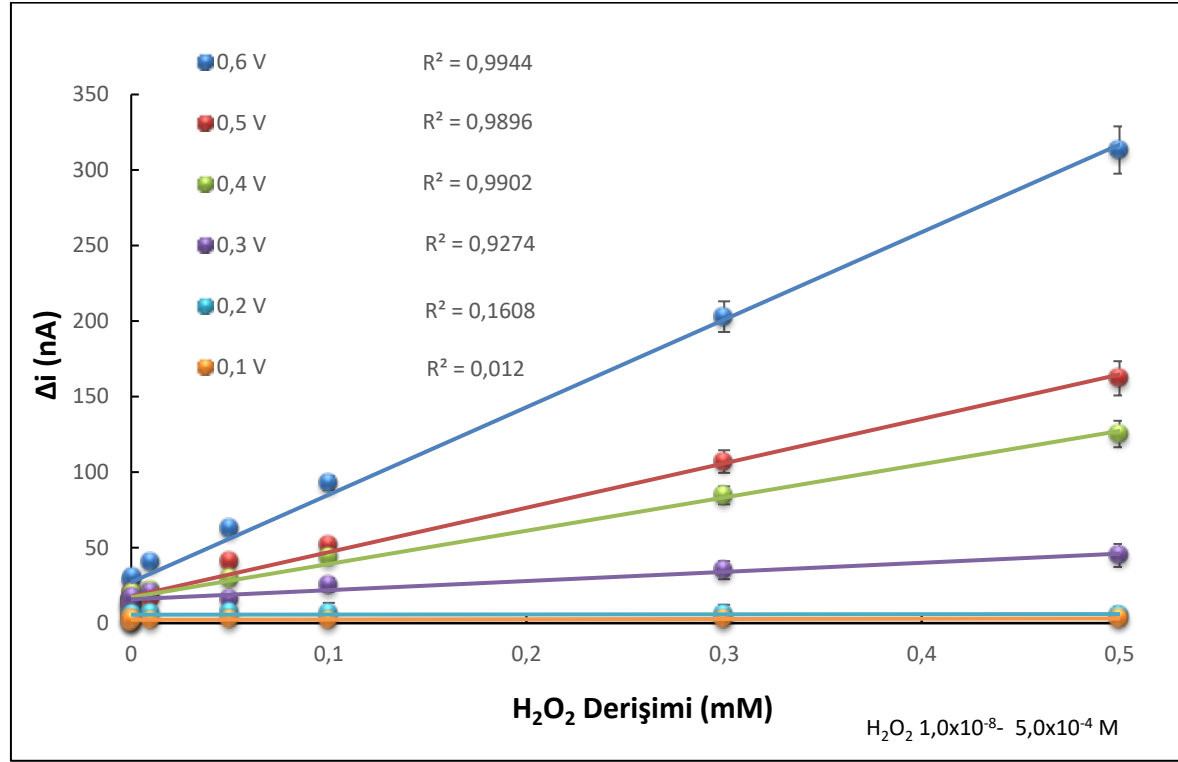
Şekil 4.6. MCPE ve CPE'nin H_2O_2 duyarlılığı

4.3.2. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi

MCPE'in H_2O_2 'e duyarlılığı incelenirken, H_2O_2 'in yükseltgenmesi için farklı potansiyellerde çalışmalar yapılarak H_2O_2 derişimine karşı akım değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.7.).

Grafiğe bakıldığında, düşük potansiyeldeki akım değişimlerinden yüksek potansiyellerdeki akım değişimlerinin daha fazla olduğu görüldü. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi esnasında en düşük potansiyel olarak +0,1 V kullanılmış olup, +0,1 V'dan elde edilen akımlar ile çalışılan diğer potansiyellerden elde edilen akımlar karşılaştırılırsa hem akımların çok düşük kaldığı hem de lineer regresyon katsayısının düşüklüğü (R^2) görülmektedir. Ancak yüksek potansiyeller ile çalışıldığında ise vücut sıvısında yer alan bazı türlerin girişim etkisinin yüksek olduğu bilinmektedir (S. Zhang, 2001). Bu nedenle yüksek cevap akımlarının olduğu, R^2 değerinin yüksek, doğrusallığın iyi ve girişim etkisinin

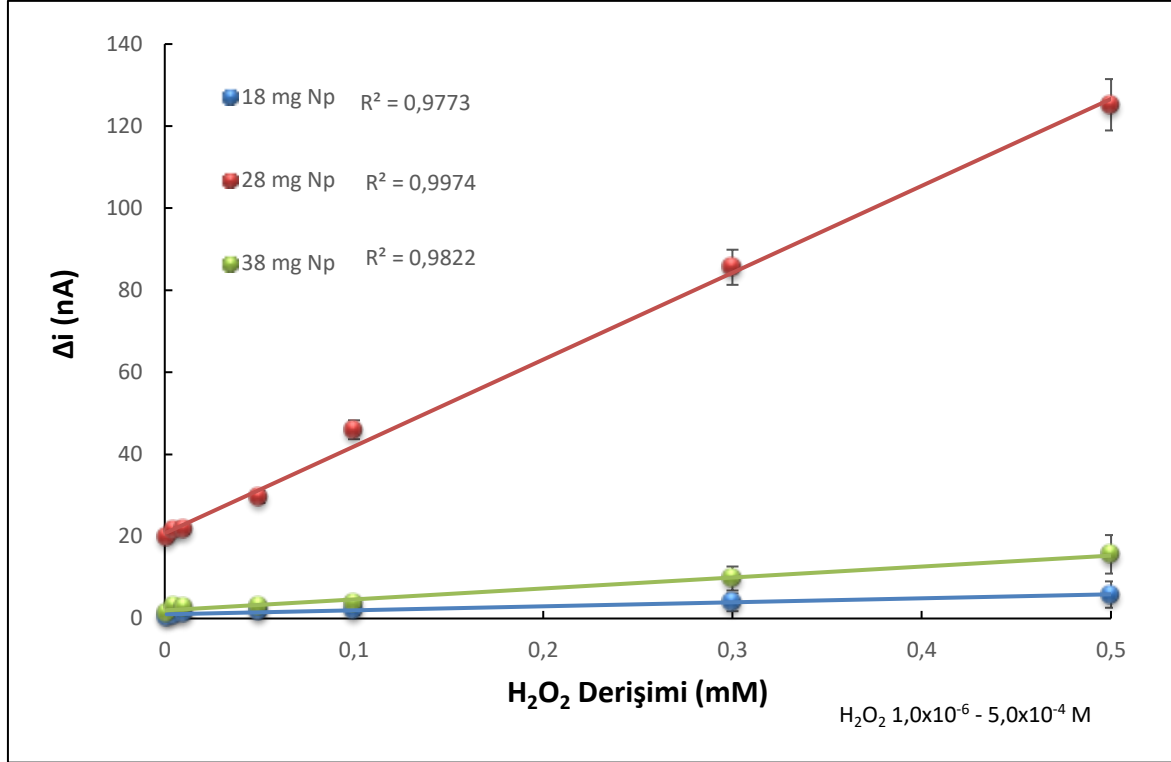
yeterince düşük olacağı +0,4 V'un çalışma potansiyeli olması gerektiğine karar verildi. Sonraki tüm çalışmalar +0,4 V'da gerçekleştirilerek sonuçlar elde edildi.



Şekil 4.7. MCPE'un H_2O_2 'e duyarlılığı üzerine çalışma potansiyelinin etkisi

4.3.3. MCPE'nin H_2O_2 duyarlılığına AgNP miktarının etkisi

Hazırlanan modifiye karbon pasta elektrottaki AgNP miktarının H_2O_2 'e duyarlılığını belirleyebilmek amacıyla hazırlanan pasta içerisine 18 mg, 28 mg ve 38 mg AgNP ilave edildi ve çalışma elektrodu hazırlandı. Hücreye eklenen H_2O_2 derişimlerine karşı akım farkı (Δi) grafiği çizildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.8'de karşılaştırılarak uygun AgNP miktarı bulundu. R^2 değeri ve doğrusallığın hazırlanan üç elektrot için de iyi olmasına karşın en iyi cevap akımı 28 mg AgNP kullanılarak hazırlanan elektrot ile elde edilmiş oldu. Bu sonuçta etkili olan ise optimum miktarda nanopartikül ile karbon pasta elektrodun hazırlanmış olmasıdır.



Şekil 4.8. MCPE'deki kullanılan AgNP miktarının H₂O₂ cevabına etkisi

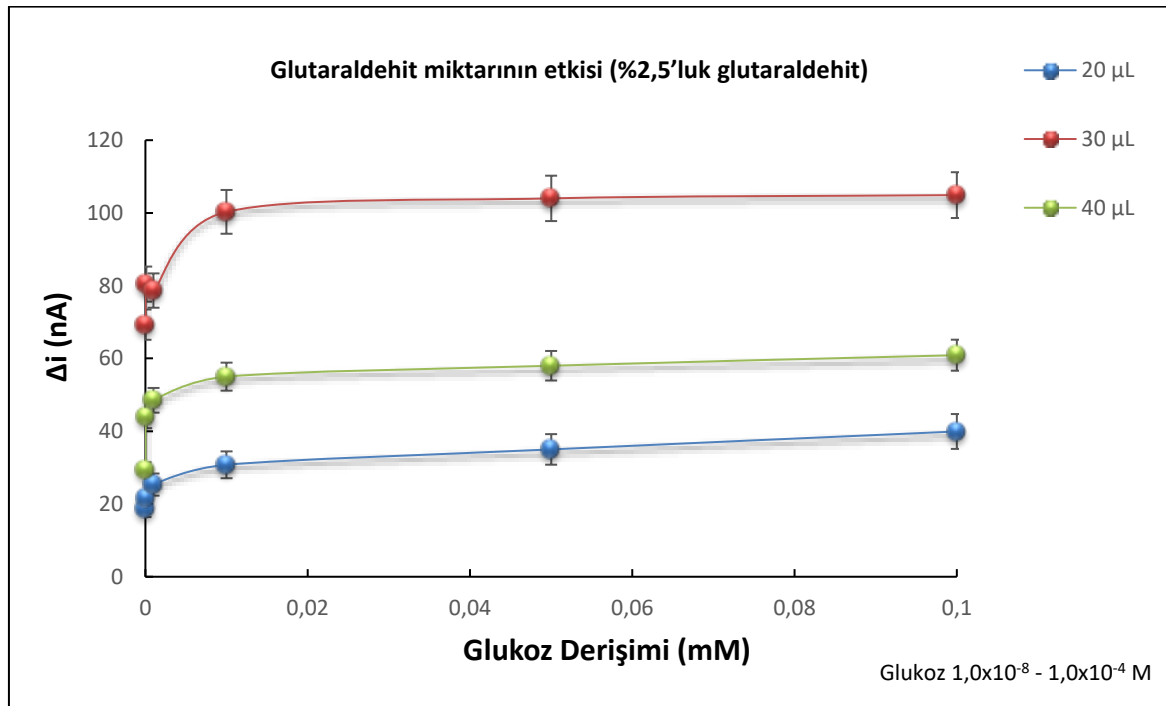
4.3.4. Biyosensörün glukoz duyarlılığına glutaraldehit miktarının etkisi

Glutaraldehit, (C₅H₈O₂) benzersiz özellikleri sayesinde en etkili protein çapraz bağlama reaktiflerinden biridir. Çapraz bağlama maddesi olarak glutaraldehit; histokimya, mikroskopi, sitokimya, deri endüstrisi, enzim teknolojisi, kimyasal sterilizasyon, biyomedikal ve farmasötik bilimler gibi çeşitli alanlarda geniş uygulama bulmaktadır (Migneault ve diğerleri, 2004).

Fonksiyonel grupların moleküler boyuta oranının yüksek olması nedeniyle, güçlü bir çapraz bağlanma kabiliyetine sahiptir. Glutaraldehit, enzimin yüzeyindeki amin gruplarına bağlanmaktadır. Hatta küçük boyutu nedeniyle yalnızca amin gruplarına bağlanmakla kalmaz, enzime dağılır ve iç amin gruplarıyla reaksiyona girer. Bu durum aslında istenmeyen bir özellik olmaktadır. Çünkü bir enzimin üç boyutlu yapısı katalitik işlevi için gerekli olmaktadır ve aşırı çapraz bağlanma ile enzimin aktif bölgesi bozulabilmektedir (Quan Xin, 1997). Söz konusu nedenlerle, eğer çapraz bağlanma glutaraldehit ile yapılacaksa glutaraldehit miktarının enzimin aktivitesine etkisi araştırılmalıdır. Bu nedenle

gluteraldehitin miktarının aktiviteye etkisini belirlemek için gluteraldehit miktarı çalışması yapılmıştır.

Bu çalışmada hacimce 20,0 μL , 30,0 μL ve 40,0 μL gluteraldehit (%2,5'luk) içeren 3 farklı immobilize MCPE'ler hazırlandı. Hazırlanan MCPE'ler +0,4 V potansiyelde sabit akıma getirildi. Söz konusu elektrotlara ait glukoz derişimine karşı Δi akım grafikleri çizildi (Şekil 4.9.). Bu sonuç, 20,0 μL miktarındaki gluteraldehitin enzim immobilize etmek için yeterli olmamasından kaynaklı yapıyı bir arada tutamadığı, 40,0 μL miktarındaki gluteraldehitin ise çok fazla gelerek aşırı bağlanma sonucu enzimin aktivitesinde kayba sebep olduğu şeklinde yorumlandı. Bu çalışma için en fazla aktivitenin 30,0 μL gluteraldehitten sağlandığı görüldü ve bundan sonraki çalışmalarda 30,0 μL gluteraldehit kullanarak modifiye karbon pasta elektrotlar immobilize edilerek hazırlandı.



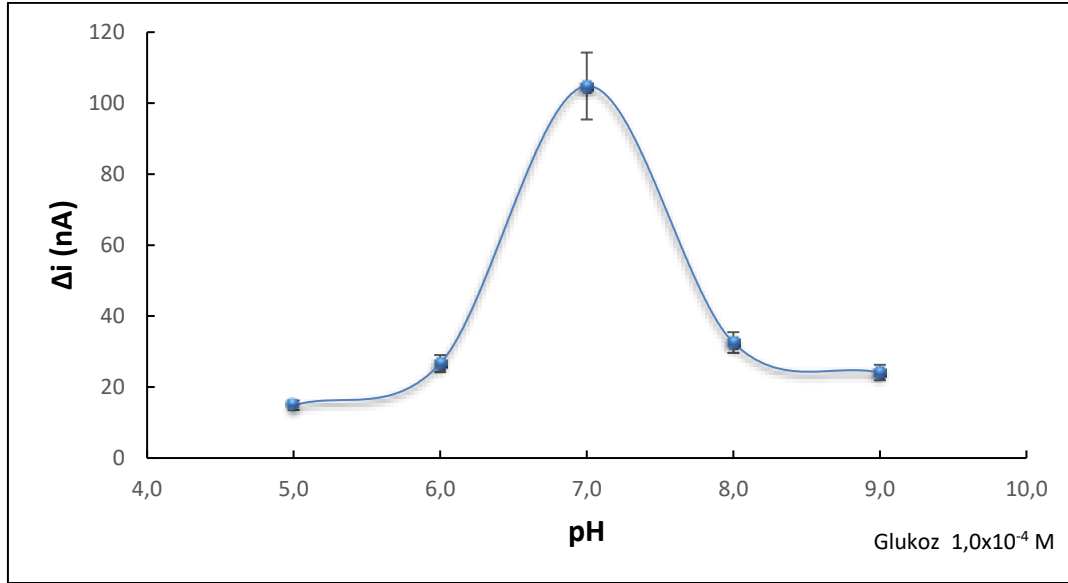
Şekil 4.9. Glukoz duyarlılığına gluteraldehit miktarının etkisi

4.3.5. Enzim elektrodun en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi

Optimum pH

Enzim aktivitesi çeşitli parametrelerden etkilendiğinden çözelti pH'ı enzim aktivitesi için önemli faktörlerden biri olarak belirlenmektedir. Bu nedenle, çalışma ortamı pH'ı uygun bir değere ayarlanmalıdır. Bu yüzden bu çalışmada glukoz biyosensörünün performansına pH'nın etkisi incelendi. Öncelikle elektrokimyasal hücreye pH değeri 7,0 olan 0,1 M fosfat tamponundan 9 mL ve 1,0 M NaCl destek elektrolit çözeltisinden 1 mL koyuldu. Elektrot, +0,4 V potansiyelde sabit akıma getirildi. Hazırlanan biyosensör farklı pH değerlerine (5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0) sahip tampon çözeltilerde dengeye getirildi ve denge akımları kaydedildi. Sonrasında hücre içine derişimi sabit $1,0 \times 10^{-4}$ M glukoz çözeltisi eklenerek akım değişimi ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen bu akımdan denge akımı çıkarılarak akım farkı (Δi) hesaplandı. Bu işlemten sonra pH değerlerine karşı akım farkları (Δi) grafiğe geçirildi (Şekil 4.10.). Çizilen grafik incelendiğinde en yüksek akımın pH 7,0 tamponunda elde edildiği görüldü ve bundan sonraki deney aşamalarında pH 7,0 değerinde çalışıldı.

Literatürde glukoz biyosensörü çalışmalarında farklı pH değerleri bulunsa da genel olarak bu çalışma ile uyumlu pH değerleri bulunmaktadır. Örneğin; pH 8,5; (Tashkhourian ve diğerleri, 2011), pH 7; (Aydoğdu ve diğerleri, 2013), pH 7; (Yang ve diğerleri, 2006), pH 7,2; (Yang ve diğerleri, 2009), pH 7; (Wu ve diğerleri, 2004), pH 7; (Gade ve diğerleri, 2006), pH 7 (Deng ve diğerleri, 2006). Bazı çalışmalardaki pH değerlerinin farklı olmasının nedeninin; immobilize edilen materyalin ve immobilizasyon türünün farklı olmasından kaynaklanabildiği düşünülmektedir (Bodur, 2019).

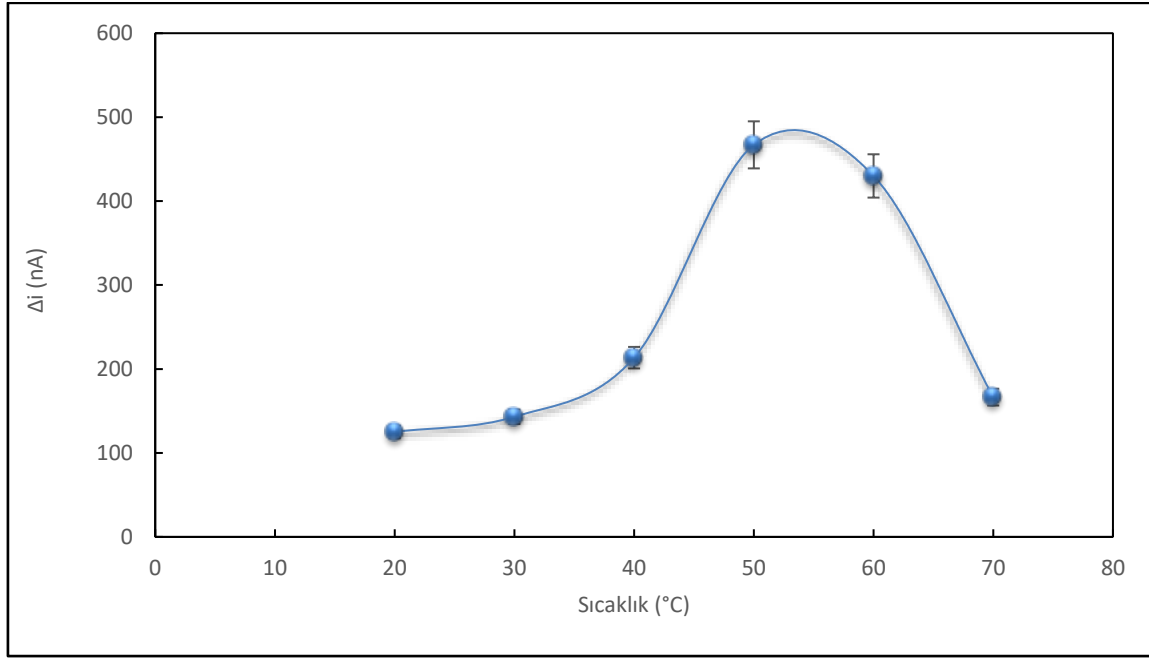


Şekil 4.10. Glukoz duyarlılığına pH'nın etkisi

Optimum sıcaklık

Sıcaklık enzim aktivitesine etki eden parametrelerden bir diğeridir. Enzim ile çalışma yapıldığında aktivite kaybına ve denatürasyona yol açmayan sabit bir sıcaklıkta yapılması tercih edilmelidir. Sıcaklık enzim aktivitesini belirli bir yere kadar artırmakta ve sıcaklık belli bir noktadan sonra artmaya devam ettiğinde enzimler denatüre olmakta ve aktivitesini kaybetmektedir (Daniel ve Danson, 2013). Her enzim için optimum sıcaklık değeri farklıdır ve bu nedenle sıcaklığa bağlı cevap akımını tespit etmek önemli olmaktadır.

Tasarlanan glukoz biyosensörünün aktifliğine sıcaklığın etkisi incelendi. Öncelikle elektrokimyasal hücreye pH değeri 7,0 olan 0,1 M fosfat tamponundan 9 mL ve 1,0 M NaCl destek elektrolit çözeltisinden 1 mL koyuldu. +0,4 V potansiyelde sabit akıma getirildi. Hazırlanan biyosensör farklı sıcaklıklarda (20, 30, 40, 50, 60 ve 70 °C) dengeye getirildi ve denge akımları kaydedildi. Sonrasında hücre içine derişimi sabit $1,0 \times 10^{-4}$ M glukoz çözeltisi eklenerek akım değişimi ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen bu akımdan denge akımı çıkarılarak akım farkı (Δi) hesaplandı. Bu işlem tüm sıcaklıklar için uygulandı ve sonrasında sıcaklığa (°C) karşı akım farkları (Δi) grafiğe işlendi (Şekil 4.11). Çizilen grafik incelendiğinde en yüksek akımın 50 °C'de olduğu görüldü.



Şekil 4.11. Biyosensörün glukoza duyarlılığına sıcaklığın etkisi

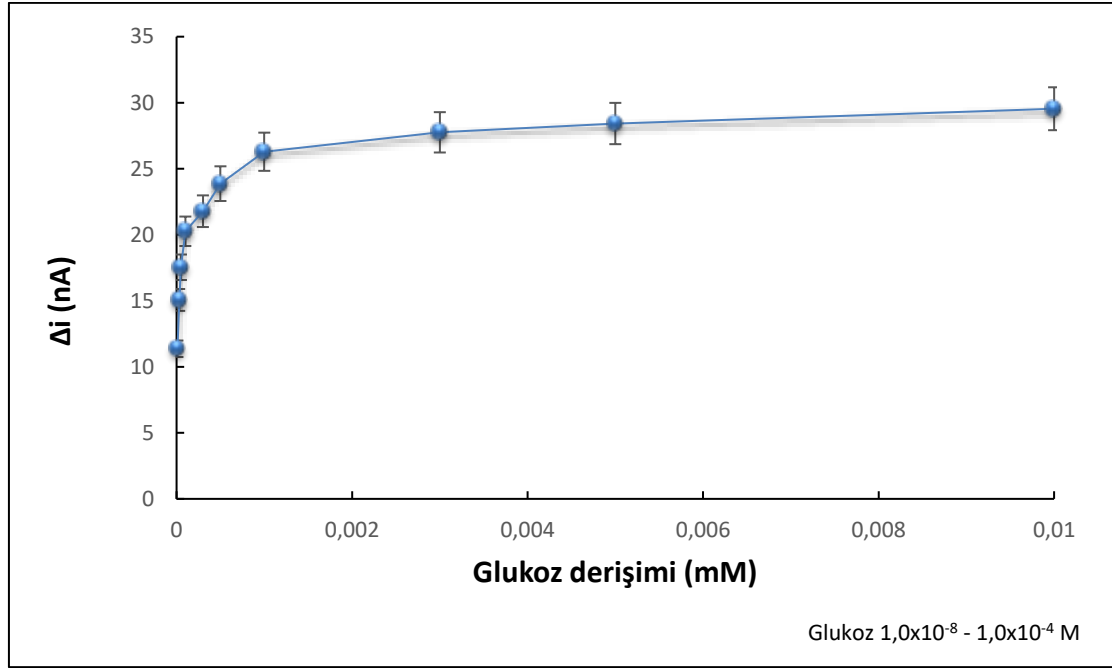
Biyosensörün 50 °C'de en yüksek aktiviteye sahip olduğu grafikten görülmektedir. Ancak sıcaklık çok yüksek olduğunda, enzim kolayca denatüre olur ve enzimatik aktivitesini kaybetmektedir. Yanıt 50 °C'de iken aktivite en yüksek olmasına rağmen, çoğu enzim yüksek sıcaklıkta denatüre olabildiğinden, biyosensörün ömrünü uzatmak için pratik nedenlerden dolayı oda sıcaklığının (25 °C) kullanılması önerilmektedir (Yang ve diğerleri, 2006).

Literatürde glukoz biyosensörü çalışmalarında bu sıcaklık değerinden farklı sıcaklık değerleri de bulunmaktadır. Örneğin; (Aydoğdu ve diğerleri, 2013) 25; (Yang ve diğerleri, 2006) 34,8; (Wu ve diğerleri, 2004) 45 °C'de aktivitenin en yüksek değere ulaştığı görülmüştür. Ancak Liuqing Yang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Fe₃O₄ Np'leri ve nafion filmleri modifiye edilmiş elektrodun 65 °C'de verdiği yanıt maksimuma ulaşırken, Fe₃O₄ Np'leri ve nafion filmleri olmayan elektrodun, sıcaklık 45 °C'den yüksek olduğunda verdiği tepkinin azaldığı gösterilmiştir. Biyosensöre Fe₃O₄ Np'leri ve nafion filmleri modifiye edilmesinin iyi termodinamik stabiliteye ve uzun kullanım ömrüne neden olduğu gösterilmiştir (Yang ve diğerleri, 2009). Bu nedenle bu çalışmada da AgNP eklenmiş modifiye karbon pasta elektrot ile sıcaklık 50 °C iken en iyi yanıt alındığı düşünülmektedir.

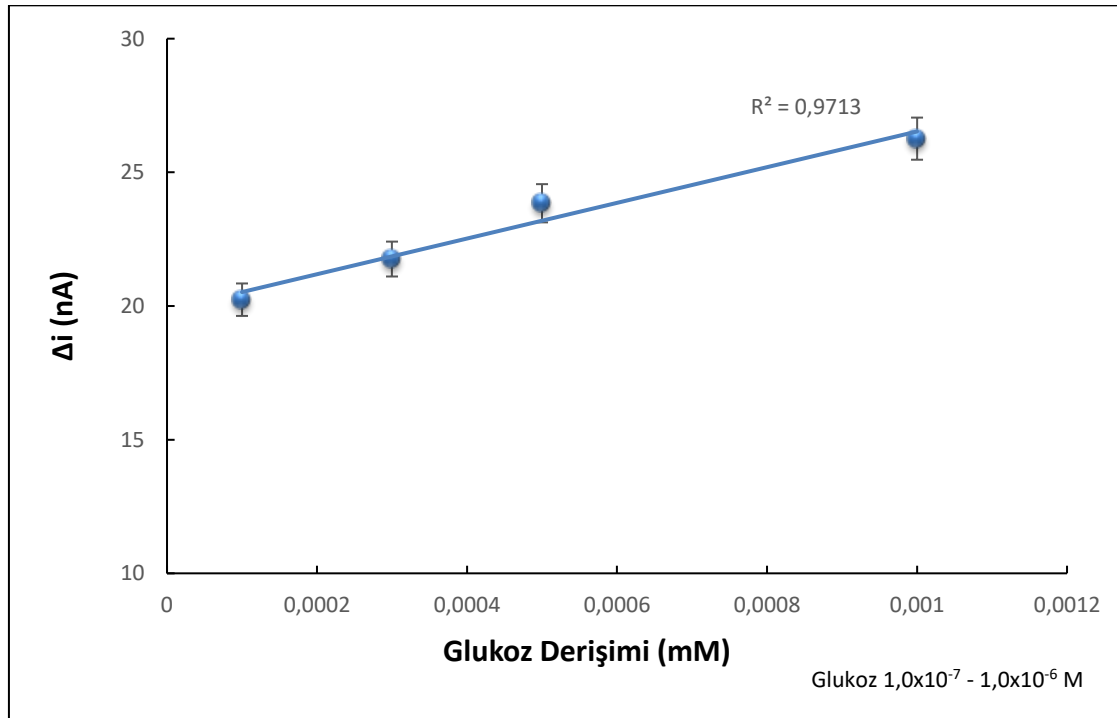
Substrat derişiminin etkisi

Hazırlanan biyosensörün cevap akımına substrat derişiminin etkisi incelendi. Öncelikle elektrokimyasal hücreye pH değeri 7,0 olan 0,1 M fosfat tamponundan 9 mL ve 1,0 M NaCl destek elektrolit çözeltisinden 1 mL koyuldu. Elektrot, +0,4 V potansiyelde sabit akıma getirildi ve denge akımları kaydedildi. Sonrasında hücre içine derişimi $1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M olan glukoz çözeltileri eklendi. Her eklemekten sonra çözelti 5 dk boyunca karıştırıldı ve 200 s sonra akım değeri ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen akım değeri, denge akımından çıkarılarak akım farkı değeri (Δi) hesaplandı ve grafiğe geçirildi (Michaelis-Menten eğrisi) (Şekil 4.12.). Grafik incelendiğinde $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M ($R^2=0,9713$) aralığında doğrusal çalışma aralığı bulundu (Şekil 4.13). Glukoz gözlenebilme sınırı (LOD) ve miktar tayin sınırı (LOQ) sırasıyla $5,0 \times 10^{-9}$ M ve $1,6 \times 10^{-8}$ M olarak bulunmuştur. Söz konusu çalışma aralığında ($1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M) doğrusallığın iyi olduğu ve bu çalışma aralığının kantitatif tayinlerde kullanılabilir olduğuna karar verildi. $(1/\text{glukoz derişimi})-(1/\Delta i)$ grafiği (Lineweaver-Burk grafiği) enzimler için spesifik olan K_m (gözlenen) ve I_{maks} 'ı belirleyebilmek için çizildi (Şekil 4. 14).

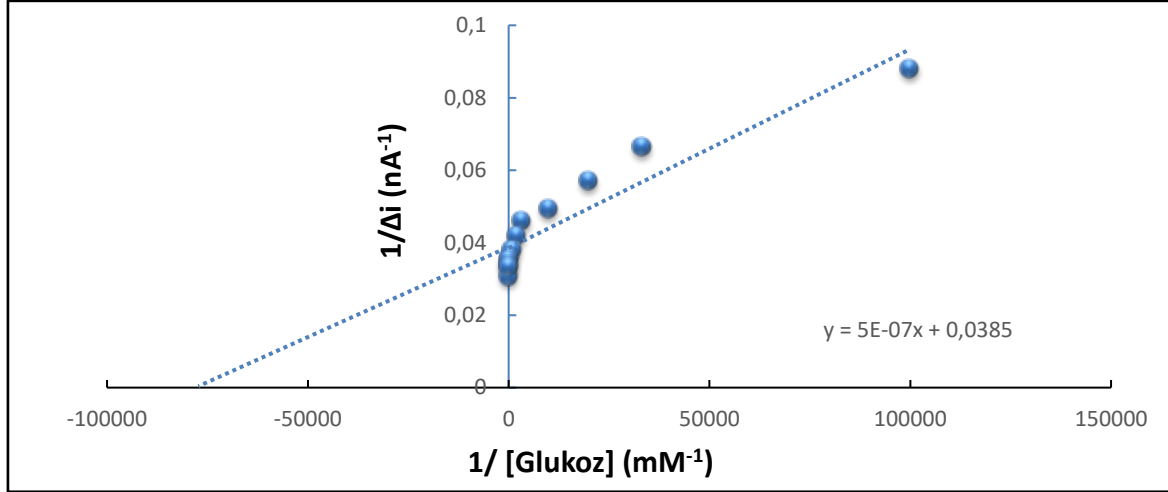
Grafikte eğrinin x eksenini kestiği nokta $-1/K_m$ değerini gösterir. $K_{m(göz)}$ değeri $1,29 \times 10^{-5}$ mM ($0,0129 \mu\text{M}$) olarak hesaplandı. Bulunan K_m değeri enzimin substrata olan ilgisini gösterir. Literatürde verilen immobilize glukoz oksidaz için $K_{m(göz)}$ değerleri 18.0, 11.9, 9.34 mM'dir (Arslan ve diğerleri, 2011; Shan ve diğerleri, 2009; Xue, Shen ve Li, 2001). Grafikte eğrinin y eksenini kestiği nokta ise I_{maks} değeri $38,5 \mu\text{A}$ olarak hesaplandı.



Şekil 4.12. Biyosensörün amperometrik cevabına karşı Glukoz derişiminin etkisi (0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu, 25 °C, +0,4 V)



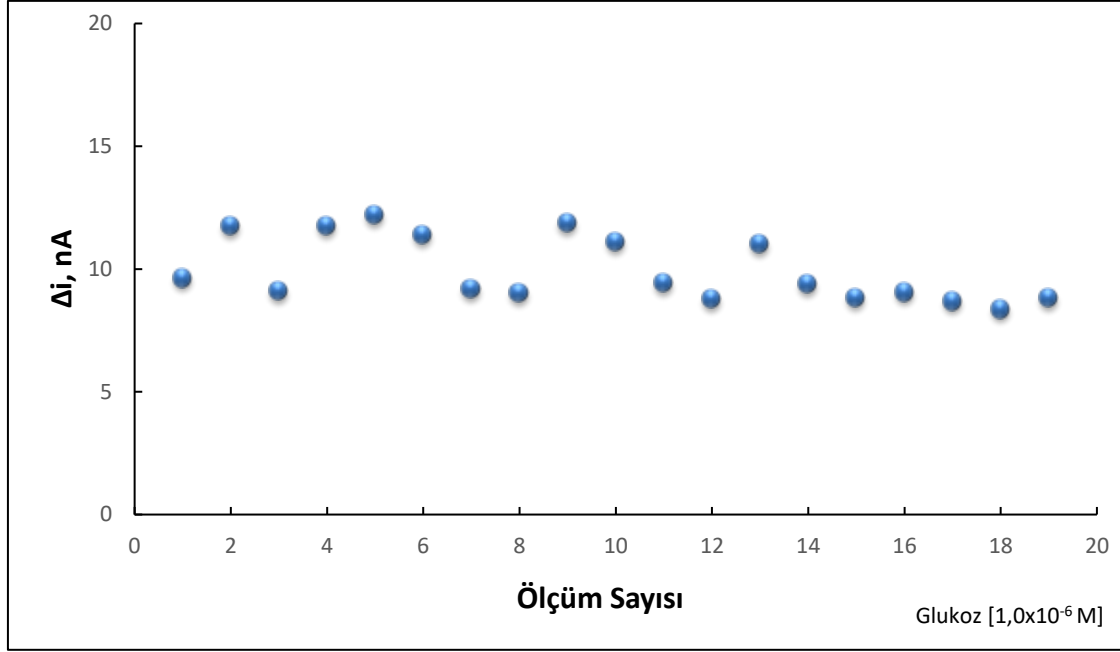
Şekil 4.13. Glukoz biyosensörü için kalibrasyon grafiğı (0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu, 25 °C, +0,4 V)



Şekil 4.14. Biyosensörün amperometrik cevabına Glukoz derişiminin etkisi (Lineweaver-Burk grafiği, 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu, 25 °C, +0,4 V)

Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi

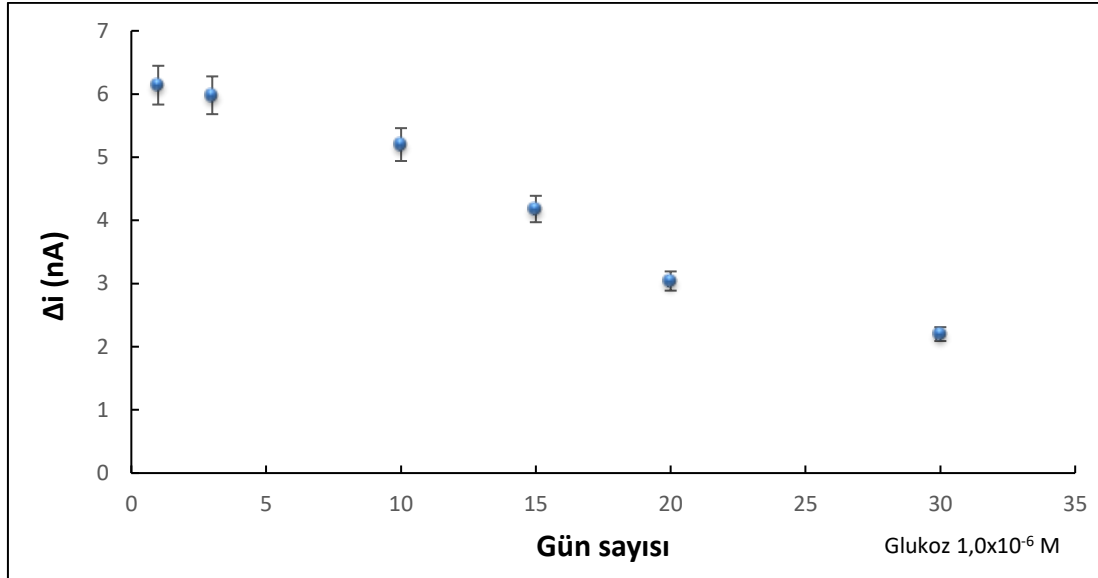
Glukoz biyosensörünün tekrar kullanılabilirliği incelendi. Bu amaçla öncelikle hücre içersine pH değeri 7 olan 9 mL fosfat tamponu ve 0,1 M NaCl eklenmiştir. +0,4 V potansiyelde sabit akıma getirildi. Dengeye geldikten sonra denge akımı kaydedildi. Daha sonra hücre içine derişimi sabit $1,0 \times 10^{-6}$ M glukoz çözeltisi ilave edilerek akım değişimi ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen bu akımdan denge akımı çıkarılarak akım farkı (Δi) hesaplandı. Bu işlem 12 kez tekrarlandı. 12 ölçüme karşı, akım farkı (Δi) değeri grafiğe geçirildi (Şekil 4.15.). Ölçüm sonuçları yorumlandığında, bağıl standart sapma % 3,97 olarak hesaplandı. 12 tekrar sonunda ise biyosensörün başlangıç aktivitesinin % 9,19 kaybettiği görüldü.



Şekil 4.15. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi

Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi

Glukoz biyosensörünün raf ömrü incelendi. Öncelikle hücre içerisine pH değeri 7 olan 9 mL fosfat tamponu ve 0,1 M NaCl eklendi. +0,4 V potansiyelde sabit akıma getirildi ve dengeye geldikten sonra denge akımı kaydedildi. Sonrasında hücre içine derişimi sabit $1,0 \times 10^{-6}$ M glukoz çözeltisi ilave edilerek akım değişimi ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen bu akımdan denge akımı çıkarılarak akım farkı (Δi) hesaplandı. Bu işlem 30 gün süresince belirli zaman aralıklarında (1., 3., 10., 15., 20., 25., 30. gün) gerçekleştirildi. 30 gün boyunca biyosensör kullanılmadığı durumlarda tampon çözelti içerisinde buzdolabında +4 derecede tutuldu. Gün sayısına karşı, akım farkı (Δi) grafiğe geçirildi (Şekil 4.16.). Grafik yorumlandığında, biyosensörün aktivitesinde 30.'u güne kadar düzenli olarak düşüş görüldü. Biyosensörün 30 günün sonunda başlangıç aktivitesinin %35'ini koruduğu görüldü. Mevcut sonuçlar literatür değerlerine bakıldığında biyosensör için beklenen aralıklarda görülmektedir (Yadav ve diğerleri, 2011).



Şekil 4.16. Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi

4.3.6. Glukoz tayinine girişim yapan türlerin etkisi

Biyosensör çalışmalarında üzerinde durulması gereken bir başka basamak ise girişim konusudur. Çünkü gerçek numuneler ile çalışma yapıldığı esnada, gerçek numunenin yanında bir de girişim yapabilecek maddelerde bulunabilir. Kanda bulunan ve girişim yaptığı literatür araştırması ile bilinen ürik asit, askorbik asit ve üredir. Kanda bulunan derişimleri ise; $3,0 \times 10^{-4}$ M ürik asit, $2,5 \times 10^{-3}$ M üre ve $1,0 \times 10^{-4}$ M askorbik asittir (Bodur, 2019).

Çalışma hücresi içinde glukoz ve kanda bulunan bu maddelerde bulunabileceğinden, çalışma elektroduna yüksek bir anodik potansiyel uygulandığı durumda glukoz ile birlikte bu maddeler de yükseltgenirler. Sonuç olarak glukozun kandaki gerçek değerinden daha yüksek bir cevap akımı elde edilmesine sebep olur (Uzumer, 2015). Girişim yapan maddelerin etkisi seyreltme ile önlenilmektedir ve biyosensör çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Park, 2019).

Bu nedenle kanda bulunan ve girişim yapan bu türlerin glukoz biyosensörü üzerine girişim yapma etkisi incelendi. Öncelikle hücre içersine pH değeri 7 olan 9 mL fosfat tamponu ve 0,1 M NaCl eklendi. +0,4 V potansiyelde sabit akıma getirildi ve dengeye geldikten sonra denge akımı kaydedildi. Hücre içine derişimi sabit $1,0 \times 10^{-6}$ M glukoz çözeltisi ilave edilerek akım değişimi ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen akımlardan denge akımı çıkarılarak akım farkı (Δi) hesaplandı. Daha sonrasında girişim yapan maddelerden belirli bir miktar hücreye

eklendi. Girişim yapan maddeler eklendikten sonra da akım değişimi ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen son akımdan denge akımı çıkarılarak elde edilen akım farkından, glukozun akım farkı çıkarılarak girişim yapan maddenin girişim oranı hesaplandı (Çizelge 4.2). Deney, 10 kat seyreltme yapılarak girişim yapan maddeler eklenmesi ile yapıldı.

Çizelge 4.2. Biyosensörün glukoz tayinine girişim yapan maddelerin girişim oranları

	Girişim oranı
Askorbik asit	%1,09
Ürik asit	girişim yok
Üre	girişim yok

4.3.7. Gerçek numunede glukoz tayini

Hazırlanan biyosensörün gerçek bir numuneye uygulanabilirliğini belirlenmek amacıyla hem sentetik kan serumunda hem de meyve suyunda test edildi.

Meyve suyunda glukoz tayini

Biyosensörün gerçek örneklerle uygulanabilirliğini belirlenmek için LS/MS ve GC/MS yöntemleri kullanılarak içeriğindeki glukoz miktarı tespit edilen meyve suyu markasına ait örnek referans olarak kullanıldı. Öncelikle hücre içerisine pH değeri 7 olan 9 mL fosfat tamponu ve 0,1 M 1 mL NaCl eklendi. Hazırlanan biyosensör 25 °C’de, +0,4 V potansiyelde sabit akıma getirildi ve dengeye geldikten sonra denge akımı kaydedildi. Hücre içi glukoz derişimi $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M arasına denk gelen, doğrusal çalışma aralığında olan 4 farklı derişimde glukoz çözeltisi eklendi. Meyve suyu örneği ise 5×10^{-6} kat seyreltme yapılarak hücre içerisine eklendi. Akım değişimi ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen bu akımdan denge akımı çıkarılarak akım farkı (Δi) hesaplandı. Söz konusu işlem 3 kez tekrarlandı. Yapılan bu işlemler sonucunda kalibrasyon grafiğinden glukoz derişimi hesaplandı.

Literatürden elde edilen, Walker ve diğerlerinin yapmış olduğu, LC/MS ve GC/MS yöntemleri kullanılması ile yapılan çalışmada kullanılan meyve suyundaki glukoz miktarı 45,50 g/L’dir. Hazırlanan biyosensör ile ölçüm sonucunda, glukoz miktarı kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak $44,37 \pm 4,14$ g/L olarak bulunmuştur (Walker ve diğerleri, 2014).

Sentetik kan numunesinde glukoz tayini

Kan serumunda bulunan girişim yapan çeşitli türlerin Bölüm 3.5.'te belirtilen derişimlerini içeren sentetik kan çözeltisi hazırlandı. Öncelikle hücre içersine pH değeri 7 olan 9 mL fosfat tamponu ve 0,1 M 1 mL NaCl eklendi. Hücre içersindeki glukoz derişimi $1,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde hücre içersine ilave edildi. Hazırlanan biyosensör 25 °C'de, +0,4 V potansiyelde sabit akıma getirildi ve dengeye geldikten sonra denge akımı kaydedildi. Çalışma hücre içersinde, 10 kat seyreltme olacak biçimde sentetik kan numunesinden ilave edilerek akım değışimi ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen akımdan denge akımı çıkarılarak akım farkı (Δi) hesaplandı. Söz konusu işlem 3 kez tekrarlandı ve kalibrasyon grafiğı çizildi. Grafikten yararlanılarak glukoz miktarı $1,0 \pm (0,0014) \times 10^{-6}$ M olarak bulunmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında ilk olarak yeşil sentez yöntemiyle siyah çay atığından gümüş nanopartikül oluşumu sağlandı. Oluşan nanopartiküller aşağıda belirtilen yöntemler ile karakterize edildi:

- Sarı-turuncu renkten kahverengi renge dönüşüm ile nanopartikül oluştuğu görüldü.
- UV-Vis spektroskopisi ile gümüş nanopartikül içeren çözeltinin maksimum absorbanansı 450 nm’de görüldü.
- FTIR analizi ile gümüş nanopartikül içeren çözeltideki fonksiyonel gruplar tayin edildi.
- SEM analizi ile 59-93 nm arasında nanopartiküller oluştuğu görüldü.
- EDX ile gümüş nanopartikül oluşumu kanıtlandı.

Ardından çalışmada elde edilen gümüş nanopartikül kullanılarak glukoz duyarlı bir biyosensör hazırlandı. Sonuçlar aşağıda sıralanmıştır:

- Biyosensörün tasarımında kullanılan gümüş nanopartiküller, glukoz biyosensörünün performansını arttırdı.
- Çalışma potansiyeli +0,4 V olarak belirlendi.
- Doğrusal çalışma aralığı 1×10^{-7} M – 1×10^{-6} M, $R^2=0,9713$ olarak bulundu. Bu sonuca göre gümüş nanopartikül modifiye edilen biyosensör ile bu aralıkta kantitatif analizlerin yüksek hassasiyette yapılmasına ve düşük derişimlerde glukoz tayinine olanak sağladığı söylenebilir.
- Hazırlanan glukoz biyosensörü düşük tayin sınırına sahiptir ($1,6 \times 10^{-8}$ M). Düşük tayin sınırı, küçük derişimlerde madde miktarı tayinine olanak tanınması açısından oldukça önemlidir. Biyosensörün cevap süresi ise 200 s olarak belirlenmiştir.
- Optimum çalışma pH’ı 7,0 fosfat tamponu olarak belirlenmiştir. Optimum sıcaklık ise 50° C olarak belirlenmiş olup bütün deneysel çalışmalar oda sıcaklığında yapılmıştır.
- Hesaplanan $K_{m(göz)}$ değeri $1,29 \times 10^{-5}$ mM (0,0129 μ M) ve $I_{maks(göz)}$ değeri 38,5 μ A bulundu. Literatürdeki diğer glukoz biyosensörlerine ait K_m değerleri ile karşılaştırıldığında biyosensörümüze ait bulunan değer oldukça düşük olduğu görüldü. Biyosensörde K_m değerinin küçük olması; gümüş nanopartikülün enzimin substrata olan ilgisini arttırdığı görülmüştür.

- 12 ölçüm sonrasında biyosensörün aktivitesinin yaklaşık %90,81'ini muhafaza ettiği görülmüştür. Bu değer literatür değerleri ile kıyaslandığında tekrar kullanılabilirlik değerinin yüksek olduğu göstermektedir.
- Raf ömrü incelemesinde, 30 gün sonunda biyosensörün başlangıç amperometrik cevabının yaklaşık %35'ini koruduğu görülmüştür.
- Biyosensör çalışmalarında sıkça rastlanan bir sorun olan girişim etkisi, bu çalışmada bazı maddeler için tamamen ortadan kaldırılmasa da düşük girişim yüzdeleri (Ürik asit; girişim yok, Üre; girişim yok, Askorbik asit; %1,09) elde edilmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında siyah çay atığı kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle gümüş nanopartikül sentezi yapıldı. Atık çay kullanılarak ülkemizde çok tüketilen çayın kullanılmasından geriye kalan atığının teknoloji alanına kazanılması amaçlandı. Bu amaçla sentezlenen gümüş nanopartiküller glukoz biyosensörü tasarımında kullanıldı. Yeşil sentez yöntemiyle atık çaydan nanopartikül sentezi kolay, ekonomik, pratik ve çevre dostu olması nedeniyle bilim dünyasında dikkatleri üzerine çekmektedir. Sentezlenen bu nanopartiküllerin modifiyesi ile hazırlanan glukoz biyosensörünün uygun cevap süresine, geniş çalışma aralığına, düşük tayin sınırına, iyi tekrarlanabilirliğe ve uzun raf ömrüne sahip olduğu görülmüştür. Bu nedenlerle biyosensör çalışmalarında, yeşil sentez yöntemiyle elde edilen nanopartiküller ile modifiye edilerek hazırlanan biyosensörler yenilikçi olup kullanım alanını da genişletmektedir. Ayrıca nanopartikül modifiye edilmiş biyosensörün hazırlanması az maliyetli ve pratik olması nedeniyle de gün geçtikçe kendine daha fazla yer bulacaktır.

KAYNAKLAR

- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L. and Ikram, S. (2016). A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. *Journal of Advanced Research*, 7(1), 17-28.
- Akbıyık M.A. (2022). *Tirozinaz temelli dopamin biyosensörünün hazırlanması*. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 5-57.
- Aktaş Gemici, M., (2019). *Çok fonksiyonlu iletken polimerin elektrokromik ve amperometrik biyosensör uygulamaları*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 3-65.
- Anandalakshmi, K., Venugobal, J. and Ramasamy, V. J. A. N. (2016). Characterization of silver nanoparticles by green synthesis method using *Pedaliu murex* leaf extract and their antibacterial activity. *Applied Nanoscience*, 6, 399-408.
- Arslan, F., Ustabaş, S. and Arslan, H. (2011). An amperometric biosensor for glucose determination prepared from glucose oxidase immobilized in polyaniline-polyvinylsulfonate film. *Sensors*, 11(8), 8152-8163.
- Aydoğdu, G., Zeybek, D. K., Pekyardımcı, Ş. and Kılıç, E. (2013). A novel amperometric biosensor based on ZnO nanoparticles-modified carbon paste electrode for determination of glucose in human serum. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 41(5), 332-338.
- Basavegowda, N. and Lee, Y. R. (2013). Synthesis of silver nanoparticles using Satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) peel extract: a novel approach towards waste utilization. *Materials Letters*, 109, 31-33.
- Bekem, R., Durmuş, S., Dalmaz, A. ve Dulger, G. (2023). *Agaricus bisporus* ekstraktı kullanılarak ZNO nanopartiküllerinin yeşil sentezi: yapısal karakterizasyonu ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 11(2), 551-562.
- Bhardwaj, T. (2014). A review on immobilization techniques of biosensors. *International Journal of Engineering Research*, 3(5), 26-32.
- Blanco, A. and Blanco, G. (2017). *Medical biochemistry*. New York: Academic Press, 85-92.
- Bodur, O. C. (2019). *Alzheimer hastalığının teşhisi için asetilkolin biyosensörünün hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 3-48.
- Boncheva, M., Gracias, D. H., Jacobs, H. O. and Whitesides, G. M. (2002). Biomimetic self-assembly of a functional asymmetrical electronic device. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 4937-4940.

- Campaña, A. L., Florez, S. L., Noguera, M. J., Fuentes, O. P., Ruiz Puentes, P., Cruz, J. C. and Osmá, J. F. (2019). Enzyme-based electrochemical biosensors for microfluidic platforms to detect pharmaceutical residues in wastewater. *Biosensors*, 9(1), 41.
- Cano, M., Ávila, J. L., Mayén, M., Mena, M. L., Pingarrón, J. and Rodríguez-Amaro, R. (2008). A new, third generation, PVC/TTF–TCNQ composite amperometric biosensor for glucose determination. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 615(1), 69-74.
- Cao, Y., Jin, R. and Mirkin, C. A. (2001). DNA-modified core– shell Ag/Au nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 123(32), 7961-7962.
- Carr, P. W. and Bowers, L. D. (1980). *Immobilized enzymes in analytical and clinical chemistry*. New York: Wiley, 45-62.
- Caruthers, S. D., Wickline, S. A. and Lanza, G. M. (2007). Nanotechnological applications in medicine. *Current opinion in Biotechnology*, 18(1), 26-30.
- Chen, Y. L., Tuan, H. Y., Tien, C. W., Lo, W. H., Liang, H. C. and Hu, Y. C. (2009). Augmented biosynthesis of cadmium sulfide nanoparticles by genetically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 25(5), 1260-1266.
- Çil, M. (2006). *Immobilization of glucose oxidase and polyphenol oxidase in poly(n-(4-(3-thienyl methylene)-oxycarbonylphenyl) maleimide)-co-pyrrole) matrice*, Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 3-55.
- Çolak, Ö., Yaşar, A., Cete, S., and Arslan, F. (2012). *Glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase on electrochemically synthesized polypyrrole-poly (vinyl sulphonate) composite film by cross-linking with glutaraldehyde*. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 40(5), 354-361.
- da Silva Ferreira, V., ConzFerreira, M. E., Lima, L. M. T., Frasés, S., de Souza, W. and Sant'Anna, C. (2017). Green production of microalgae-based silver chloride nanoparticles with antimicrobial activity against pathogenic bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 97, 114-121.
- Daniel, R. M. and Danson, M. J. (2013). Temperature and the catalytic activity of enzymes: A fresh understanding. *FEBS Letters*, 587(17), 2738-2743.
- Demir, Ş. (2018). *Çay atıklarından yararlanılarak çay özütü miktarının artırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, 1-51.
- Demirci Uzun, S. (2014). *Development of novel immobilization matrices via surface modification approach for glucose detection and their biosensor applications*. Doctor of Philosophy, Middle East Technical University, Ankara, 85-93.
- Deng, C., Li, M., Xie, Q., Liu, M., Tan, Y., Xu, X. and Yao, S. (2006). New glucose biosensor based on a poly (o-phenylenediamine)/glucose oxidase-glutaraldehyde/Prussian blue/Au electrode with QCM monitoring of various electrode-surface modifications. *Analytica Chimica Acta*, 557(1-2), 85-94.

- Di Pietrantonio, F., Cannatà, D. and Benetti, M. (2019). *Biosensor technologies based on nanomaterials*. In *Functional nanostructured interfaces for environmental and biomedical applications*. Amsterdam: Elsevier, 181-242.
- Ealia, S. A. M. and Saravanakumar, M. P. (2017). *A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application*. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. New York: IOP Publishing, 25-32.
- Ekinci, O. (2006). *Immobilization of glucose oxidase and polyphenol oxidase in conducting copolymer of pyrrole functionalized polystyrene with pyrrole*. Master's Thesis, Middle East Technical University, Ankara, 36-42.
- Erbaş, A. (2023). *Ferrosen takılı 4-aminoantipiren ile modifiye edilmiş yeni bir glukoz biyosensörü hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 3-66.
- Ezgi, D. (2015). *Yaş çay ve siyah çay atıklarından bazı ekstraksiyon yöntemleriyle kafein ve kateşinlerin ayrılması*, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 1-54.
- Fischer, E. (1894). Einfluss der configuration auf die wirkung der enzyme. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 27(3), 2985-2993.
- Gade, V. K., Shirale, D. J., Gaikwad, P. D., Savale, P. A., Kakde, K. P., Kharat, H. J. and Shirsat, M. D. (2006). Immobilization of GOD on electrochemically synthesized Ppy–PVS composite film by cross-linking via glutaraldehyde for determination of glucose. *Reactive and Functional Polymers*, 66(12), 1420-1426.
- Geetha, R., Ashokkumar, T., Tamilselvan, S., Govindaraju, K., Sadiq, M. and Singaravelu, G. (2013). Green synthesis of gold nanoparticles and their anticancer activity. *Cancer Nanotechnology*, 4, 91-98.
- Geoprincy, G., Srri, B. V., Poonguzhali, U., Gandhi, N. N. and Renganathan, S. (2013). A review on green synthesis of silver nanoparticles. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(1), 8-12.
- Gerard, M., Chaubey, A. and Malhotra, B. D. (2002). Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 17(5), 345-359.
- Goode, J. A., Rushworth, J. V. H. and Millner, P. A. (2015). Biosensor regeneration: a review of common techniques and outcomes. *Langmuir*, 31(23), 6267-6276.
- Gurunathan, S., Park, J. H., Han, J. W. and Kim, J. H. (2015). Comparative assessment of the apoptotic potential of silver nanoparticles synthesized by *Bacillus tequilensis* and *Calocybe indica* in MDA-MB-231 human breast cancer cells: targeting p53 for anticancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 4203.
- Han, M., Gao, X., Su, J. Z. and Nie, S. (2001). Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. *Nature Biotechnology*, 19(7), 631-635.

- Hočevár, S. B., Švancara, I., Vytřas, K. and Ogorevc, B. (2005). Novel electrode for electrochemical stripping analysis based on carbon paste modified with bismuth powder. *Electrochimica Acta*, 51(4), 706-710.
- Huang, Q., Zhang, H., Hu, S., Li, F., Weng, W., Chen, J. and Bao, X. (2014). A sensitive and reliable dopamine biosensor was developed based on the Au@ carbon dots–chitosan composite film. *Biosensors and Bioelectronics*, 52, 277-280.
- Hullmann, A. (2007). Measuring and assessing the development of nanotechnology. *Scientometrics*, 70(3), 739-758.
- Iravani, S. (2014). Bacteria in nanoparticle synthesis: current status and future prospects. *International Scholarly Research Notices*, 3(12), 12-16.
- Ivanković, A., Dronjić, A., Bevanda, A. M. and Talić, S. (2017). Review of 12 principles of green chemistry in practice. *International Journal of Sustainable and Green Energy*, 6(3), 39-48.
- Izadyar, A., Van, M. N., Rodriguez, K. A., Seok, I. and Hood, E. E. (2021). A bienzymatic amperometric glucose biosensor based on using a novel recombinant Mn peroxidase from corn and glucose oxidase with a Nafion membrane. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 895, 115387.
- İnternet: International Diabetes Federation (IDF) Diabetes Atlas, 1th ed. (2000). URL-2: <https://idf.org/>, Son Erişim Tarihi: 10/08/2023.
- İnternet: DS, G. (2006). *Glucose oxidase. Molecule of the month*: PCSB Protein Data Bank. URL-4: <https://pdb101.rcsb.org/motm/77>, Son Erişim Tarihi: 06/08/2023.
- İnternet: FAO. (2018) *Dünya gıda örgütü*. URL-5: <https://www.fao.org>, Son Erişim Tarihi: 17/03/2023.
- İnternet: Faridbod, F., Ganjali, M. R., Larijani, B., Norouzi, P. and Hosseini, M. (2014). *Biosensors in endocrinology-review article*. URL-6: https://www.sid.ir/en/VEWSSID/J_pdf/8632014SUP0110.pdf, Son Erişim Tarihi: 25/03/2023.
- İnternet: Sıfır Atık (2023). URL-3: <https://sifiratik.gov.tr/>, Son Erişim Tarihi: 21.05.2023.
- İnternet: TÜİK (2023). URL-1: <https://www.tuik.gov.tr/>, Son Erişim Tarihi: 21.05.2023.
- Jabbar, A. H., Al-janabi, H. S. O., Hamzah, M. Q., Mezan, S. O., Tumah, A. N., Ameruddin, A. S. B. and Agam, M. A. (2020). Green synthesis and characterization of silver nanoparticle (AgNPs) using pandanus atrocarpus extract. *International Journal of Advanced Science and Technology*, 29(3), 4913-4922.
- Jędrzak, A., Rębiś, T., Klapiszewski, Ł., Zdarta, J., Milczarek, G. and Jesionowski, T. (2018). Carbon paste electrode based on functional GOx/silica-lignin system to prepare an amperometric glucose biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 256, 176-185.

- Jia, M., Wang, T., Liang, F. and Hu, J. (2012). A novel process for the fabrication of a silver-nanoparticle-modified electrode and its application in nonenzymatic glucose sensing. *Electroanalysis*, 24(9), 1864-1868.
- Kacar, B. (1987). *Cayin biyokimyası ve işleme teknolojisi*. İstanbul: Cay-Kur Yayını, 134-148.
- Kamat, P. V. (2002). Photophysical, photochemical and photocatalytic aspects of metal nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(32), 7729-7744.
- Karagollu, O., Gorur, M., Turkan, A., Sengez, B., Gode, F. and Yilmaz, F. (2013). A novel amperometric glucose biosensor based on poly (glycidyl methacrylate-co-(3-thienylmethacrylate)). *Current Applied Physics*, 13(4), 725-730.
- Karagözoğlu, M. B., Özyonar, F., Yılmaz, A. and Atmaca, E. (2009). *Katı atıkların yeniden kazanımı ve önemi*. Türkiye’de Katı Atık Yönetimi Sempozyumu. İstanbul: YTÜ Yayınları, 45-62.
- Kausaite-Minkstiniene, A., Glumbokaite, L., Ramanaviciene, A. and Ramanavicius, A. (2020). Reagent-less amperometric glucose biosensor based on nanobiocomposite consisting of poly (1, 10-phenanthroline-5, 6-dione), poly (pyrrole-2-carboxylic acid), gold nanoparticles and glucose oxidase. *Microchemical Journal*, 154, 104665.
- Keskin, M. ve Arslan, F. (2020). Biyosensörler. *Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi*, 1(1-2), 51-60.
- Khan, S. A. and Ahmad, A. (2013). Fungus mediated synthesis of biomedically important cerium oxide nanoparticles. *Materials Research Bulletin*, 48(10), 4134-4138.
- Khatami, M., Sharifi, I., Nobre, M. A., Zafarnia, N. and Aflatoonian, M. R. (2018). Waste-grass-mediated green synthesis of silver nanoparticles and evaluation of their anticancer, antifungal and antibacterial activity. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 11(2), 125-134.
- Khumngern, S., Jirakunakorn, R., Thavarungkul, P., Kanatharana, P. and Numnuam, A. (2021). A highly sensitive flow injection amperometric glucose biosensor using a gold nanoparticles/polytyramine/Prussian blue modified screen-printed carbon electrode. *Bioelectrochemistry*, 138, 107718.
- Kriechbaum, M., Heilmann, H. J., Wientjes, F. J., Hahn, M., Jany, K. D., Gassen, H. G., ... ve Alaeddinoglu, G. (1989). Cloning and DNA sequence analysis of the glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* NRRL-3. *FEBS Letters*, 255(1), 63-66.
- Kumar, R., Roopan, S. M., Prabhakarn, A., Khanna, V. G. and Chakroborty, S. (2012). Agricultural waste *Annona squamosa* peel extract: biosynthesis of silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 90, 173-176.
- Kurbanoglu, S., Erkmen, C. and Uslu, B. (2020). Frontiers in electrochemical enzyme based biosensors for food and drug analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 124, 115809.

- Litwack, G. (2018). *Human biochemistry*. (First Edition). London: Academic Press, 100-101.
- Maier, S. A., Brongersma, M. L., Kik, P. G., Meltzer, S., Requicha, A. A., Koel, B. E. and Atwater, H. A. (2003). Erratum: Plasmonics-A route to nanoscale optical devices. *Advanced Materials*, 15(7-8), 85-92.
- Matejka, P., Vlckova, B., Vohlidal, J., Pancoska, P. and Baumruk, V. (1992). The role of triton X-100 as an adsorbate and a molecular spacer on the surface of silver colloid: a surface-enhanced Raman scattering study. *The Journal of Physical Chemistry*, 96(3), 1361-1366.
- Meng, Q., Li, S., Huang, J., Wei, C. C., Wan, X., Sang, S., and Ho, C. T. (2018). Importance of the nucleophilic property of tea polyphenols. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(19), 5379-5383.
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J. and Waldron, K. C. (2004). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*, 37(5), 790-802.
- Milli Eğitim Bakanlığı (2009). *Çevre koruma katı atık toplama*. Ankara: MEB, 32-36.
- Mirkin, C. A., Letsinger, R. L., Mucic, R. C. and Storhoff, J. J. (1996). A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*, 382(6592), 607-609.
- Mohanpuria, P., Rana, N. K. and Yadav, S. K. (2008). Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *Journal of Nanoparticle Research*, 10, 507-517.
- Moodley, J. S., Krishna, S. B. N., Pillay, K. and Govender, P. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles from moringa oleifera leaf extracts and its antimicrobial potential. *advances in natural sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 9(1), 015011.
- Munack, A. (2006). *CIGR "Handbook of agricultural engineering"*. New York: ASABE Publication, 78-92.
- Narayanan, K. B. and Sakthivel, N. (2011). Synthesis and characterization of nano-gold composite using *Cylindrocladium floridanum* and its heterogeneous catalysis in the degradation of 4-nitrophenol. *Journal of hazardous materials*, 189(1-2), 519-525.
- Ngeontae, W., Janrungratsakul, W., Maneewattanapinyo, P., Ekgasit, S., Aeungmaitrepirom, W. and Tuntulani, T. (2009). Novel potentiometric approach in glucose biosensor using silver nanoparticles as redox marker. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 137(1), 320-326.
- Nicholas, C. and Lewis, S. (1999). *Fundamentals of enzymology: the cell and molecular biology of catalytic proteins*. New York: Oxford University Press, 45-61.
- Noah, N. M. and Ndagili, P. M. (2022). Green synthesis of nanomaterials from sustainable materials for biosensors and drug delivery. *Sensors International*, 3, 100166.

- Park, S. (2019). Improvement of biosensor accuracy using an interference index detection system to minimize the interference effects caused by icterus and hemolysis in blood samples. *Analyst*, 144(17), 5223-5231.
- Parthiban, E., Manivannan, N., Ramanibai, R. and Mathivanan, N. (2019). Green synthesis of silver-nanoparticles from *Annona reticulata* leaves aqueous extract and its mosquito larvicidal and anti-microbial activity on human pathogens. *Biotechnology Reports*, 21, e00297.
- Pérez, J. A. C., Sosa-Hernández, J. E., Hussain, S. M., Bilal, M., Parra-Saldivar, R. and Iqbal, H. M. (2019). Bioinspired biomaterials and enzyme-based biosensors for point-of-care applications with reference to cancer and bio-imaging. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 168-176.
- Perumal, V. and Hashim, U. (2014). Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *Journal of Applied Biomedicine*, 12(1), 1-15.
- Piovesan, J. V., Santana, E. R. and Spinelli, A. (2020). A carbon paste electrode improved with poly (ethylene glycol) for tannic acid surveillance in beer samples. *Food Chemistry*, 326, 127055.
- Popov, A., Aukstakojyte, R., Gaidukevic, J., Lisyte, V., Kausaite-Minkstimiene, A., Barkauskas, J. and Ramanaviciene, A. (2021). Reduced graphene oxide and polyaniline nanofibers nanocomposite for the development of an amperometric glucose biosensor. *Sensors*, 21(3), 948.
- Rafique, M., Sadaf, I., Rafique, M. S. and Tahir, M. B. (2017). A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(7), 1272-1291.
- Rai, M., Yadav, A. and Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27(1), 76-83.
- Rajeshkumar, S., Bharath, L. V. and Geetha, R. (2019). *Broad spectrum antibacterial silver nanoparticle green synthesis: Characterization, and mechanism of action*. In *Green synthesis, characterization and applications of nanoparticles*. New York: Elsevier, 429-444.
- Ramu, P., Vimal, S. P., Suresh, P., Saravanakumar, U., Sethuraman, V. and Anandhavelu, S. (2021). electrochemically deposited porous graphene– polypyrrole– polyphenol oxidase for dopamine biosensor. *Electroanalysis*, 33(3), 774-780.
- Ravichandran, V., Vasanthi, S., Shalini, S., Shah, S. A. A., Tripathy, M. and Paliwal, N. (2019). Green synthesis, characterization, antibacterial, antioxidant and photocatalytic activity of *Parkia speciosa* leaves extract mediated silver nanoparticles. *Results in Physics*, 15, 102565.
- Remya, V. R., Abitha, V. K., Rajput, P. S., Rane, A. V. and Dutta, A. (2017). Silver nanoparticles green synthesis: a mini review. *Angewandte Chemie*, 3(2), 165-171.
- Ren, X., Meng, X., Chen, D., Tang, F. and Jiao, J. (2005). Using silver nanoparticle to enhance current response of biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(3), 433-437.

Resmi Gazete (1983). *Çevre kanunu*, 18132, 1 Temmuz 1983.

Resmi Gazete (1995). *Atık yönetimi yönetmeliği*, 29314, 2 Nisan 1995.

Rodríguez-Félix, F., López-Cota, A. G., Moreno-Vásquez, M. J., Graciano-Verdugo, A. Z., Quintero-Reyes, I. E., Del-Toro-Sánchez, C. L. and Tapia-Hernández, J. A. (2021). Sustainable-green synthesis of silver nanoparticles using safflower (*Carthamus tinctorius* L.) waste extract and its antibacterial activity. *Heliyon*, 7(4), e06923.

Sadeghi, B. and Gholamhoseinpoor, F. (2015). A study on the stability and green synthesis of silver nanoparticles using *Ziziphora tenuior* (Zt) extract at room temperature. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 134, 310-315.

Safi, T. (2018). *Çay atıklarından yararlanarak çay özütü miktarının artırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize.

Sağbaş, B. and Durakbaşı, N. (2010). Tıbbi ölçüm ve analizlerde kullanılan biyosensörler. *Engineer ve The Machinery Magazine*, 2(3), 125-145.

Saraç, A. O. (2015). *Evsel atık değerlendirme tesisi enerji-ekonomi analizi ve Kocaeli ili için uygulama*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Enerji Enstitüsü, İstanbul, 25-32.

Saranyaadevi, K., Subha, V., Ravindran, R. E. and Renganathan, S. (2014). Green synthesis and characterization of silver nanoparticle using leaf extract of *Capparis zeylanica*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 7, 44-48.

Sassolas, A., Blum, L. J. and Leca-Bouvier, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30(3), 489-511.

Savage, N. and Diallo, M. S. (2005). Nanomaterials and water purification: opportunities and challenges. *Journal of Nanoparticle Research*, 7, 331-342.

Savithramma, N., Rao, M. L., Rukmini, K. and Devi, P. S. (2011). Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by using medicinal plants. *International Journal of ChemTech Research*, 3(3), 1394-1402.

Schenck, F. W. (2000). *Glucose and glucose-containing syrups*. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. New York: Wiley, 86-92.

Shan, D., Wang, S., He, Y. and Xue, H. (2008). Amperometric glucose biosensor based on in situ electropolymerized polyaniline/poly (acrylonitrile-co-acrylic acid) composite film. *Materials Science and Engineering*, 28(2), 213-217.

Shan, G., Surampalli, R. Y., Tyagi, R. D. and Zhang, T. C. (2009). Nanomaterials for environmental burden reduction, waste treatment, and nonpoint source pollution control: a review. *Frontiers of Environmental Science ve Engineering in China*, 3, 249-264.

Shankar, P. D., Shobana, S., Karuppusamy, I., Pugazhendhi, A., Ramkumar, V. S., Arvindnarayan, S. and Kumar, G. (2016). A review on the biosynthesis of metallic

- nanoparticles (gold and silver) using bio-components of microalgae: Formation mechanism and applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 95, 28-44.
- Sharma, V. K., Yngard, R. A. and Lin, Y. (2009). Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, 145(1-2), 83-96.
- Singh, J., Dutta, T., Kim, K. H., Rawat, M., Samddar, P. and Kumar, P. (2018). 'Green' synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1), 1-24.
- Sistan, P., Sofimaryo, L., Masoudi, Z. R., Sayad, A., Rahimzadeh, R. and Salehi, B. (2014). A penicillin biosensor by using silver nanoparticles. *International Journal of Electrochemical Science*, 9, 6201-6212.
- Sriranjani, R., Srinithya, B., Vellingiri, V., Brindha, P., Anthony, S. P., Sivasubramanian, A. and Muthuraman, M. S. (2016). Silver nanoparticle synthesis using Clerodendrum phlomidis leaf extract and preliminary investigation of its antioxidant and anticancer activities. *Journal of Molecular Liquids*, 220, 926-930.
- Su, L., Jia, W., Hou, C. and Lei, Y. (2011). Microbial biosensors: a review. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5), 1788-1799.
- Tao, Z., Dong, B., Teng, Z. and Zhao, Y. (2020). The classification of enzymes by deep learning. *IEEE Access*, 8, 89802-89811.
- Tashkhourian, J., Hormozi-Nezhad, M. R., Khodaveisi, J. and Dashti, R. (2011). A novel photometric glucose biosensor based on decolorizing of silver nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 158(1), 185-189.
- Thakkar, K. N., Mhatre, S. S. and Parikh, R. Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(2), 257-262.
- Tian, Y., Wang, F., Liu, Y., Pang, F. and Zhang, X. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles on nitrogen-doped graphene for hydrogen peroxide detection. *Electrochimica Acta*, 146, 646-653.
- Tiftik, B. E. (2006). *Çay fabrikası atığının pirolizi ve piroliz ürünlerinin incelenmesi*. Yüksek Lisans, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 32-45.
- Tîlmaciu, C. M. and Morris, M. C. (2015). Carbon nanotube biosensors. *Frontiers in Chemistry*, 3, 59.
- Tran, Q. H. and Le, A. T. (2013). Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 4(3), 033001.
- Umadevi, M., Shalini, S. and Bindhu, M. R. (2012). Synthesis of silver nanoparticle using D. carota extract. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 3(2), 025008.

- Uzumer, T.Y., (2015). *Kanda glukoz tayini için yeni bir biyosensör hazırlanması*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 5-75.
- Vadlapudi, V. and Kaladhar, D. S. V. G. K. (2014). Green synthesis of silver and gold nanoparticles. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 19(6), 834-842.
- Vijayaraghavan, K., Nalini, S. K., Prakash, N. U. and Madhankumar, D. (2012). One step green synthesis of silver nano/microparticles using extracts of *Trachyspermum ammi* and *Papaver somniferum*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 94, 114-117.
- Vinson, J. A. and Dabbagh, Y. A. (1998). Tea phenols: antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. *Nutrition Research*, 18(6), 1067-1075.
- Vinson, J. A., Teufel, K. and Wu, N. (2004). Green and black teas inhibit atherosclerosis by lipid, antioxidant, and fibrinolytic mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3661-3665.
- Walker, R. W., Dumke, K. A. and Goran, M. I. (2014). Fructose content in popular beverages made with and without high-fructose corn syrup. *Nutrition*, 30(7-8), 928-935.
- Wang, H., Wang, X., Zhang, X., Qin, X., Zhao, Z., Miao, Z. and Chen, Q. (2009). A novel glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase onto gold nanoparticles-modified Pb nanowires. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(1), 142-146.
- Wang, J. (2006). Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(10), 1887-1892.
- Wang, L., Gao, X., Jin, L., Wu, Q., Chen, Z. and Lin, X. (2013). Amperometric glucose biosensor based on silver nanowires and glucose oxidase. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 176, 9-14.
- Wilson, R. and Turner, A. P. F. (1992). Glucose oxidase: an ideal enzyme. *Biosensors and Bioelectronics*, 7(3), 165-185.
- Wohlfahrt, G., Witt, S., Hendle, J., Schomburg, D., Kalisz, H. M. and Hecht, H. J. (1999). 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 55(5), 969-977.
- Wong, C. M., Wong, K. H. and Chen, X. D. (2008). Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 927-938.
- Wong, J. T. F. (1975). *Kinetics of enzyme mechanisms*. New York: Academic Press, 102-106.
- Wu, B., Zhang, G., Shuang, S. and Choi, M. M. (2004). Biosensors for determination of glucose with glucose oxidase immobilized on an eggshell membrane. *Talanta*, 64(2), 546-553.

- Xin, Q. and Wightman, R. M. (1997). Enzyme modified amperometric sensors for choline and acetylcholine with tetrathiafulvalene tetracyanoquinodimethane as the electron-transfer mediator. *Analytica Chimica Acta*, 341(1), 43-51.
- Xu, Z. P., Zeng, Q. H., Lu, G. Q. and Yu, A. B. (2006). Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chemical Engineering Science*, 61(3), 1027-1040.
- Xue, H., Shen, Z. and Li, Y. (2001). Polyaniline–polyisoprene composite film based glucose biosensor with high permselectivity. *Synthetic Metals*, 124(2-3), 345-349.
- Yadav, S., Kumar, A. and Pundir, C. S. (2011). Amperometric creatinine biosensor based on covalently coimmobilized enzymes onto carboxylated multiwalled carbon nanotubes/polyaniline composite film. *Analytical Biochemistry*, 419(2), 277-283.
- Yang, L., Ren, X., Tang, F. and Zhang, L. (2009). A practical glucose biosensor based on Fe₃O₄ nanoparticles and chitosan/nafiion composite film. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(4), 889-895.
- Yang, X., Zhou, Z., Xiao, D. and Choi, M. M. (2006). A fluorescent glucose biosensor based on immobilized glucose oxidase on bamboo inner shell membrane. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(8), 1613-1620.
- Yola, M. L., Eren, T. and Atar, N. (2014). A novel and sensitive electrochemical DNA biosensor based on Fe@ Au nanoparticles decorated graphene oxide. *Electrochimica Acta*, 125, 38-47.
- Zäch, M., Hägglund, C., Chakarov, D. and Kasemo, B. (2006). Nanoscience and nanotechnology for advanced energy systems. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 10(3-4), 132-143.
- Zhang, S., Zhao, H. and John, R. (2001). Development of a quantitative relationship between inhibition percentage and both incubation time and inhibitor concentration for inhibition biosensors—theoretical and practical considerations. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(9-12), 1119-1126.
- Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W. and Gurunathan, S. (2016). Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1534.



Gazili olmak ayrıcalıktır