



**T.C.**

**ORDU ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İLETKEN POLİMER TABANLI ORGANOFOSFORLU  
PESTİSİT TAYİNİNE YÖNELİK AMPEROMETRİK  
BİYOSENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

**HÜZEYFE ÇELİK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ORDU 2022**

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan ve kullanılan intihal tespit programının sonuçlarına göre; bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

**HÜZEYFE ÇELİK**

**Bu çalışma Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün B-2111 numaralı projesi ile desteklenmiştir.**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

# İLETKEN POLİMER TABANLI ORGANOFOSFORLU PESTİSİT TAYİNİNE YÖNELİK AMPEROMETRİK BİYOSENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ

HÜZEYFE ÇELİK

ORDU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ, 63 SAYFA

(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. SANIYE SÖYLEMEZ)

Tarımsal uygulamalarda pestisitler etkin bir biçimde kullanılmaktadır. Özellikle organofosfor bileşiklerinin çeşitli organizmalar, besin zinciri ve tarım işçilerinin üzerindeki yan etkilerinin zararları açıkça bilinmektedir. Elektrokimyasal pestisit biyosensörleri düşük maliyet, kolay hazırlanma ve yerinde analize imkan sağladığından HPLC, GC ve LC/MS/MS gibi geleneksel yöntemlere göre daha etkili bir alternatiftir. İletken polimerler üstün özelliklerinden dolayı biyosensör tasarımlarında kullanılmaya elverişli malzemedirler. İletken polimerlerin biyosensör teknolojisiyle kombinasyonları, enzimlerin elektrot yüzeyine pratik bir şekilde immobilizasyonunu sağlarken, hızlı elektron iletimiyle de elektrokimyasal cevap süresini kısaltmakta ve biyosensörün kararlılığını arttırmaktadır.

Bu çalışmada, organofosfat pestisiti olan paroksonun amperometrik tayinine yönelik asetilkolinesteraz (AChE) enzimini temel alan iletken polimer tabanlı pratik bir biyosensör hazırlanması hedeflenmiştir. Öncelikle, grafit elektrot yüzeyinde poli-2,2'-(9,9-dioktil-9h-floren-2,7-diyl)bistiyofen, Poli(BT) olarak adlandırılan polimer elektrokimyasal yöntemle sentezlenmiştir. Polimerin grafit elektrot yüzeyinde biriktirilmesinden sonra, AChE enzimi için bir immobilizasyon matriksi olarak kullanılmıştır. Poli(BT)/AChE biyosensörünün analitik performansını incelemek için, amperometrik ölçümler üçlü elektrot sistemi kullanılarak sabit bir potansiyelde gerçekleştirilmiştir. Biyosensör sisteminin yüzey ve elektrokimyasal özellikleri SEM, EDX ve CV teknikleri kullanılarak karakterize edilmiştir. Çalışma koşulları optimize edildikten sonra, asetiltiyokolün klorür (AThCl) tespiti için analitik performans parametreleri belirlenmiştir. Ek olarak, geliştirilen biyosensör süt ve çeşme suyu örneklerinde etkin bir şekilde pestisit tespiti için kullanılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** AChE, Elektrokimyasal Biyosensör, Enzim Immobilizasyonu, İletken Polimer, Organofosfat Pestisitleri.

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT OF CONDUCTIVE POLYMER BASED AMPEROMETRIC BIOSENSORS FOR THE DETECTION OF ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDES

HÜZEYFE ÇELİK

ORDU UNIVERSITY INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED  
SCIENCES

CHEMISTRY

MASTER THESIS, 63 PAGES

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF.DR. SANIYE SÖYLEMEZ)

In growing crops, use of pesticides especially organophosphorous pesticides is extensive. It is well known that these pesticides' side effects on various organisms, food chain and the men work in field are dangerous. Electrochemical pesticide biosensors are more effective alternative to traditional methods such as HPLC, GC and LC/MS/MS since they provide low cost, easy preparation, and on-site analysis. Conducting polymers are suitable materials for biosensor designs due to their superior properties. Combinations of conductive polymers with biosensor technology enable the enzymes to be immobilized to the electrode surface in a practical, while shortening the electrochemical response time with fast electron conduction and increasing the stability of the biosensor.

In this study, it was aimed to prepare a conductive polymer-based practical biosensor based on acetylcholinesterase (AChE) enzyme for the amperometric determination of paraoxon, an organophosphate pesticide. First of all, the synthesis of the polymer called poly-2,2'-(9,9-dioctyl-9h-fluorene-2,7-diyl)bistiophene, Poly(BT) on the graphite electrode surface was carried out by electrochemical method. After the polymer was deposited on the graphite electrode surface, it was used as an immobilization matrix for the AChE enzyme. To examine the analytical performance of the Poly(BT)/AChE biosensor, amperometric measurements were taken at a constant potential using a three electrode system. The surface and electrochemical properties of the biosensor system were characterized using SEM, EDX and CV techniques. After working conditions were optimized, analytical performance was identified for AThCl detection. In addition, the developed biosensor was used for pesticide detection in milk and tap water samples, effectively.

**Keywords:** AChE, Conducting Polymer, Electrochemical Biosensor, Enzyme Immobilization, Organophosphorus Pesticides.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimleri ile her zaman yanımda olan yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, bana yol gösteren ve birlikte çalışmaktan gurur ve mutluluk duyduğum değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Saniye SÖYLEMEZ'e çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen abim Muhammet ÇELİK'e, varlığı ile bana her zaman güç veren başarımın ana kaynağı olarak nitelendirdiğim kız kardeşim Üzüm'e, anneme, babama ve diğer erkek kardeşim Rahim ÇELİK'e çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (ODÜBAP) tarafından B-2111 numaralı proje ile desteklenmiştir. Projeye sağlanan imkânlardan dolayı teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>TEZ BİLDİRİMİ</b> .....	I
<b>ÖZET</b> .....	II
<b>ABSTRACT</b> .....	III
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	IV
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	V
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	VII
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b> .....	IX
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ</b> .....	X
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1 İletken Polimerler.....	3
2.2 İletken Polimerlerin Sentezi .....	4
2.2.1 Kimyasal Polimerizasyon.....	4
2.2.2 Elektrokimyasal Polimerizasyon.....	5
2.3 Biyosensörler .....	6
2.3.1 Biyosensörlerin Sınıflandırılması .....	7
2.3.1.1 Elektrokimyasal Biyosensörler .....	8
2.3.1.1.1 Amperometrik Biyosensörler.....	9
2.4 İletken Polimerlerin Biyosensör Uygulamalarındaki Önemi.....	11
2.5. Enzimler .....	12
2.5.1 Asetilkolinesteraz Enzimi .....	13
2.6 Biyosensörlerde Kullanılan İmmobilizasyon Yöntemleri.....	14
2.7 Asetilkolinesteraz İnhibitörleri.....	16
2.7.1 Pestisitler.....	17
2.7.1.1 Organofosforlu Pestisitler .....	18
2.7.1.2 Pestisitlerin Çevre ve Canlılar Üzerindeki Etkileri.....	20
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	22
3.1 Reaktifler.....	22
3.2 Kullanılan Cihaz ve Sistemler.....	22
3.3 Çözeltilerin Hazırlanması.....	23
3.4 Poli(BT)/AChE Biyosensörün Hazırlanması .....	24
3.5 Hazırlanan Biyosensörün Amperometrik Ölçüm Prensibi.....	25
3.6 AChE Temelli Biyosensör Optimizasyon Çalışmaları .....	26
3.6.1 Çalışma Potansiyelinin Biyosensör Cevabına Etkisi .....	26
3.6.2 Poli(BT) Film Kalınlığı Belirlenmesi .....	26
3.6.3 Enzim Miktarının Belirlenmesi.....	27
3.6.4 Çapraz Bağlayıcı Miktarının Belirlenmesi.....	27
3.6.5 pH Optimizasyonu .....	27
3.6.6 Pestisit İnkübasyon Süresi Tespiti .....	27
3.7 Poli(BT) ve Poli(BT)/AChE Modifiye Edilmiş Yüzeylerin Elektrokimyasal ve Morfolojik Karakterizasyonu .....	28
3.8 Biyosensörün Analitik Karakterizasyonuna İlişkin Çalışmalar .....	28
3.9 AChE İnhibisyon Deneyleri.....	29

3.9.1 Hazırlanan Biyosensörün Pestisit Tayinine Yönelik Elektrokimyasal Ölçüm Prensibi.....	29
3.9.2 Süt ve Çeşme Suyu Örneklerinde AChE Biyosensörü ile Pestisit Analizi .....	30
<b>4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....</b>	<b>31</b>
4.1 Elektropolimerizasyon ile Poli(BT) Sentezi .....	32
4.2 AChE Esaslı Amperometrik Biyosensör Optimizasyonu Sonuçları.....	33
4.2.1 Uygulama Potansiyelinin Belirlenmesi .....	34
4.2.2 Poli(BT) Film Kalınlığının Belirlenmesi .....	35
4.2.3 Enzim Miktarının Belirlenmesi .....	36
4.2.4 Çapraz Bağlayıcı Miktarının Belirlenmesi.....	37
4.2.5 pH Optimizasyonu .....	38
4.3 Poli(BT) ve Poli(BT)/AChE Modifiye Edilmiş Yüzeylerin Elektrokimyasal ve Morfolojik Karakterizasyonu .....	39
4.4 Poli(BT)/AChE Biyosensörünün Analitik Uygulamaları .....	43
4.4.1 Kalibrasyon Eğrisi Ve Dedeksiyon Limiti.....	43
4.4.2 Tekrarlanabilirlik ve Operasyonel Kararlılık .....	44
4.4.3 Girişimci Etkisi .....	45
4.5 AChE İnhibisyon Deneyleri.....	46
4.5.1 Poli(BT)/AChE Biyosensörü ile Parokson Tayini .....	46
4.5.2 Örnek Uygulama .....	50
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	51
6. <b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>55</b>
ÖZGEÇMİŞ .....	63

## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Bazı iletken polimerlerin yapısı.....	4
Şekil 2.2 Tiyofenin elektrokimyasal polimerizasyon mekanizması .....	6
Şekil 2.3 Biyosensörün şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.4 1. nesil (A), 2. nesil (B) ve 3. nesil (C) enzim bazlı amperometrik biyosensörlerin çalışma prensibi (Soylemez ve Kurbanoglu, 2021).....	11
Şekil 2.5 AChE'nin kataliz reaksiyonu (Koçancı ve Aslım, 2016).....	14
Şekil 2.6 Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	16
Şekil 2.7 Pestisitlerin genel yapısı (A) ve AChE biyosensörlerinde kullanılan çeşitli OP bileşikli pestisitlerin yapıları (B) (Pundir ve Chauhan, 2012) .....	19
Şekil 2.8 Chlorpyrifos pestisiti tarafından asetilkolinesterazın inhibisyonu (Račáková ve ark., 2006'dan adapte edilmiştir).....	20
Şekil 3.1 BT monomerinin elektrokimyasal polimerizasyonu .....	24
Şekil 3.2 Poli(BT)/AChE biyosensörünün hazırlanmasının şematik gösterimi .....	25
Şekil 3.3 Substrat eklemeyen önce ve sonra enzimatik reaksiyona bağlı akım değişimi ve amperometrik ölçüm sistemi .....	26
Şekil 3.4 Pestisit tayini için amperometrik ölçüm sistemi.....	30
Şekil 3.5 Parokson pestisitinin yapısı .....	30
Şekil 4.1 Parokson tayini için Poli(BT)/AChE biyosensörünün oluşumunun şematik gösterimi.....	32
Şekil 4.2 BT'nin grafit üzerinde 100 mVs <sup>-1</sup> tarama hızında elektrot yüzeyine 0.1 M NaClO <sub>4</sub> /LiClO <sub>4</sub> /ACN elektrolit-çözücü sisteminde polimerleşmesinin dönüşümsel voltamogramı (Döngü sayısı 10).....	33
Şekil 4.3 Çalışma potansiyelinin belirlenmesi (50 mM, pH = 7 fosfat tamponu, 25 °C). Hata çubukları, üç ölçümün standart sapmasını (SD) göstermektedir ([A <sub>ThCl</sub> ]: 4.0 mM).....	35
Şekil 4.4 Poli(BT) kalınlığının biyosensöre etkisi (50 mM, pH = 7 fosfat tamponu, 25 °C) .....	36
Şekil 4.5 Enzim miktarının biyosensör yanıtına etkisi (50 mM, pH = 7 fosfat tamponu, 25 °C).....	37
Şekil 4.6 Biyosensör yanıtına çapraz bağlayıcı (GA) etkisi (50 mM, pH = 7 fosfat tamponu, 25 °C) .....	38
Şekil 4.7 pH değişiminin biyosensöre etkisi (50 mM, pH 7 fosfat tamponu, 25 °C).....	39
Şekil 4.8 Boş grafit elektrot, Poli(BT) ve Poli(BT)/AChE'in sırasıyla döngüsel voltagramları .....	40
Şekil 4.9 A ve B Poli(BT) (5000x ve 10000x büyütmede); C ve D Poli(BT)/AChE için (5000x ve 10000x büyütmede) SEM görüntüleri .....	41
Şekil 4.10 Poli(BT) modifiye elektrot için EDX analiz sonuçları .....	42
Şekil 4.11 Poli(BT)/AChE modifiye elektrot için EDX analiz sonuçları.....	42
Şekil 4.12 Poli(BT)/AChE ile hazırlanan biyosensörünün A <sub>ThCl</sub> kalibrasyon eğrisi (50 mM, pH 7 fosfat tamponu çalışma ortamı; 25 °C, +0.6 V çalışma potansiyeli; hata çubukları üç ölçümün standart sapmasını gösterir).....	44
Şekil 4.13 Bazı kimyasal bileşiklerin biyosensör cevabına etkisi (50 mM, pH 7 fosfat tamponu içerisinde; 25 °C, +0.6 V çalışma potansiyeli).....	46
Şekil 4.14 Poli(BT)/AChE biyosensöründe inhibisyon inkübasyon süresi optimizasyonu .....	47



**Şekil 4.15** Parokson için kalibrasyon eğrisi (50 mM, pH 7 fosfat tamponu içerisinde; +0.6 V çalışma potansiyeli, 10 dk. inkübasyon süresi)..... 48

## ÇİZELGE LİSTESİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Çizelge 4.1</b> Poli(BT)/AChE biyosensörünün analitik performans değerleri .....	45
<b>Çizelge 4.2</b> Literatürde parokson analizine yönelik AChE biyosensörleri.....	49
<b>Çizelge 4.3</b> Musluk suyu ve süt örneklerinde parokson tayini geri kazanım çalışmalarının sonuçları. ....	50

## SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

---

<b>AChE</b>	:	Asetilkolinesteraz
<b>AThCl</b>	:	Asetiltiyokolin Klorür
<b>BChE</b>	:	Bütirilkolinesteraz
<b>BT</b>	:	Bistiyofen
<b>CV</b>	:	Dönüşümlü Voltametri
<b>DDT</b>	:	Dikloro Difenil Trikloroethan
<b>EDX</b>	:	Enerji Dağılımı X-ışını Spektroskopisi
<b>GC</b>	:	Gaz Kromatografisi
<b>GE</b>	:	Grafit Elektrot
<b>HPLC</b>	:	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>İP</b>	:	İletken Polimer
<b>LC/MS/MS</b>	:	Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi/Kütle Spektrometresi
<b>OP</b>	:	Organofosfatlar
<b>PAc</b>	:	Poliasetilen
<b>Poli(BT)</b>	:	Poli(BT)
<b>SEM</b>	:	Taramalı Elektron Mikroskobu

---

## 1.GİRİŞ

Pestisitler (tarım ilaçları) dünya çapında tarımda yaygın olarak kullanılmaktadır. Kullanılan pestisitler (parokson, paratiyon metil vb.) canlıların beyindeki kolinesteraz enzimlerinin aktivitesini inhibe ederek, merkezi sinir sisteminde çeşitli hasarlara yol açmaktadırlar. Bunun yanı sıra, sergilemiş oldukları nörotoksik etki ile sinirsel iletileri engellerler. Dolayısıyla, bu grup pestisitlerin gerek çevresel örneklerde gerekse fizyolojik sıvılarda analizleri oldukça önemlidir. Bunlara ek olarak, Alzheimer hastalığı, Lewy body hastalığı, bunaklık gibi bozukluklarda asetilkolin üretimi azalır. Sonuç olarak da sinir iletişimi daha az verimli olur ve beyin ve vücut fonksiyonlarında gerilemeye neden olur. Pestisit tayinleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografi (GC) ve sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi (LC/MS/MS) gibi geleneksel yöntemlerle yapılabilmektedir. Bu yöntemler maliyeti yüksek, vakit alıcı, uzun örnek hazırlama aşamaları içeren ve uzmanlık gerektiren yöntemlerdir. Analitik yöntemler arasında “Elektroanalitik Yöntemler” pratikliği, kolaylığı, çoğu zaman ön örnek hazırlama işlemlerine gereksinim duymaması gibi avantajlarından dolayı oldukça ilgi çekmektedir (Skoog ve ark., 1998; Wang, 2005).

İletken polimerler (İP) göze çarpan özellikleri sayesinde çeşitli uygulamalarda rahatlıkla kullanılabilirler. Biyosensör hazırlanmasında, iletken polimerlerin enzim matrisi olarak kullanılması yaygın bir yöntem haline gelmiştir. Matrislere fiziksel ya da kimyasal yollarla immobilize edilen enzimler, katalitik aktivitelerini koruyarak birden fazla kullanıma olanak sağlarlar. Yüzey modifikasyonu biyosensör uygulamalarında büyük önem arz eder. İletken polimer temelli biyosensörler, biyomoleküllerin elektrot yüzeyine pratik bir şekilde ve çoğu zaman tek adımda immobilizasyonunu sağlaması, hızlı elektron iletimiyle elektrokimyasal cevap süresini kısaltması ve biyosensörün kararlılığını arttırması gibi avantajlara sahiptirler. İletken polimerler ile kaplı elektrotlar farklı maddelerin (analitlerin) tayininde kullanılmaya elverişli malzemelerdir. Çıplak elektrotlara kıyasla bu polimerler ile kaplı yüzeylerin elektrokimyasal cevapları daha hassas, seçici, hızlı ve duyarlıdır. Analit miktarına karşı elektrokimyasal sistemde oluşan cevabın elektriksel sinyale dönüştürüldüğü bu sistemlere ise genel olarak “Elektrokimyasal Sensör” denilmektedir. Bu tip sensörlerin tıp, eczacılık, biyokimya, savunma sanayi, tekstil, tarım, gıda ve çevre analizleri başta

olmak üzere birçok alanda uygulaması mevcuttur. Elektrokimyasal biyosensörler, ekonomik olmaları, duyarlı ve güvenilirliği yüksek sistemler olmalarının yanı sıra boyut olarak da küçük oluşları ve yeni portatif elektrokimyasal ünitelerin tasarımı ile de avantaja sahiptir. Ayrıca, elektrokimyasal yöntemler çoğu zaman karışık matriks ve doğal örnek ortamında tayini yapılacak maddenin seçimli tayinine olanak sunması nedeniyle oldukça rağbet görmektedirler (Wang, 2005; Soylemez ve ark., 2017).

Bu tez çalışmasında, organofosforlu pestisitler sınıfında yer alan parokson tayini için asetilkolinesteraz (AChE) temelli amperometrik biyosensör geliştirilmiştir. Bu amaçla, grafit elektrot (GE) üzerinde bistiyofen (BT) monomeri elektrokimyasal olarak sentezlenmiştir ve asetilkolin esteraz (AChE) biyosensöründe elektro-aktif tabaka olarak kullanılmıştır. Oluşturulan bu iletken polimer modifiye AChE biyosensörü çeşme suyu ve süt örneklerinde parokson tayini için kullanılmıştır. Optimum koşullarda hazırlanan biyosensörün dönüşümlü voltametri (CV), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) ile karakterizasyonu yapılmıştır. Başarı ile hazırlanan biyosensörün kararlılığı, raf ömrü ve uygulanabilirliği kanıtlanmıştır. En zararlı pestisitlerden biri olan paraokson tayini hazırlanan biyosensör ile başarılı bir şekilde girişim etkisi gözlenmeden gerçekleştirilerek doğrulukları ve pratikçe uygulanabilirlikleri araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 İletken Polimerler

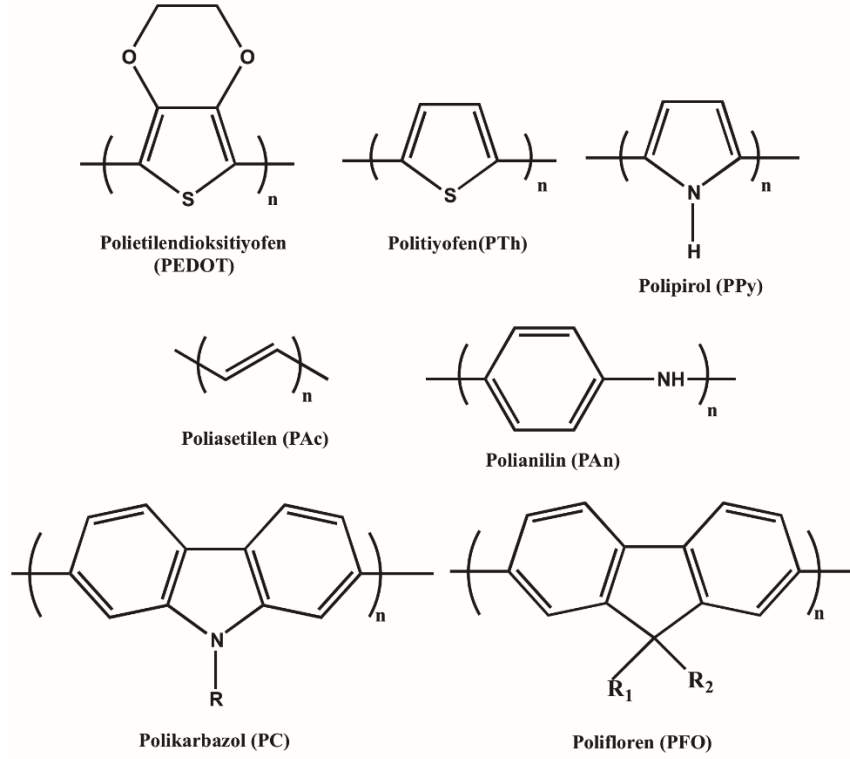
Monomer olarak adlandırılan çok sayıda basit moleküllerin kovalent bağlarla bağlanarak oluşturulan uzun zincir yapılı makromoleküller polimer olarak adlandırılmaktadır. Polimerler ilk keşfedildikleri zaman yalıtkan madde olarak bilinirlerdi. Metallerin yüksek elektrik iletkenliği ve üstün mekaniksel özelliklerine rağmen esnek olmamaları, ağır olmaları ve işlenmeleri zor olması gibi dezavantajlara sahip olmaları endüstrideki kullanımlarını sınırlandırmıştır. Bu sebeple metallerin elektriksel iletkenlikleri ile polimerlerin özelliklerini barındıran yeni maddeleri üretmek için günümüze kadar çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar polimerlerle metallerin kompozitinin yapılması ve iletken polimerlerin eldesi üzerine yoğunlaşmıştır (Saçak, 2010).

Konjuge polimerlere olan ilgi, poliasetilen (PAC)'in halojen buharlarına (iyot, klor veya flor) maruz bırakılarak katkılanmasıyla bu polimerin yükseltgendiğini ve iletkenliğinin artarak  $10^5$  S/cm seviyesine çıkmasıyla artmıştır (Shirakawa ve ark., 1977). Bu keşifle birlikte üç bilim adamı, Alan Heeger, Alan MacDiarmid ve Hideki Shirakawa 2000 yılı Kimya Nobel ödülüne layık görülmüştür.

Bir polimerin iletkenlik özelliği gösterebilmesi için, polimer omurgası boyunca konjuge çift bağlar içermesi gerekmektedir. Konjuge sistem, birbirini takip eden tekli ve çoklu bağlardan oluşan bir sistemdir. Bu moleküllerde iletkenlik pi ( $\pi$ ) orbitali ile sigma ( $\sigma$ ) bağı arasında gerçekleşecek etkileşim ile ya da çiftleşmemiş elektrona sahip  $\pi$  orbitalleri etkileşimiyle elde edilebilmektedir.

Poliasetilenin oksijen varlığında bozunması nedeniyle yeni iletken polimerlerin sentezlenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda özellikle polianilin (PANI), polipirol (PPy), politiyofen (PT) ve benzeri polimerler öne çıkmıştır. İP'ler iki farklı yöntem olan kimyasal yöntemlerle ve elektrokimyasal yöntemlerle sentezlenebilmektedirler. Günümüzde iletken, kararlı ve çözünebilir birçok İP'ler sentezlenerek, farklı uygulamalarda kullanılması sağlanmıştır. Polimerlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı, yeni iletken polimer tasarımları hedef haline getirilerek, tasarlanan monomerler (polimerin en küçük yapı taşı), enerji depolaması, elektrokataliz, biyoelektrokimya, sensörler, elektrokromik

ekranlar gibi birçok alanda ilerleme sağlamıştır. Bazı İP'lerin yapıları Şekil 2.1'de gösterilmektedir.



Şekil 2.1 Bazı iletken polimerlerin yapısı

## 2.2 İletken Polimerlerin Sentezi

Kimyasal ve elektrokimyasal polimerizasyon yöntemleri iletken polimerlerin sentezinden en çok tercih edilen yöntemlerdir. Bu yöntemler dışında fotokimyasal polimerizasyon, metatez polimerizasyonu, emülsiyon polimerizasyonu, katılma polimerizasyonu, katı faz polimerizasyonu, plazma polimerizasyonu ve piroliz yöntemi gibi farklı yöntemlerde iletken polimerler sentezinde kullanılmaktadır. İP'leri sentezlemek için çeşitli yöntemler mevcuttur, ancak en önemli yöntem uzun  $\pi$ -elektron konjugasyonuna sahip polimer zincirlerinin elde edildiği sentez yöntemidir (Kumar ve Sharma, 1998).

### 2.2.1 Kimyasal Polimerizasyon

Kimyasal polimerleşme yöntemi, monomerin uygun bir çözücü, sıcaklık ve katalizör eşliğinde bir asit, baz ya da tuzla indirgenip yükseltgenmesi ile gerçekleştirilir. Kimyasal sentezde asidik ortamda yükseltgen bir ajan olarak amonyum peroksidisülfat, demir iyonları, potasyum dikromat, amonyum persülfat,

hidrojen peroksit, serik nitrat gibi maddeler kullanılır (Campos ve ark., 1999; Malinauskas, 2001). Bu yöntemde katalizör monomer ile reaksiyona girerek önce oligomer daha sonra ise oligomerlerin birleşmesiyle de polimer oluşumu sağlanır. Kimyasal polimerleşme çok miktar polimerin üretimine olanak sağlasa da sentez ortamından meydana gelen yan ürünlerin uzaklaştırılma problemi nedeniyle dezavantajlı olmaktadır.

### **2.2.2 Elektrokimyasal Polimerizasyon**

Elektropolimerizasyon, elektroda dışardan bir potansiyel uygulanarak, bir destek elektrolit çözeltisi içerisinde çözünen monomerin yükseltgenmesiyle radikal katyonların oluşumunu kapsamaktadır. Çalışma elektrodu olarak altın, platin, grafit, karbon disk elektrot gibi çeşitli elektrotlar kullanılabilir. Çoğu konjüge polimerler elektrokimyasal yöntemle elde edilebilir. Elektropolimerizasyon potansiyostatik, galvanostatik ve potansiyodinamik gibi metotlarla yapılabilir.

Elektrokimyasal polimerizasyon diğer polimerizasyon çeşitlerine göre reaksiyonun oda sıcaklığında gerçekleşebilmesi, polimer film kalınlığının kontrol edilebilmesi, düşük maliyetli olması, uygulanan potansiyelin kontrolü ile yan reaksiyonların önlenmesi, yüksek saflıkta ürünlerin eldesi ve az miktarda monomer kullanımını gerektirmesi gibi avantajları bulunmaktadır (Uçan, 2015).

İP'lerin anodik elektrokimyasal polimerizasyonu, aşağıdaki basamakları takip ederek gerçekleşmektedir (Chandrasekhar, 1999).

1) Başlangıç basamağı, monomerin elektrokimyasal yükseltgenmesiyle radikal katyon oluşumu.

2) Büyüme basamağı,

(a) iki radikal katyonun birleşmesi ve yapıdan iki protonun ayrılarak dimer oluşumu.

(b) dimerin elektrokimyasal yükseltgenmesiyle dimer radikal katyon oluşumu.

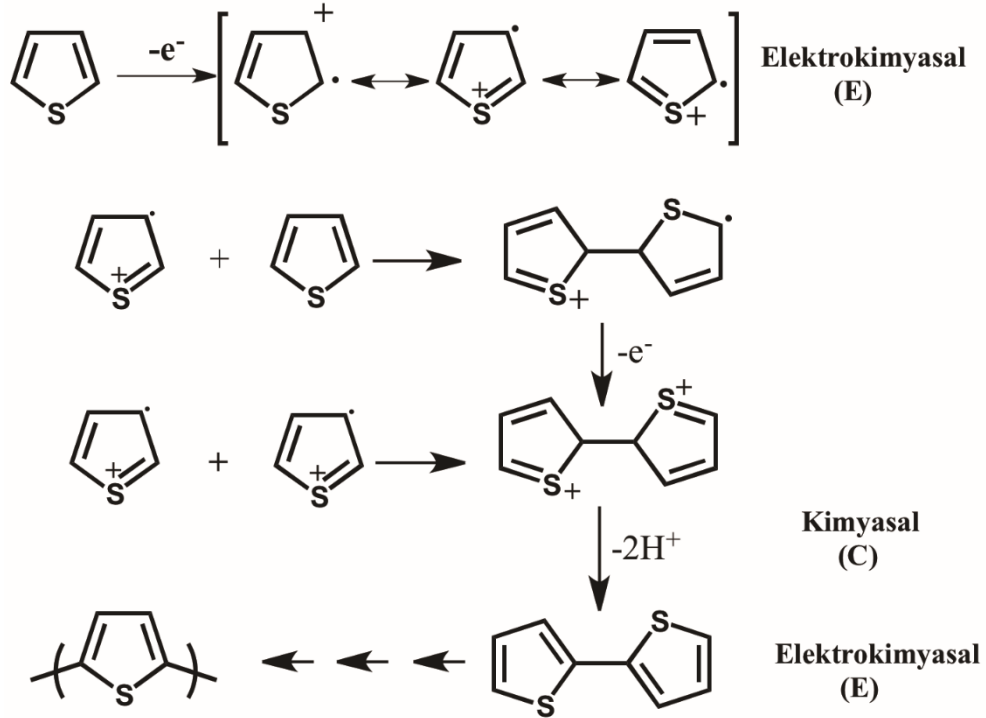
(c) dimer radikal katyonun, monomer radikal katyonla birleşmesi ve yapıdan iki protonun ayrılarak trimer oluşumu.

b ve c basamaklarının tekrarıyla oligomerlerin ve polimerlerin oluşumu.



3) Sonlanma basamağı, elektrot çevresindeki reaktif radikal türlerin bitmesiyle zincir büyüme işleminin sonlanması

Elektropolimerizasyon, genel bir ECE (Elektrokimyasal-Kimyasal-Elektrokimyasal) basamaklarının birbirini takip ederek ilerlemesiyle elektroaktif polimer oluşması ve elektrot yüzeyinde film oluşturmaya dayanmaktadır (Şekil 2.2.).



Şekil 2. 2 Tiyofenin elektrokimyasal polimerizasyon mekanizması

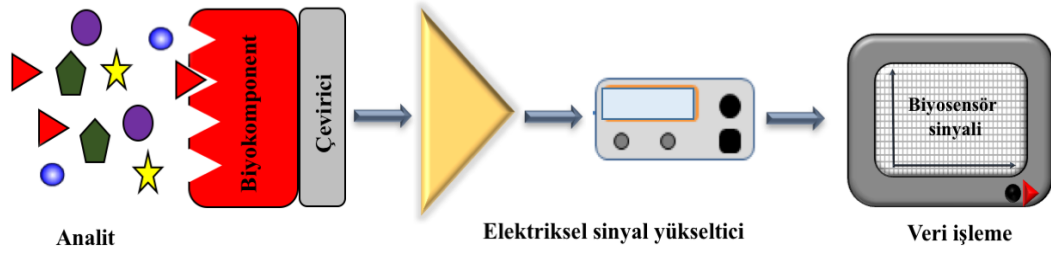
### 2.3 Biyosensörler

Biyosensörler; hedef analitin konsantrasyonuyla orantılı olarak ölçülebilir bir sinyal üreten, genellikle analitlerin tanınmasını sağlayacak olan biyolojik tanı materyalini içeren ve biyolojik etkileşimlerden türetilen sinyalleri bir fizikokimyasal çevirici yardımıyla ölçen analitik cihazlardır (Paddle,1996).

Biyosensörlerin tarihçesi 1950'li yılların ortalarında L.C. Clark'ın Cincinnati Hastanesi'nde (Ohio, ABD) bir ameliyat esnasında kanın oksijen miktarını bir elektrot yardımı ile izlemesiyle başlamaktadır. Clark'ın geliştirdiği bu çalışma kalp ameliyatlarında kullanılan ilk biyosensör olmuştur (Clark Jr, 1956). Sonrasında ise yine Clark ve arkadaşları 1962 yılında glikoz oksidaz (GOx) enzimini ve oksijen elektrodunu bir arada kullanarak kanın glikoz seviyesini ölçmeyi başarmışlardır. Bu çalışmalar biyosensör araştırmalarının başlangıcı olmuştur (Wang, 1999). Diyabet

hastaları için kan ve idrarda glikoz tayini eden GOx elektrodu ticari olarak ilk üretilen biyosensör olup 1975 yılında Yellow Springs Instruments firması tarafından Model 23A YSI olarak piyasaya sürülmüştür. Bu ticari ürünün ölçüm prensibi, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksitin amperometrik olarak ölçümüne dayanmaktadır. Daha sonraki yıllarda biyosensörlerin minyatüre edilmesi ve basitleştirilmesi ile çok daha pratik kandaki glikoz miktarını ölçebilecek cihazlar tasarlanmış ve piyasaya sunulmuştur.

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)'a göre biyosensör, “bir çevirici ile doğrudan temas halinde bulunan, bir biyolojik tanıma elemanı kullanarak ayrıntılı kantitatif ya da yarı kantitatif analitik bilgi temin edilen, kendi kendine yetebilen entegre bir cihaz” olarak tanımlanmaktadır. Aynı zamanda biyosensörler, hücreler, hücre reseptörleri, membranlar, organeller, enzimler, dokular ve organizma gibi biyolojik malzemelerin, bir “çevirici” ile birleştirilmesi ya da temas halinde bulunması ile oluşan analitik cihazlardır. Kimyasal ve biyolojik maddeleri hızlı analiz ve algılama yeteneğine sahip olan biyosensörler, sahip olunmak istenen ana bilgiyi, çevirici yardımı ile “sinyal” adı verilen ürüne çevirmektedir (Thevenot ve ark., 2001).



Şekil 2.3 Biyosensörün şematik gösterimi

### 2.3.1 Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler sinyal çevirici ve biyobileşenin türüne göre farklı şekillerde sınıflara ayrılmaktadırlar. Bir biyosensör sinyal çeviricinin türüne göre optik, kütle, ısı ölçüm sistemleri ve elektrokimyasal olmak üzere sınıflandırılabilir.

Optik biyosensörler, optik lifler üzerine belirlenen uygun bir yöntem ve molekülün immobilize edilmesiyle hazırlanan ölçüm aygıtları olarak tanımlanmaktadır. Ölçülen sinyal, ışığın yansımaları, saçılması veya yayılması sonucu

oluşan kimyasal ya da fizikokimyasal bir değişmeden kaynaklanabilmektedir. Enzim esaslı hazırlanan optik biyosensörler temelde adsorbsiyon, floresans, biyoluminesans gibi temel ilkeler çerçevesinde çalışırlar (Can, 2010).

Termal biyosensörlerde bir enzimatik reaksiyon sırasında entalpi değişiminden yararlanarak analit miktarının tayini prensibinden yararlanır. Çok küçük sıcaklık değişimleri termal olarak izole ortamlarda termistör veya termofiller yardımıyla takip edilmektedir. Analitin biyomolekül ile etkileşimi sonucunda meydana gelen sıcaklık değişimleri ile analitin konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkidenden yararlanılarak ölçümler izlenmektedir.

Piezoelektrik biyosensörler, kütle-frekans dönüştürücülerine duyarlıdır. Diğer bir deyişle, aktif yüzey ile temas halinde olan analitlerin yoğunluğu, viskozitesi veya kütlesindeki değişiklikleri algırlar. Kuvartz kristal mikrodenge (QCM) olarak da bilinmektedirler. QCM sisteminde kullanılmakta olan kuvartz kristallerin yüzeyine bağlanan madde miktarına göre sinyal üretilir.

Bu tür biyosensörlerin hepsinin belirli dezavantajları vardır. Optik biyosensörler çok hassas olmalarına rağmen bulanık ortamlarda kullanılamazlar. Termal biyosensörler çok az ısı değişimi durumunda sonuç veremez ve kullanımı kolay değildir. Bu nedenle, elektrokimyasal biyosensörler, diğer türlerin karşılaştığı dezavantajların çoğunun üstesinden gelme potansiyeline sahip oldukları için en çok tercih edilen biyosensör türü olarak ortaya çıkmaktadır. Örneğin, bulanık ortamlarda çalışılabilme elektrokimyasal sensörlerin en önemli avantajlarından biridir (Thevenot ve ark., 2001). Elektrokimyasal biyosensörlerin kullanımı kolaydır ve seçici, hassas, hızlı ve düşük maliyetli analiz sunarlar. Ayrıca, diğer biyosensör türleri arasında gerçek örneklerdeki performanslarının yüksek oluşu nedeniyle elektrokimyasal biyosensörler oldukça sık kullanılmakta ve ilgi çekmektedir (Song ve ark., 2016).

### **2.3.1.1 Elektrokimyasal Biyosensörler**

Elektrokimyasal biyosensörler, literatüre kazandırılan ilk biyosensör çeşidi olması nedeniyle diğer türlere kıyasla bilinen en eski biyosensörlerdir (Clark ve Lyons, 1962). Elektrokimyasal biyosensörler, bir biyokimyasal etkileşim sırasında elektrokimyasal türlerin harcanması veya oluşması sırasında ortaya çıkan elektroaktif sinyalin ölçülmesi temeline dayanır. Elektrokimyasal biyosensörler çevircinin türüne

göre dört sınıfa ayrılmaktadır (a) Amperometrik Biyosensörler; b) Potansiyometrik Biyosensörler; c) İletkenlik Biyosensörler; d) İmpedimetrik Biyosensörler). Elektrokimyasal tepkimeler sonucunda, elektrotlar arasındaki ortamın akımındaki değişiklik (amperometri), ölçülebilir potansiyel farkı (potansiyometri), ölçülebilir elektriksel iletkenlik değişimi (kondüktometri) veya elektrot ile çözelti ara yüzeyinde elektron aktarımına karşı olan direncin ölçülmesi (impedimetrik) prensibine göre meydana gelmektedir (Çolak, 2014). Elektrokimyasal biyosensörler birçok avantaja sahip olmalarından dolayı (hızlı, pratik ve ekonomik olmaları vb.) diğer fiziksel bileşenlere sahip türlere göre daha fazla tercih edilmektedir.

### **2.3.1.1.1 Amperometrik Biyosensörler**

Amperometrik biyosensörlerin geliştirilmesine büyük önem verilmiştir ve en çok tercih edilen biyosensör çeşitlerinden bir tanesidir. Clark ve Lyons'un amperometrik biyosensör çalışmaları farklı enzim türleri ile geniş uygulama alanına sahip olmuştur (Clark ve Lyons, 1962). Genel anlamda amperometri, sabit bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümü temeline dayanmaktadır. Amperometrik biyosensörler, analit ile biyobileşen arasındaki biyoetkileşim sonucu tepkimeye giren veya oluşan türlerin yükseltgenme ya da indirgenmesine bağlı olarak akımda meydana gelen değişikliğin ölçüldüğü sistemlerdir (Soylemez ve ark., 2017).

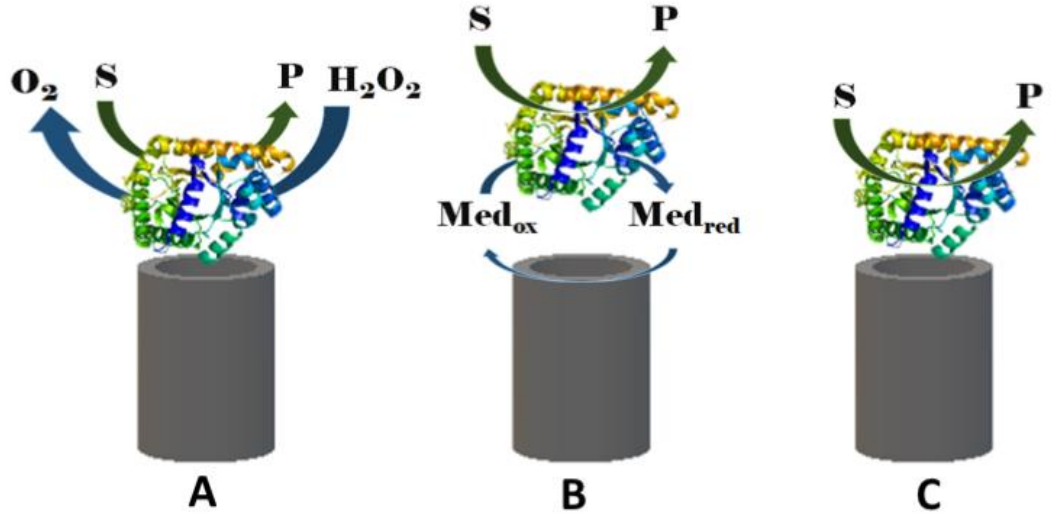
Enzim tabanlı amperometrik biyosensörler medyatörün yapısına ve enzim immobilizasyon yöntemine bağlı olarak birinci, ikinci ve üçüncü nesil olarak sınıflandırılabilirler. Bu farklı yaklaşımların şematik gösterimi Şekil 2.4'de verilmiştir. Amperometrik biyosensörlerin tasarımı için, redoks enzimi ve elektrotlar arasındaki elektronik bağlantı, enzimatik reaksiyonlar sırasında tüketilen ya da oluşan türlerin (birinci nesil biyosensörler) elektroaktivitesine, enzimin aktif merkezi ile elektrot yüzeyi arasında elektron transferini sağlayan aracılardan (medyatör) varlığına (ikinci nesil biyosensörler) veya medyatörsüz olarak enzimin aktif merkezi ile elektrot yüzeyi arasındaki elektron transferin doğrudan (üçüncü nesil biyosensörler) olması prensiplerine göre tanımlanmaktadır.

Birinci nesil enzim bazlı amperometrik glikoz biyosensörlerinde, oksijenin hidrojen peroksite indirgenmesi ve substratın ürününe dönüştürülmesi takip edilmektedir. Oksijen molekülü ( $O_2$ ), GOx-FAD rejenerasyonu için elektron alıcısı

olarak kullanılır. Bu nesil, O<sub>2</sub> tüketiminin veya H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşumunun ölçülmesine izin verir. Sabit potansiyel altında biyosensör cevapları, reaksiyon ortamındaki O<sub>2</sub> konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Birinci nesil enzim bazlı elektrotlarda, hidrojen peroksitin oksidasyonu (+0.68 V) takip edilir (Gerard ve ark., 2002). Yüksek potansiyel uygulaması, birinci nesil biyosensörlerin önemli bir dezavantajıdır (Albery ve ark., 1987; Karyakin ve ark., 1995). Bu dezavantajın üstesinden gelmek için, birinci nesil biyosensör sistemleri, küçük redoks aktif moleküller olan, enzimin aktif merkezi ile elektrot yüzeyi arasında elektron transferini sağlayan araçlar (medyatör) kullanılmaktadır.

Araçlar (ferrosen türevleri, ferrosiyanür, iletken organik tuzlar ve kinonlar), enzimlerin redoks aktif merkezi ile elektrot yüzeyi arasında elektron transferi sağlayan küçük redoks aktif moleküllerdir. İkinci nesil enzim bazlı biyosensörler, oksijen yerine “medyatör” olarak adlandırılan malzemeleri kullanarak elektron transferini takip eder. Medyatörler, çözelti ortamına eklenebilir ya da enzim ile birlikte taşıyıcı yüzeye immobilize edilebilirler. Medyatörlerin immobilizasyonu diğer tekniklere göre daha kullanışlı yöntemdir (Singh ve Singh, 2019). Medyatörlerin kullanılması birinci nesil biyosensörlerin problemlerini çözse de, medyatörlerin yüzeyden akması ve girişim problemleri sistemin en büyük dezavantajıdır (Astolti ve diğerleri, 2005); Bu nedenle, bu sorunu çözmek için üçüncü nesil biyosensörler geliştirilmiştir.

Üçüncü nesil biyosensörlerde, enzim ve elektrot arasındaki elektron transferi, medyatör yokluğunda doğrudan olarak substratın ürüne katalitik dönüşümü ile ilgilidir. Bu sistemde enzimin redoks merkezi ile elektrot yüzeyi arasında direkt bir etkileşim bulunmaktadır. Enzimin redoks potansiyeline daha yakın olan potansiyel aralığında çalışabildikleri için üstün seçicilik sunarlar. Ek olarak, ortamda herhangi bir ilave reaktifin olmaması reaksiyon sistemini basitleştirmektedir (Zhang ve Li, 2004).



**Şekil 2.4** 1. nesil (A), 2. nesil (B) ve 3. nesil (C) enzim bazlı amperometrik biyosensörlerin çalışma prensibi (Soylemez ve Kurbanoglu, 2021)

#### 2.4 İletken Polimerlerin Biyosensör Uygulamalarındaki Önemi

Konjuge polimer modifiye yüzeyler, biyomoleküllerin elektrot yüzeylerinde konumlanabilmesi için uygun bir platform sunar. Farklı amaçlar için üretilmiş biyosensörlerin duyarlılığını, kararlılığını ve seçiciliğini geliştirmek için kullanılabilirler (Otero ve ark., 2012). Biyosensör tasarımında iletken polimerlerin kullanılması, elektronlar konjuge  $\pi$  elektron omurgaları üzerinde serbestçe hareket edebildiğinden, biyomoleküllerin elektrokatalitik özelliklerini geliştirir (Ahuja ve ark., 2007). Dolayısıyla, bu özellik hızlı elektron transferini iyileştirmekte ve çevirici ile biyomolekül arasındaki doğrudan iletişimi sağlamaktadır (Vidal ve ark., 2003). Ek olarak, iletken polimer ile modifiye edilmiş yüzeyler, elektrot yüzeyindeki enzimlere stabilite sağlar (Schuhman, 1995). Enzim immobilizasyonu stratejisinde, önemli bir faktör, enzim aktivitesini kaybetmeden uzun vadeli stabilite için biyomolekülü elektrot yüzey üzerinde tutmaktır. Bu nedenle, iletken polimerler üstün özellikleri için mükemmel adaylardır.

İletken polimerler, elektropolimerizasyon tekniği kullanılarak elektrot yüzeyinde polimer filmin kalınlığı düzenlenerek elde edilebilirler. Ayrıca, İP'ler oda sıcaklığında elektrokimyasal olarak üretilebilir ve polimer üretmek için sert koşullar oluşturmaya gerek yoktur. İP'lerin elektropolimerizasyonu sırasında, Pt-, Au- veya C-tabanlı elektrotlar veya ITO kaplı camlar gibi çeşitli elektrot yüzeylerinde oluşabilirler. Ayrıca, katı substratın boyutundan ve şeklinden bağımsız olarak bu tür yüzeylere tam

olarak oluşturulabilirler. Bu özellikler, biyolojik sistemin yüksek tekrarlanabilirliğini ve biyosensör uygulamaları için substrat yüzeylerin kolay oluşumunu sağlar. Bu bağlanma, elektrot yüzeyinde uygun bir üç boyutlu matriks oluşturarak enzim aktivitesinin uzun süre korunmasına yol açar. Polimer yapısı farklı fonksiyonel gruplar (karboksil, amino, alkil vb.) içerebilir. Ayrıca, isteğe bağlı olarak, İP ile modifiye yüzeyler dendrimerler, karbon nanotüpler, veya amino asitler gibi farklı malzemelerle modifiye edilerek biyosensör performansı iyileştirilebilir. Ek olarak, İP'lerin biyolojik moleküller ile biyouyumlu özelliği nedeniyle biyokimyasal reaksiyonlar için kolaylıkla kullanılabilirler ve dolayısıyla biyomoleküller aktivitelerini uzun süre koruyabilirler (Adeloju ve Wallaceb, 1996).

## **2.5. Enzimler**

Enzimler proteinlerden oluşmuş, aktivasyon enerjisini düşürerek kimyasal reaksiyonları hızlandıran ancak reaksiyon sonunda hiç bir değişikliğe uğramayan biyolojik katalizörlerdir (Keha ve Küfrevioğlu, 2009). Enzimlerin katalizör olarak katıldıkları tepkime türlerine ve substratlara karşı seçici olarak davranmaları önemli özelliklerinden biridir. Enzimler sadece protein yapıları oldukları zaman apoenzim adını alırlar. Apoenzime yardımcı bir kısım eklendiği zaman farklı adlandırılırlar bu yardımcı kısım mineral ise kofaktör, vitamin ise koenzim adını alırlar (Nelson ve Cox, 2005). Bir apoenzim türü sadece bir koenzim ya da kofaktör ile çalışabilirken, bir koenzim ya da kofaktör birden çok apoenzimle çalışabilir. Enzim etkinliğini arttıran maddelere aktivatör, enzim etkinliğini azaltan maddelere ise inhibitör adı verilir.

Enzimler, substratları için yüksek seçicilikleri açısından ideal bir katalitik güce sahiptir. Enzimler, genellikle biyokatalizörler olarak tanımlanan karmaşık proteinler olarak adlandırılır. Hem katalize ettikleri reaksiyonlar hem de substratlar olarak bilinen reaktan seçimi için oldukça spesifiktirler. Enzimler gıda, kağıt, deri, tarım ve tekstil endüstrileri gibi birçok uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda, kimya ve farmakolojik endüstrilerdeki hızlı bilimsel ilerleme, bilim adamlarına enzim teknolojisini benimseme konusunda ilham vermektedir. Yaklaşık 12000 Da ile milyon Da arasında değişen moleküler ağırlıklara sahiptirler. (Alexander ve ark., 2017).

Enzimlerin çoğu sadece polipeptitlerden oluşur ve bazıları amino asit uzantılarından başka kimyasal grup içermez. Enzimler, ana bileşenleri amino asitler olan biyomoleküllerdir. Amino asitler, bir karbon atomuna bağlı bir amino grubu (-NH<sub>2</sub>), bir hidrojen (-H), bir karboksil grubu (-COOH) ve bir değişken yan gruptan (-R) oluşur. Çok sayıda enzim, koenzim adı verilen spesifik ve düşük moleküler ağırlıklı bir organik molekül içermektedir. Ayrıca, bazı durumlarda bir dizi enzim, aktivitesi için hem koenzim hem de bir veya daha fazla metal iyonu sağlar ki buna holoenzim denir. Apoenzim, bir holoenzimin protein kısmı olarak da tanımlanır. Bu bağlamda, bir koenzim, apoenzime kovalent veya kovalent olmayan bir şekilde bağlanabilir. Koenzim sıkıca ve kalıcı olarak bağlanırsa prostetik grup olarak tanımlanır. Protetik grupları organik (vitamin, şeker veya lipid gibi) veya inorganik (metal iyonu gibi) olabilir. İki kategoriye ayrılabilirler: koenzimler ve kofaktörler. Koenzimlerin vitaminlerle biyosentetik olarak ilişkili olduğu düşünülebilir. Kofaktörler, bir enzimin katalizör olarak aktivitesi için gerekli olan Fe<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> gibi protein olmayan kimyasal bileşikler veya metalik iyonlardır (Alexander ve ark., 2017; Bhagavan ve ark., 2011).

Katalizledikleri tepkimenin türüne göre enzimler altı ana grupta incelenmektedir. Oksidoredüktazlar (Yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını kataliz ederler); Transferazlar (Fonksiyonel grupların transferini katalize ederler (örneğin, amino ve fosfat grupları)); Hidrolazlar (hidroliz reaksiyonlarını katalize ederler); Liyazlar (bir grubun çift bağ üzerinden eklenmesini katalize ederler); İzomerazlar (Çift bağ oluşum ve katılma reaksiyonlarını katalize ederler ve son olarak Ligazlar (pirofosfat bağının hidrolizi ile birleştirilmiş iki molekül arasındaki bağ oluşumunu katalize ederler).

### **2.5.1 Asetilkolinesteraz Enzimi**

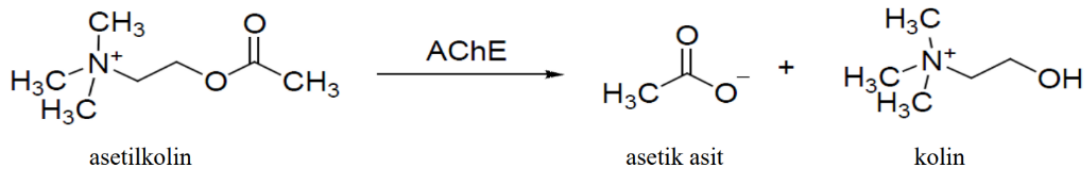
Asetilkolinesteraz (AChE, EC 3.1.1.7), nörotransmitter bir madde olan asetilkolin'in asetat ve koline hidrolizini katalizleyen, hidrolaz sınıfına ve karboksilesteraz ailesine ait bir enzimdir. Asetilkolinesteraz organizmada; kolinerjik nöronlar, kolinerjik sinapslar, nöromusküler kavşak, eritrositler, akciğer, dalak ve beyin gri maddesinde bulunmaktadır. Kolinerjik sinapslarda uyartıların iletimini sonlandırdığından nörotransmisyon esnasında önemli rol oynamaktadır.



Kolinesterazlar; kolinerjik nöronun yapımı için gerekli olan asetilkolinin, kolin ve asetik asite hidrolizini katalizleyen bir enzim türüdür (Pohanka, 2011).

Böceklerde ve omurgalılarda bulunan kolinesterazların genellikle iki çeşidi vardır: Asetilkolinesteraz (AChE) ve bütiril kolinesteraz (BChE). Ağırlıklı olarak kolin esterlerini hidrolize eden spesifik AChE enzimi beyin, sinir ve kırmızı kan hücrelerinde yüksek miktarlarda bulunurken, spesifik olmayan “pseudo” kolinesteraz olarak da adlandırılan ve kan serumunda, pankreasta, karaciğerde ve merkezi sinir sisteminde yer alan BChE, diğer esterleri ve kolin esterlerini hidrolize etmektedir (Kaplay,1976; Rao ve ark., 2007).

AChE ilk defa 1938 yılında elektrik balığının (Torpedo marmorata) elektrik organından ekstraksiyon yoluyla elde edilmiştir (Güven, 2000). Enzimin aktif bölgesinin iki alt birimi vardır. Bunlardan biri serin, histidin ve glutamat kalıntılarından oluşan katalitik (esteratik) bölge diğeri ise kolin bağlama cebidir. Bu birimler substrat dönüşümünü ve inhibitör bağlanmasını kolaylaştırmaktan sorumludur. AChE’in en önemli substratı asetilkolindir ve bu substratını büyük bir hızla hidrolize etmektedir. Bunun dışında açil grupları asetat ve propiyonattan daha uzun olan kolin esterleri de AChE tarafından substrat olarak kullanılmaktadır. AChE oldukça yüksek bir aktiviteye sahiptir; her bir molekül enzim saniyede yaklaşık olarak 25.000 asetilkolin parçalar. Şekil 2.5’de enzimin kataliz reaksiyonu gösterilmektedir. Ürün olarak asetat ve kolin oluşur.



**Şekil 2.5** AChE’nin kataliz reaksiyonu (Koçancı ve Aslım, 2016)

## 2.6 Biyosensörlerde Kullanılan İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyonu, enzimlerin aktif bölgelerini muhafaza ederek, sürekli olarak kullanılması amacıyla çeşitli matrikslere bağlanmasıyla hareketinin sınırlandırılma işlemidir. Farklı uygulama alanlarında kullanılmak üzere enzimlerin çeşitli matrikslere tutunumu için çok sayıda teknik geliştirilmiştir. Biyosensör alanındaki gelişmelerin artmasıyla birlikte enzim aktivite kaybı, enzim ömrü ve

stabilitesi ile ilgili sorunlar da ortaya çıkmaktadır. Bu problemlerin üstesinden gelmek için farklı immobilizasyon stratejileri geliştirilmiştir. Bir yüzeyde enzim immobilizasyonu yapılırken uygulanan yöntem elektrokimyasal cihazın performansı ile ilgilidir (Garcia-Galan ve ark., 2011). Adsorpsiyon, kovalent bağlama, çapraz bağlama, tutuklama ve kapsülleme hem avantajları hem de dezavantajları olan ana immobilizasyon stratejileridir. İmmobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması Şekil 2.6'da özetlenmiştir. İmmobilize enzimler birçok yönden avantaja sahiptirler. Bunlar şu şekilde sıralanabilmektedir: Reaksiyon sonunda ortamdaki kolayca uzaklaştırılabilmeleri; çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.b.) karşı serbest enzimlerle karşılaştırıldığında dayanıklı olması; birden fazla kez ve uzun süre kullanılabilir olması; doğal enzimlere göre daha kararlı olması ve birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygun olması.

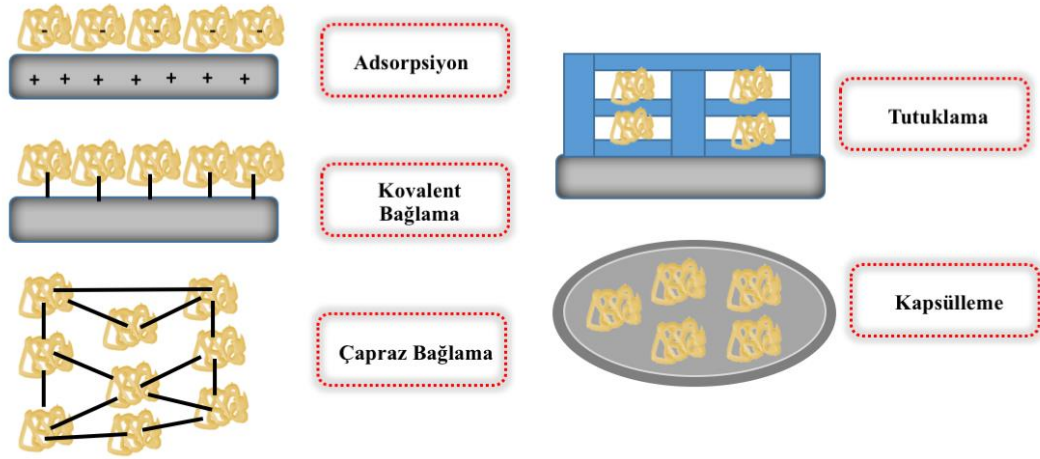
Adsorpsiyon yöntemi, biyomoleküllerin film veya tabaka yüzeyine adsorbe edilmesi, immobilizasyonun en basit yöntemidir (F. Scheller ve Schubert, 1992). Bu yöntemin basit olmasının yanı sıra enzim molekülünde ve aktif bölgesinde neredeyse hiç hasar ve konformasyonel değişiklik meydana getirmeyen bir immobilizasyon yöntemidir. Bu yöntemin dezavantajı yüzey ile enzim arasındaki zayıf etkileşim nedeniyle adsorbe olan biyobileşenin hızla desorbe olmasıdır.

Kovalent bağ, enzim ile taşıyıcı arasında kovalent bağların oluşturulduğu, en yaygın kullanılan immobilizasyon yöntemidir. Proteinin immobilize edileceği reaksiyon tipi seçilirken ilgili maddelere dikkat edilmelidir: Enzim aktivitesi bağlanma reaksiyonu koşullarında kaybolmamalı ve enzimin aktif alanı kimyasallardan etkilenmemelidir. Karboksil, amino, hidroksil ve sülfhidril gruplarının, enzim ve kovalent bağlayıcı arasında sıkı kovalent bağ oluşturmak için fonksiyonel gruplar olarak kullanılabilir olması bu yöntemin en önemli avantajıdır. Ancak, kovalent bağlama yöntemi genellikle pahalıdır ve bu yöntem, enzimin konformasyonunu değiştirebilir ve ayrıca enzimin aktif bölgesini etkileyerek enzim aktivitesinin kaybına neden olabilir.

Çapraz bağlama yönteminde, protein molekülleri birbirleriyle veya işlevsel olarak inert başka bir proteinle (örneğin albümin veya jelatin) çapraz bağlanabilir. Bu yöntemin avantajları basitliği ve biyomoleküllerin güçlü kimyasal bağlanmasıdır. Ana

dezavantajı, enzimlerin kristalizasyonu için gereklilik ve proteinin katalitik olarak temel bölgelerindeki kimyasal değişikliklerden dolayı aktivite kayıpları olasılığıdır (Garcia-Galan ve ark., 2011).

Diğer yöntemler olan tutuklama ve kapsülleme yöntemlerinde enzimin kimyasal modifikasyonuna gerek yoktur ve bu nedenle nispeten kolay yöntemlerdir. Bu yöntemler, enzimin bir jel veya membran matrisine bağlı olmaması nedeniyle diğerlerinden farklıdır.



Şekil 2. 6 Enzim immobilizasyon yöntemleri

## 2.7 Asetilkolinesteraz İnhibitörleri

AChE inhibitörleri asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederler. II. Dünya Savaşı'na kadar sadece geri dönüşümlü kolinesteraz inhibitörleri bilinmekteyken II. Dünya Savaşı sırasında yüksek miktarda toksik bileşiğe sahip ve uzun sürebilen etkili kullanışlı geri dönüşümsüz kolinesteraz inhibitörleri geliştirilmiştir. Kolinesteraz inhibitörleri klinik olarak sinirsel rahatsızlıklar olarak da bilinen, özellikle Alzheimer hastalığı olmak üzere myastenia gravis ve glokom gibi hastalıklarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Singhve ark., 2013).

AChE enziminin anyonik özelliğe sahip bölgesini inhibe eden ajanlar geri dönüşümlü inhibitörlerdendir. Bunlardan ise yarışmalı veya yarışmasız olarak geri dönüşümlü AChE inhibitörleri tedavi amaçlı kullanılır. Bu inhibitörlere karbamatlar, neostigmin, pyridostigmine, rivastigmin, donepezil örnek olarak verilebilir (Ali ve ark., 2018). AChE enziminin esterik özelliğe sahip bölgesini inhibe eden ajanlarsa geri dönüşümsüz inhibisyona neden olmaktadır. Bunlardan yarı-geri dönüşümlü ve geri

dönüşümsüz AChE inhibitörleri genellikle kimyasal yapıli silahlar ve pestisitlerin yapımında kullanılır. Bu inhibitörlere organofosfatlar, ekotiofat, diizopropilfluorofosfat, cadusafos, klorprifos, siklosarin, diklorvos, dimethoat, sarin, soman, malathion, parathion, aldicarb, karbofuran, pirimicarb ve kumarinler örnek olarak verilebilir (Pohanka, 2012).

### 2.7.1 Pestisitler

Pestisit, insan, hayvan vücudu, bitki üzerinde veya çevresinde yaşayan, besin kaynaklarına zarar verip üretimi olumsuz etkileyen böcek, kemirici, yabancı ot, mantar gibi canlıların zararlarını en aza indirmek için kullanılan kimyasal maddelere verilen genel bir addır (Meister, 1999). Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımına göre pestisitler; böcekler, kemirgenler, mantarlar ve istenmeyen bitkiler (yabancı otlar) dahil zararlı organizmaları öldürmek için kullanılan kimyasal bileşiklerdir.

Pestisitler çok eski yıllardan bu yana hayatımızda tarımsal ürünleri korumak amacıyla yer almaktadır. Örneğin, Sümerliler böcekleri ve akarları kontrol altında tutmak için kükürt kullanmışlardır (Bernardes ve ark., 2015). Çinliler ise arsenik ve civa bileşenlerini vücut bitlerinden korunmak ve ağaçları böceklerden korumak için pestisitlerden yararlanmışlardır.

İlk olarak 1876 yılında sentezlenen dikloro difenil trikloroethan (DDT) ise 2. Dünya Savaşı'ndan sonra zararlı organizmalarla mücadele etmek için kullanılmaya başlandı. DDT ilk kullanıldığı zaman insan sağlığı ve uygulandığı canlı dışındaki diğer canlılar için zararsız, etkili ve ucuz bir kimyasal olarak gözüktüğünden çok çeşitli türevleride üretildi. 1962 yılında Rachel Carson yazdığı "Silent Spring" isimli kitabında DDT'nin çevre, insan ve diğer hedef organizma dışındaki canlılar üzerindeki etkilerinden bahsederek, DDT kullanımının kısıtlanmasına dair toplumda bir bilinç oluşturdu. 1967 yılında ise kuş yumurtalarının kabuklarındaki çabuk kırılma ve incelmeyin DDT kullanımıyla doğrudan ilişkili olduğu İngiliz bir araştırmacı tarafından kanıtlandı. DDT'nin hedef organizmalar dışında kuşlar, balıklar ve diğer hayvanlar üzerindeki olumsuz etkileri, ekosistemdeki kalıcılığının yüksek olması gibi zararlı etkileri göz önünde bulundurularak, 1972 yılında Birleşik Devletlerde ve sonrasında diğer ülkelerde DDT kullanımı yasaklanmaya başlandı (Bernardes ve ark., 2015).

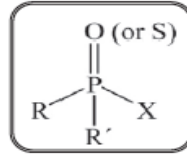
Sonradan yapılan çeşitli araştırmalar, DDT'nin akut ve kronik hastalıklara neden olduğu, kanser riskini arttırdığı ayrıca diyabet ve karaciğer hastalıklarına sebep olduğunu göstermiştir (Tang ve ark., 2014; Li ve ark., 2017). DDT'nin bu zararlı etkileri araştırmalar sonucunda göz önünde bulundurularak daha zararsız ve daha güvenli pestisitlerin üretilmesi için çalışmalar başlatılmış sonucunda organoklorlu, organofosforlu, karbamatlı ve piretroid türevi sentetik pestisitler ortaya çıkmıştır (Bernardes ve ark., 2015; McAfee, 2017).

### **2.7.1.1 Organofosforlu Pestisitler**

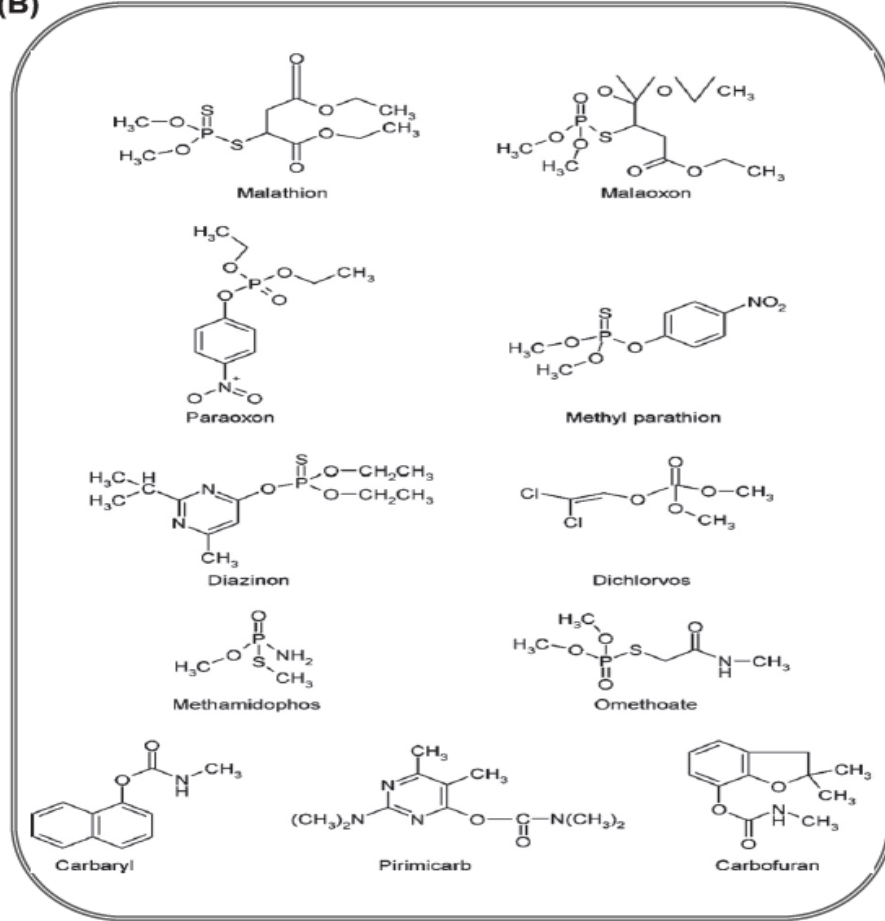
Organofosfatlar (OP) organik fosforlu bileşikler için kullanılan genel bir terimdir. Bu pestisitlerin çoğu insektisit olarak kullanılmaktadır. Klorpirifos, diazinon ve malation en çok bilinen OP'lerdir (S.V. Kumar ve ark., 2010; Waksmondzka ve ark., 2010). OP'lerin Schrader tarafından 1937 yılında genel yapıları ortaya konulmuştur. Bir fosfor, sülfür ya da oksijen atomuyla çift bağ kurmakta, yan gruplar ise genelde alkoksi gruplarından oluşmaktadır (Costa, 2017). Pestisitlerin genel yapısı (A) ve AChE biyosensörlerinde kullanılan çeşitli OP bileşikli pestisitlerin yapıları (B) Şekil 2.7'de verilmiştir.

OP pestisitler, özellikle II. Dünya Savaşından sonra ünlenmiş ve şu anda dünyada en çok kullanılan pestisit grupları arasında yerini almıştır (Costa, 2017). Özellikle organik klorlu pestisitlerle kıyaslandığında organizma üzerinde daha az toksik etkilere sahip olması ve doğada kalıcılığının altı ay gibi kısa bir süre olması sebebiyle sıkça tercih edilmeye başlanmıştır (Reynoso ve ark., 2019).

(A)



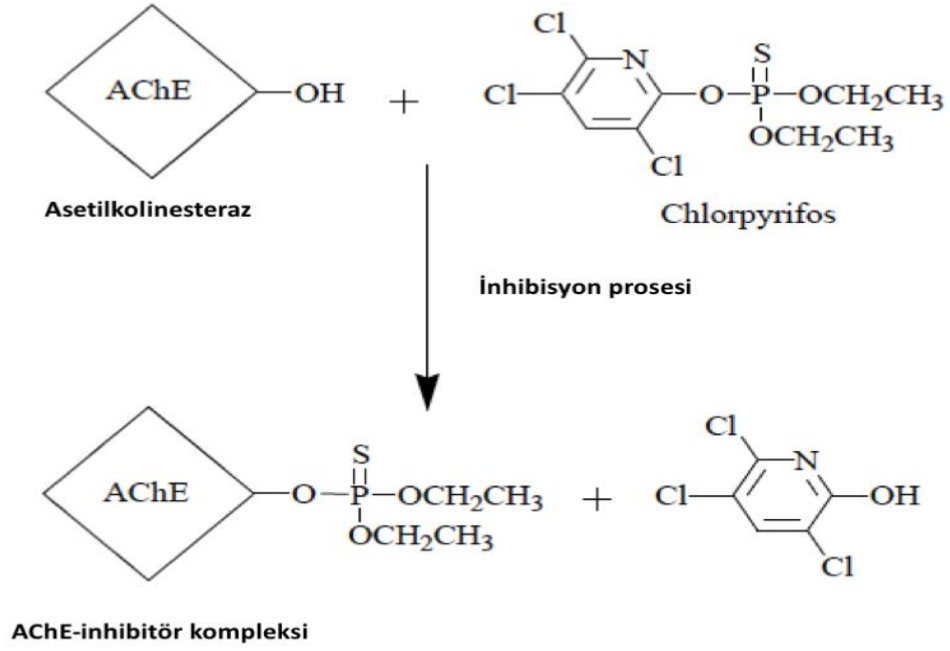
(B)



**Şekil 2.7** Pestisitlerin genel yapısı (A) ve AChE biyosensörlerinde kullanılan çeşitli OP bileşikli pestisitlerin yapıları (B) (Pundir ve Chauhan, 2012)

AChE'nin aktif bölgesinde, bir serin kalıntısı, nörotransmitter asetilkolinin hidrolizini katalize eder ve kolinerjik sinapslarda “impulse” iletimini sonlandırır (Periasamy ve ark., 2009; Fukuta, 1990). Kolinesteraz inhibitörleri olarak bilinen OP'ler tarımda, tıpta, endüstride ve kimyasal savaşta yaygın olarak kullanılmaktadır. OP'ler yüksek toksisite sergilerler ve ortamdaki varlıkları, AChE'nin aktif bölgesinde stabil bir kompleks oluşturarak AChE'nin katalitik aktivitesini geri dönüşümsüz olarak engelledikleri için insan sağlığı için ölümcül olabilir (Fukuto, 1990). İnhibisyon mekanizması sırasında serin kalıntısı bloke edilir. Ortaya çıkan yüksek asetilkolin üretimi, asetilkolin seviyesi aktif AChE'nin mevcudiyetine bağlı olduğundan, beyin tepkisine müdahale eder. Bu nedenle, ortamdaki OP'lerin tespiti önemlidir ve son on

yılda yoğun ilgi görmüştür. Pestisitlerin kimyasal yapısına bağlı olarak farklı toksisite seviyeleri gösteren çok sayıda organofosfat ve karbamat pestisitleri bulunmaktadır (Chapalamadugu ve Chaudhry, 1992; Dikshith, 1991). OP pestisit olan Chlorpyrifos'a ait AChE inhibisyonu Şekil 2.8'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.8** Chlorpyrifos pestisiti tarafından asetilkolinesterazın inhibisyonu (Račáková ve ark., 2006'dan adapte edilmiştir).

### 2.7.1.2 Pestisitlerin Çevre ve Canlılar Üzerindeki Etkileri

Pestisitler genel olarak zararlı kimyasallar olduklarından dolayı sadece hedef organizmaları değil hedef dışı tüm organizmaları etkilemektedirler. Pestisitlerin yol açtığı bu zararlar yanlış kullanım ve gereğinden fazla kullanım sonucunda daha büyük sorunlara neden olurlar. Yapılan araştırmaların çoğu pestisitlerden en çok etkilenen böcek türünün bal arıları olduğunu gösterir.

Pestisitlerin büyük bir kısmı uygulama sonrasında bitki, toprak ve su ortamında uzun süre bozulmadan kalabilir ve canlıların metabolizmasında birikebilirler. Pestisitler hedef organizmaya uygulandığı sırada bir kısmı buharlaşma ve dağılma nedeniyle kaybolurken, diğer kısmı bitki üzerinde ve toprak yüzeyinde kalmaktadır. Havaya saçılan pestisitler rüzgarlarla başka ortamlara taşınabilir; yağmur, sis veya kar yağışıyla tekrar yeryüzüne dönebilir. Bu döngü sonrasında pestisitler yer altı ve yer üstündeki sulara bulaşır, püskürtme sonucu havaya karışan kalıntılar insan ve diğer

canlılara solunum sonrası ulaşabilirler. Bundan dolayı pestisitler çevre ve canlılar için çok büyük bir risk oluşturmaktadır.

Pestisit uygulamalarında kullanılan miktarın %0,1'den az bir bölümü hedef organizmaya ulaşırken diğer bölümü ekosisteme karışmakta ve ekosistemde dengelerin bozulmasına neden olmaktadır (Yıldız ve ark., 2005). Bitkilerin tam çiçeklenme döneminde uygulanan kimyasal maddeler arılar vb. diğer canlılar tarafından direkt olarak bünyelerine alınmakta ve bu canlılar hareket etmeleri sonucunda hedef olmayan organizmalara dolaylı yolla taşınmaktadır. Bu şekilde pestisitlerin besin zinciri yapısına girmesi mümkün olmakta ve bu döngü nedeniyle bir çok kanatlı canlı ölümüne de neden olmaktadır (Yıldız ve ark., 2005).

Pestisitlerden en çok etkilenen bir diğer canlı grubu ise kuşlardır. Özellikle de topraktan beslenen kuşların pestisitlere direkt olarak maruz kaldığı için dokularında ilaç kalıntı miktarı fazlalığından dolayı öldürücü etkisinin dışında, karaciğer, böbrek, üreme ve diğer organların işlevlerinin bozulmasına da yol açtığı, hayatta kalma dirençlerini azalttığı ve çoğalma potansiyellerini olumsuz yönde etkilediği de bilinmektedir (Balkaya, 2000).

Pestisitlerin balıklar üzerindeki etkisi ise doğrudan ölümlere neden olabildiği gibi sudaki oksijen miktarında değişime sebep olduğu için dolaylı olarak da ölümlere yol açarlar. Ayrıca pestisitlerin zararlılarına maruz kalan balıklar avcı balıklar tarafından kolaylıkla avlanılmakta ve su ekosistemindeki bu döngüyü olumsuz etkilemektedirler (Balkaya, 2000).

İnsanların pestisitleri bilinçsiz ve gereğinden fazla kullanması doğadaki kuşlar ve balıklar dışında kedi, köpek, bir çok çiftlik hayvanı ve diğer otçul canlıları da olumsuz etkilemektedir (Sunding, 2000).



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Reaktifler

Asetilkolinesteraz (AChE, EC 3.1.1.7, 518 U/mg katı, *Electrophorus electricus* (electric eel), Asetiltiyokolin klorür (AThCl),  $\geq 99\%$  (TLC), diklorometan (DCM), gluteraldehit (%25, v/v), lityum perklorat ( $\text{LiClO}_4$ ), sodyum perklorat ( $\text{NaClO}_4$ ), sodyum asetat ( $\text{NaCH}_3\text{COO}$ ), asetik asit ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), sodyum hidrojen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), sodyum dihidrojen fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), potasyum klorür (KCl), sodyum klorür (NaCl), glikoz, parokson pestisiti ve 2,2'-(9,9-Dioctyl-9h-Fluorene-2,7-Diyl)bisthiophene (BT) monomeri deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere Sigma-Aldrich'ten satın alındı. Askorbik asit, sitrik asit, asetaminofen, üre, etanol, asetonitril (ACN), potasyum ferrisiyanür  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ve potasyum ferrosiyanür  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  Merck'ten temin edildi.

Yukarıda adları verilen tüm kimyasallar ticari kaynaklardan satın alındı ve deneylerde kullanılan tüm maddeler analitik saflıktadır.

#### 3.2 Kullanılan Cihaz ve Sistemler

Elektrokimyasal deneyler; amperometrik ölçümler ve dönüşümlü voltametri çalışmaları Ivium PocketSTAT Potentiostat (Ivium Instruments, Houten, Netherlands) kullanılarak gerçekleştirildi. BT monomerinin dönüşümlü voltametri yöntemi ile sentezlenen polimerinin elektrokimyasal çalışmaları üç elektrotlu sistem kullanılarak yapıldı. Çalışma elektrodu (ÇE) olarak grafit çubuk elektrot (Ringsdorff Werke GmbH, Bonn, Almanya, tip RW001, 3.0 mm çapında), karşıt (yardımcı) elektrot (KE) olarak platin (Pt) (Aldrich) ve referans elektrot (RE) olarak da gümüş elektrot (Ag) (Aldrich) kullanıldı. Amperometrik ölçümler de aynı üç elektrotlu sistem kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm deneyler oda sıcaklığında cam hücreler içerisinde gerçekleştirildi (n=3). Amperometrik analizler sırasında konvektif taşınımın sağlanması için ölçüm hücresi içerisinde manyetik bar ve karıştırma için manyetik karıştırıcı cihaz kullanıldı. Amperometrik ölçümlere ait cevaplar üç ölçümün ortalaması olarak verildi ve standart sapmalar  $\pm \text{SD}$  olarak kaydedildi. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri ile enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) deneyleri Ordu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde bulunan Hitachi SU 1510 (Hitachi, Almanya) ile gerçekleştirildi.

### 3.3 Çözeltilerin Hazırlanması

BT monomer çözeltisinin hazırlanması: 2,2'-(9,9-Dioctyl-9h-Fluorene-2,7-Diyl)bisthiophene (BT) monomer çözeltisi ACN ile  $10^{-3}$  M derişiminde hazırlandı ve destek elektrolit olarak 0.1 M sodyum ve lityum perklorat kullanıldı.

5 mM ferri-ferrosiyandır  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}]$  içeren 0.1 M KCl çözeltisinin hazırlanması: 5 mM potasyum ferrisiyanür ve potasyum ferrosiyandır içeren 0.1 M KCl çözeltisi saf su (destile su) ile hazırlandı.

50 mM fosfat tampon çözeltisinin hazırlanması: 50 mM sodyum hidrojenfosfat ve sodyum dihidrojenfosfat içerecek şekilde saf su ile hazırlandı. Çözeltilerin pH'ları 7.0 olacak şekilde NaOH ile gerçekleştirildi.

Asetilkolinesteraz (AChE) enzim çözeltisinin hazırlanması: Asetilkolinesteraz enzimi, son derişim 1  $\mu\text{L}$  AChE 0.5 Unite olacak şekilde pH 7 fosfat tamponunda çözüldü ve stok asetilkolinesteraz çözeltisi hazırlandı. Stok enzim çözeltileri kullanılmadığı zamanlarda  $-20$  °C'de saklandı.

Gluteraldehit çözeltisinin hazırlanması: %50 stok gluteraldehit çözeltisinden 10  $\mu\text{L}$  alındı, 990 mL saf su çözeltisi içerisine ilave edildi ve % 0.5 gluteraldehit içeren bu çözelti çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanıldı.

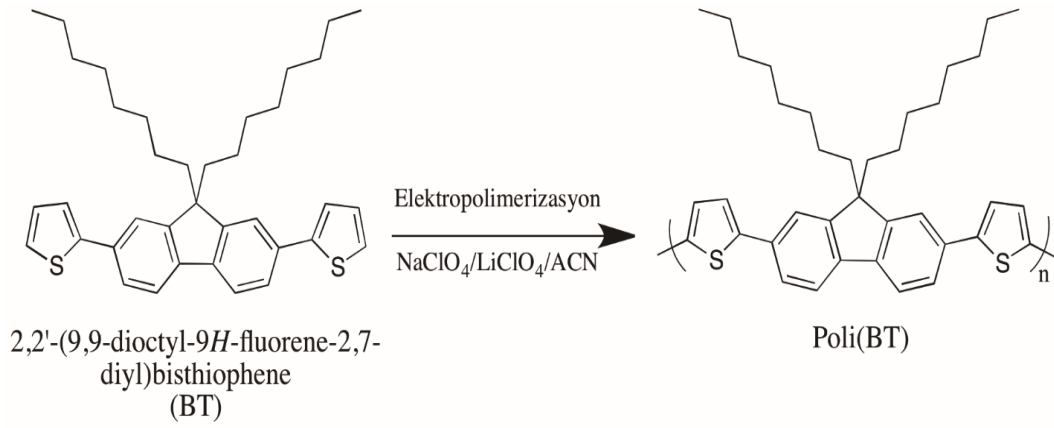
Asetiltiyokolin klorür (AThCl) çözeltisinin hazırlanması: Katı asetiltiyokolin klorürden belirli miktarda tartılarak derişimi 2.0 M olacak şekilde pH 7 fosfat tamponunda hazırlandı. Farklı derişimlerdeki AThCl çözeltileri, belirli hacimlerde stok çözeltiden alınarak fosfat tamponuyla seyreltilerek taze hazırlandı.

Parokson pestisit çözeltisinin hazırlanması:  $3.63 \times 10^{-3}$  M parokson pestisit stok çözeltileri metanol kullanılarak hazırlandı. İstenilen derişimler pH 7 fosfat tampon çözeltisi ile seyreltilerek kullanıldı.

Girişim çalışmaları için askorbik asit, sitrik asit, üre, sodyum klorür, potasyum klorür ve parasetamol çözeltilerinin hazırlanması: Girişim çalışmaları için askorbik asit, sitrik asit, üre, glikoz ve parasetamol (asetaminofen) çözeltileri derişimleri 0.25 M olacak şekilde hazırlandı. İstenilen son derişime pH 7 fosfat tamponu ile seyreltilip kullanıldı.

### 3.4 Poli(BT)/AChE Biyosensörün Hazırlanması

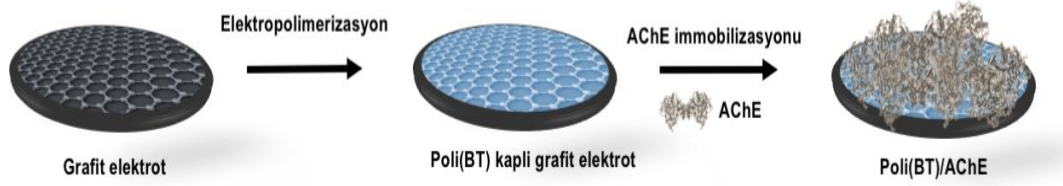
Öncelikle grafit çubuk elektrot yüzeyleri farklı boyutlardaki elektrot temizleme kiti kullanarak temizlendi ve temizlenen elektrot yüzeyi saf su ile yavaşça yıkandı. İletken polimer, poli(BT), elektrokimyasal polimerizasyon yöntemi ile daha önce zımparalanmış ve temizlenmiş grafit elektrotlar üzerinde sentezlendi. BT monomerinin yapısı ve BT monomerinin elektrokimyasal polimerizasyonu gösterimi Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



**Şekil 3.1** BT monomerinin elektrokimyasal polimerizasyonu

Monomerin elektrokimyasal polimerizasyonu  $1 \times 10^{-3}$  M monomer içeren 2.0 mL 0.1 M NaClO<sub>4</sub>/LiClO<sub>4</sub>/ACN destek elektrolit-çözücü karışımında polimerleştirildi. Dönüşümlü voltametri tekniği ile polimerizasyon 0 V ile 1.3 V arasında 100 mV/s tarama hızında 10 döngü gerçekleştirildi. Polimerizasyondan sonra polimer kaplı elektrot yüzeyi organik safsızlıklardan kurtulmak için saf su ile yıkandı. Polimerizasyonun 10 döngü dönüşümlü voltamogramı Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

Elektropolimerizasyonun ardından polimer kaplı elektrotların üzerine enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. AChE’nin immobilizasyonu için 7 µL AChE çözeltisi poli(BT) kaplı grafit elektrot yüzeyine damlatıldı. Daha sonra 5 µL %0.5’lik glutaraldehit çözeltisi elektrot yüzeyine damlatıldı. Hazırlanan elektrot, oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. Enzim elektrot, serbest enzim ve çapraz bağlayıcı ajandan kurtulmak için saf su ile yıkandı. Çözeltiler, biyosensörlerin hazırlanmasının öncesinde taze hazırlandı. Elektrotlar kullanılmadığı zamanlarda +4 °C’de buzdolabında muhafaza edildi. Poli(BT)/AChE biyosensör şematik gösterimi Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



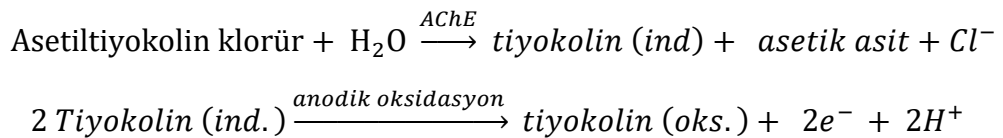
Şekil 3.2 Poli(BT)/AChE biyosensörünün hazırlanmasının şematik gösterimi

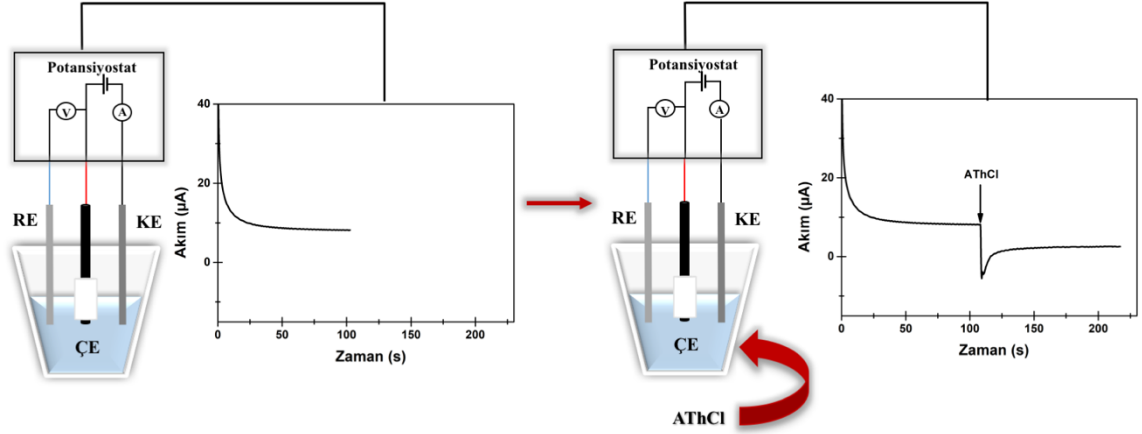
### 3.5 Hazırlanan Biyosensörün Amperometrik Ölçüm Prensibi

Amperometrik ölçümler, içerisinde 10 mL 50 mM pH 7 fosfat tamponu bulunan cam bir hücrede devamlı ve sabit bir manyetik karıştırma altında gerçekleştirildi. Geliştirilen biyosensör sistemine ait cevaplar  $\Delta I$  ( $\mu A$ ) olarak belirlendi. Hazırlanan biyosensör ölçümleri sabit bir potansiyel altında (+0.6 V Ag elektrota karşı) yapıldı. Akım denge durumuna ulaştığında substrat çözeltisi (AThCl) uygun miktarda hücre içerisine yavaşça eklendi ve akım değişimi takip edildi. Sensör cevabı substrat ilavesinden önce ve substrat ilavesinden sonraki denge durumundaki akımların arasındaki fark olarak tanımlandı ve akım  $\Delta I$  ( $\mu A$ ) olarak kaydedildi. Bir ölçümden sonrakine geçmeden önce, elektrot saf su ile yıkanıp çalışma tamponunda kısa bir süre bekletildi. Her ölçüm üç kere tekrarlandı ve sonrasında standart sapma (SD) hesaplandı. Substrat eklenmesiyle enzimatik reaksiyonuna bağlı değişimi ve amperometrik ölçüm sistemin şematik gösterimi Şekil 3.3’de gösterilmiştir.

Geliştirilen biyosensör sisteminde; AChE varlığında gerçekleşen enzimatik reaksiyon sonrasında oluşan elektroaktif tiyokolinin elektrokimyasal ölçümü temel alındı. 50 mM pH 7 fosfat tampon çözeltisinde hazırlanan stok AThCl substrat çözeltisinden farklı derişimlerde ölçüm ortamına eklendi ve elektrokimyasal sinyal takibi yapıldı (Cancar ve ark., 2016; Kesik ve ark., 2014).

Elektroaktif tiyokolinin takibine yönelik reaksiyon mekanizması aşağıdaki gibidir (Aldridge, 1950):





**Şekil 3.3** Substrat ekleden önce ve sonra enzimatik reaksiyona bağlı akım değişimi ve amperometrik ölçüm sistemi

### 3.6 AChE Temelli Biyosensör Optimizasyon Çalışmaları

Biyosensör çalışmaları iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk kısım Poli(BT)/AChE biyosensörünün geliştirilmesi, ikinci kısım ise pestisit tayin çalışmalarından oluşmaktadır. Çalışmanın ilk aşaması olan Poli(BT)/AChE biyosensörün optimizasyonunda biyosensörün cevabına etkisi olabilen parametreler incelenmiştir. Sonrasında ise optimum şartlarda oluşturulan biyosensör kullanılarak parokson pestisit çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

#### 3.6.1 Çalışma Potansiyelinin Biyosensör Cevabına Etkisi

AChE biyosensörlerinde çalışma potansiyelinin akıma etkisini belirlemek amacı ile Poli(BT)/AChE için çalışma potansiyeli araştırıldı ve sonuçlar birbiriyle kıyaslandı. Ölçümler fosfat tamponunda (pH 7.0; 50 mM) ve 25 °C'de gerçekleştirildi. Sabit uygulama voltajının belirlenmesinde +0.3, +0.4, +0.6, +0.7 ve +0.8 V arasındaki voltaj değerleri sisteme uygulandı ve elde edilen sonuçlarla potansiyel ve % biyosensör cevabı arasında grafik çizildi. Sonuç olarak +0.6 V optimum uygulama potansiyeli olarak belirlenmiştir.

#### 3.6.2 Poli(BT) Film Kalınlığı Belirlenmesi

AChE enziminin poli(BT) iletken polimerinin yüzeyine etkin bağlanmasını sağlamak için, polimer kalınlığı optimize edilmiştir. Döngü sayısı, polimer yüzeyindeki yük sayısını dolayısıyla polimer filminin kalınlığını belirlemektedir. Diğer parametreler sabit tutularak farklı döngü sayıları (5, 10, 20, 30, 40 ve 50) ile hazırlanan elektrotların amperometrik cevapları karşılaştırılmıştır. Elde edilen

sonuçlarla döngü sayısı ve % biyosensör cevabı arasında grafik çizildi. En yüksek amperometrik sinyale sahip biyosensöre göre optimum değer 10 döngü olarak bulunmuştur.

### **3.6.3 Enzim Miktarının Belirlenmesi**

Diğer parametreler sabit tutularak enzim miktarı ile sensör yanıtı arasındaki ilişki araştırıldı. Biyoaktif tabakadaki enzim miktarını belirlemek üzere, polimer filmi (10 döngü) sabit tutularak enzimin farklı miktarlarının biyosensör cevabı üzerine etkisi incelendi. Bu amaçla 3, 4, 5, 7, 8 ve 9  $\mu\text{L}$  enzim içeren biyosensörler hazırlandı ve ölçüm sonuçları karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlarla enzim miktarı ve % biyosensör cevabı arasında grafik çizildi. Farklı miktarda enzim ile hazırlanan elektrotlar karşılaştırıldığında optimum enzim miktarı 7  $\mu\text{L}$  enzim olarak belirlenmiştir.

### **3.6.4 Çapraz Bağlayıcı Miktarının Belirlenmesi**

Glutaraldehit (GA), biyosensör hazırlanmasında çapraz bağlama ajanı olarak kullanılmıştır. Poli(BT) matris ve enzimler arasındaki etkileşime ek olarak, yüksek aktiviteye sahip GA eşliğinde enzim immobilizasyonu desteklenmiştir. Çapraz bağlama özelliği ile immobilizasyon sonucunda uygun enzim konformasyonu sağlanır. Yapılan deneylerle elde edilen sonuçlarla GA ve % biyosensör cevabı arasında grafik çizildi. % 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 ve 1.5 GA değerleri test edilmiştir ve optimum değer % 0.5 GA ile elde edilmiştir.

### **3.6.5 pH Optimizasyonu**

Biyosensörün optimum pH'ını belirlemek amacıyla pH: 6; 6,5; 7; 7.5 ve 8 olan 50 mM fosfat tamponları kullanılarak en iyi biyosensör cevabının hangi pH değeri ile alındığı belirlendi. Biyosensörün tampon çözeltilerine iyi adapte olması için bir tampondan diğerine geçilirken o tamponda bir süre bekletildi. Elde edilen sonuçlarla pH ve % biyosensör cevabı arasında grafik çizildi. Amperometrik ölçümler sırasında elde edilen en yüksek cevaba göre optimum pH değeri 7 olarak tespit edildi.

### **3.6.6 Pestisit İnkübasyon Süresi Tespiti**

Enzim elektrotun pestisit maruziyetindeki inkübasyon süresinin belirlenmesi aşamasında, reaksiyonun 5, 10, 15 ve 20 dak.'larında pestisit maruziyeti gerçekleştirildi ve elde edilen sonuçlarla inkübasyon süresi ve % inhibisyon arasında grafik çizildi. En uygun inkübasyon süresi 10 dak. olarak kabul edildi.

### 3.7 Poli(BT) ve Poli(BT)/AChE Modifiye Edilmiş Yüzeylerin Elektrokimyasal ve Morfolojik Karakterizasyonu

Poli(BT) ve Poli(BT)/AChE yüzey morfolojileri taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile daha ayrıntılı olarak incelendi. İlâveten, modifiye elektrot yüzeylerde etkin elektroaktif yüzey alanını karakterize etmek için, döngüsel voltammetri (CV) tekniği kullanıldı. Bu yöntemde, gerçekleştirilen deneyler, 100 mV/s tarama hızı ile -0.4 ile 0.6 V arasındaki potansiyelde 5 mM Fe (CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> 0.1 M KCl ve 50 mM pH 7 fosfat tampon çözeltisi içeren bir çözeltide gerçekleştirildi. Randles-Sevcik denklemi kullanılarak, her yüzey modifikasyonunun elektroaktif yüzey alanları hesaplandı.

$$I_p = 2.69 \times 10^5 A D^{\frac{1}{2}} n^{\frac{3}{2}} v^{\frac{1}{2}} C$$

n; redoks reaksiyonda katılan elektron sayısı, A; elektrot alanı (cm<sup>2</sup>), D; solüsyondaki molekülün difüzyon katsayısı (cm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>), C; yığın çözeltideki prob molekülünün konsantrasyonu (molcm<sup>-3</sup>) ve v; tarama hızı (Vs<sup>-1</sup>).

### 3.8 Biyosensörün Analitik Karakterizasyonuna İlişkin Çalışmalar

Biyosensörün çalışma koşulları optimizasyonundan sonra bir biyosensör hazırlanıp AThCl'nin farklı konsantrasyonlarına karşı standart grafik çizildi. Ölçümler optimizasyon esnasında tespit edilen 10 döngü kaplanmış polimer, 7 µL enzim ve %0.5'lik glutaraldehit çözeltisi kullanılarak hazırlanan biyosensörle oda sıcaklığında 50 mM pH 7 fosfat tampon çözeltisinde gerçekleştirildi. Lineer tayin aralığı, tayin limiti (LOD) ve sensörlerin duyarlılığı gibi çeşitli analitik parametreleri belirlemek için kalibrasyon eğrileri kullanıldı.

Geliştirilen Poli(BT)/AChE biyosensörün tespit edebildiği en düşük substat konsantrasyonunu (LOD) belirlemek üzere standart grafikteki en düşük konsantrasyon değeri olan 0.0125 mM AThCl konsantrasyonu için ard-ardına ölçümler alındı. LOD= (3xStd sapma)/eğrinin eğimi formülü kullanarak tayin limiti hesaplandı.

Duyarlılık en önemli analitiksel karakterizasyon parametrelerinden biridir. Doğru denkleminin eğimi, duyarlılık parametresi olarak rapor edilebilmektedir. Elde edilen doğru denkleminin eğiminin elektrot alanına bölünmesi ile duyarlılık değeri mM/µAcm<sup>-2</sup> olarak rapor edildi.

Geliştirilen biyosensör ile elde edilen sonuçların tekrarlanabilir olup olmadığını belirlemek için optimum koşullarda, 4.0 mM AThCl konsantrasyonu için arka arkaya en az 7 ölçüm alındı. Ölçümlerden elde edilen sonuçların standart sapma (S.S) ve yüzde varyasyon katsayısı (%V.K) hesaplaması ile geliştirilen biyosensörün tekrar kullanılabilirliği belirlenmiş oldu.

Aynı koşullarda hazırlanan 3 farklı elektrodun standart sapma (S.S) ve varyasyon katsayısı (V.K) hesaplanarak tekrar üretilebilirliği araştırıldı.

Raf ömrü stabilitesini araştırmak için optimize edilmiş biyosensör, aktivite kaybı gözlemlenene kadar belirli miktarda gün boyunca kullanıldı. Biyosensörler kullanılmadıkları zaman +4 °C'de saklandı.

Girişim deneyi çalışmaları için electroaktif ve genel girişimci bileşikler olarak bilinen türler Poli(BT)/AChE biyosensörün cevabı üzerindeki girişim etkisini incelemek üzere kullanıldı. Bileşiklerin girişim etkileri, akım seviyelerindeki farklılıkları standart AThCl çözeltisinininki ile kıyaslandı.

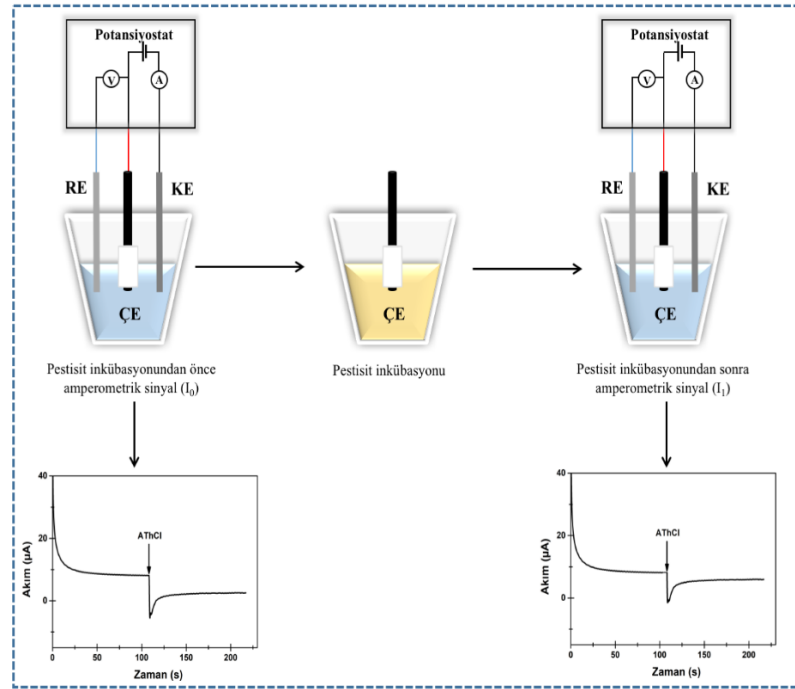
### **3.9 AChE İnhibisyon Deneyleri**

#### **3.9.1 Hazırlanan Biyosensörün Pestisit Tayinine Yönelik Elektrokimyasal Ölçüm Prensipleri**

Pestisit tespiti, Şekil 3.4'de gösterilen iki aşamalı bir prosedürle gerçekleştirildi. İnhibitör maruziyetinden önce, biyosensörün AThCl substratı için ilk amperometrik yanıtı  $I_0$  olarak kaydedildi. Daha sonra enzim elektrotu 5 mL standart pestisit solüsyonunda (model inhibitör olarak parokson kullanıldı) 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra biyosensör saf su ile yıkandı. Biyosensör, hafif manyetik karıştırma altında 5 mL fosfat tampon pH 7 içeren hücreye aktarıldı ve amperometrik ölçüm sırasında AThCl enjekte edildi. Elde edilen akım değişimi  $I_1$  olarak kaydedildi. Enzimin aktif bölgelerinin bloke edilmesi nedeniyle biyosensör yanıtındaki azalma, aşağıdaki denklem kullanılarak inhibisyon yüzdesi (% I) olarak hesaplandı.

$$\% I = \frac{I_0 - I_1}{I_0} \times 100$$

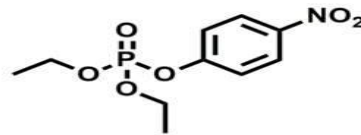




Şekil 3.4 Pestisit tayini için amperometrik ölçüm sistemi

### 3.9.2 Süt ve Çeşme Suyu Örneklerinde AChE Biyosensörü ile Pestisit Analizi

Hazırlanan enzim elektrodunun süt ve çeşme suyu örneklerinde parokson tayini yapılabilmesi için standart ekleme yöntemiyle, her bir numune için % geri kazanım değerleri hesaplandı. Süt örneklerinde pestisit parokson tayini için basit bir seyreltme yöntemi kullanıldı; 2.5 mL süt ve 2.5 mL pH 7 fosfat tamponu karıştırıldı ve ardından karışıma çeşitli konsantrasyonlarda parokson eklendi. Parokson pestisiti için kalibrasyon eğrileri çizildi ve bu verilere dayanarak süt numunelerindeki pestisit içeriği ilgili kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplandı. Çeşme suyu numuneleri pestisit analizinde herhangi bir ön işleme tabi tutulmadan doğrudan kullanıldı ve pestisit içeriği süt örneklerinde olduğu gibi aynı şekilde kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplandı. Şekil 3.5’de parokson yapısı gösterilmiştir.



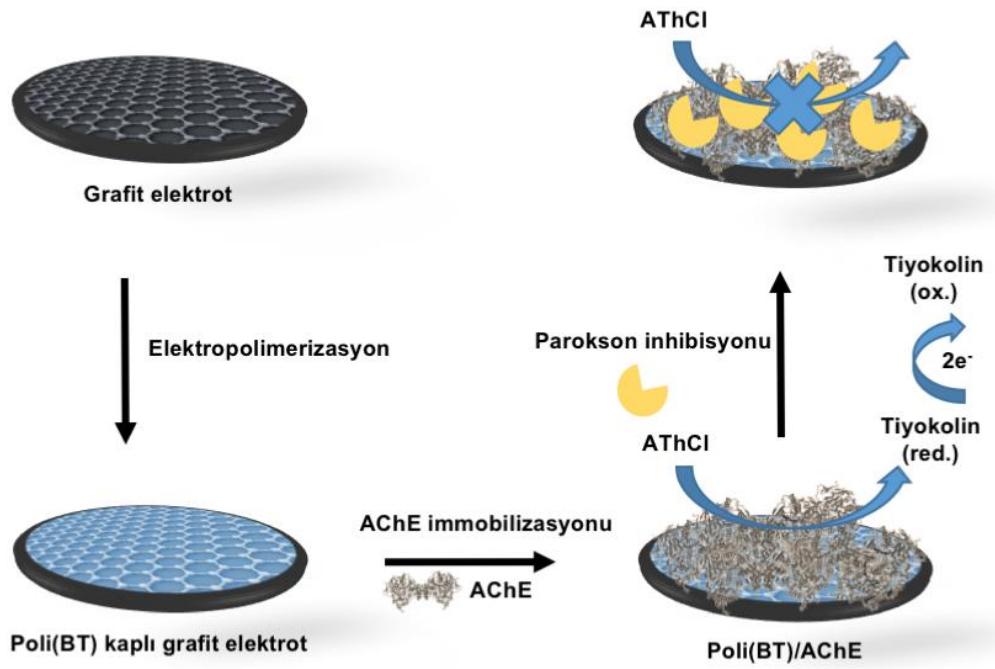
Şekil 3. 5 Parokson pestisitinin yapısı

#### 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada organofosforlu pestisit tayini için iletken polimer tabanlı yeni bir biyosensör geliştirilmiştir. Deneylede amaç poli(2,2'-(9,9-Dioctyl-9h-Fluorene-2,7-Diyl)bisthiophene) (Poli(BT))'i grafit elektrot yüzeylerine elektrokimyasal yöntem kullanarak kaplamak, etkin asetilkolinesteraz (AChE) enzim immobilizasyonu sağlamak, modifiye elektrotları karakterize etmek ve örnek numunelerde parokson pestisit tayininde kullanmaktır. Deneylede elektropolimerizasyon yöntemi olarak dönüşümlü voltametri (CV) tekniği kullanılarak iletken polimer modifiye yüzeyler elde edilmiştir.

Modifiye elektrot yüzeylerin elektrokimyasal cevapları redoks probu içeren 0.1 M KCl ortamında CV ile incelenmiştir. Aynı elektrotların yüzey morfolojileri ise farklı büyütmelerde taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Ek olarak, enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) sonuçlarından da faydalanılmıştır.

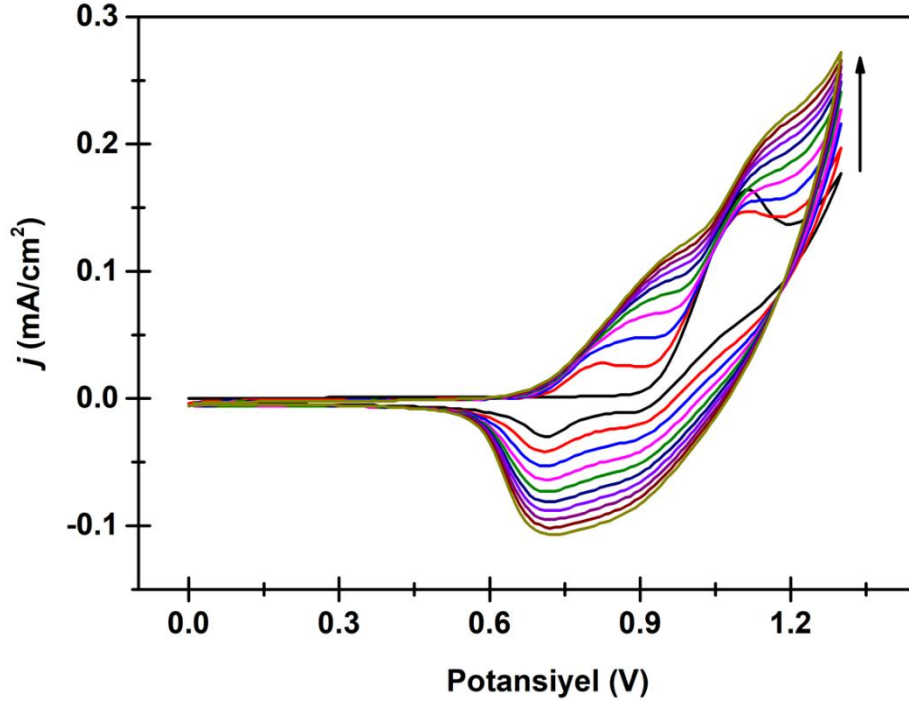
Biyosensör cevapları amperometrik yöntem kullanılarak üç elektrotlu sistem ile gerçekleştirilmiştir. Parokson tayini için öncelikle AThCl tayinine yönelik bir biyosensör geliştirilmiştir. Geliştirilen biyosensör sisteminde; AChE varlığında gerçekleşen enzimatik reaksiyon sonrasında oluşan elektroaktif tiyokolinin elektrokimyasal ölçümü temel alınmıştır. Hazırlanan biyosensörün en iyi çalışma koşulları belirlenmiş ve performansını etkileyen faktörler incelenmiştir. Daha sonra gerçek ortamlarda olası girişim etkisine sahip olabilecek kimyasalların pestisit tayini üzerine etkileri incelenmiş ve hazırlanan modifiye elektrot süt ve çeşme suyu örneklerinde pestisit tayininde kullanılmıştır. İlerleyen bölümlerde ilgili çalışmalar şekillerle birlikte verilmiştir. Parokson tayini için Poli(BT)/AChE biyosensörünün oluşumunun şematik gösterimi Şekil 4.1'de verilmiştir.



**Şekil 4.1** Parokson tayini için Poli(BT)/AChE biyosensörünün oluşumunun şematik gösterimi

#### 4.1 Elektropolimerizasyon ile Poli(BT) Sentezi

İletken polimer, poli(BT), elektrokimyasal polimerizasyon yöntemi ile daha önce zımparalanmış ve temizlenmiş grafit elektrotlar üzerinde sentezlenmiştir. Polimer dögüsel voltametre ile 0.1 M NaClO<sub>4</sub>/LiClO<sub>4</sub>/ACN elektrolit/çözücü içerisinde elektrot üzerine 0 V ve +1.3 V arasında 10 dögü gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.2'den görüleceği gibi her dögü de akım şiddetinin artması monomerin elektrot yüzeyinde polimerleştiğini göstermektedir. BT monomerinin yükseltgenme potansiyeli 1.1 V olarak belirlenmiş olup polimerin yükseltgenme ve indirgenme potansiyelleri sırasıyla 0.98 ve 0.86 V olarak bulunmuştur. Polimerizasyondan sonra polimer kaplı elektrot yüzeyi organik safsızlıklardan kurtulmak için saf su ile yıkanmıştır. Polimerizasyonun ilk 10 dögüsü Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.2** BT'nin grafit üzerinde 100 mVs<sup>-1</sup> tarama hızında elektrot yüzeyine 0.1 M NaClO<sub>4</sub>/LiClO<sub>4</sub>/ACN elektrolit-çözücü sisteminde polimerleşmesinin dönüşümsel voltamogramı (Döngü sayısı 10)

#### 4.2 AChE Esaslı Amperometrik Biyosensör Optimizasyonu Sonuçları

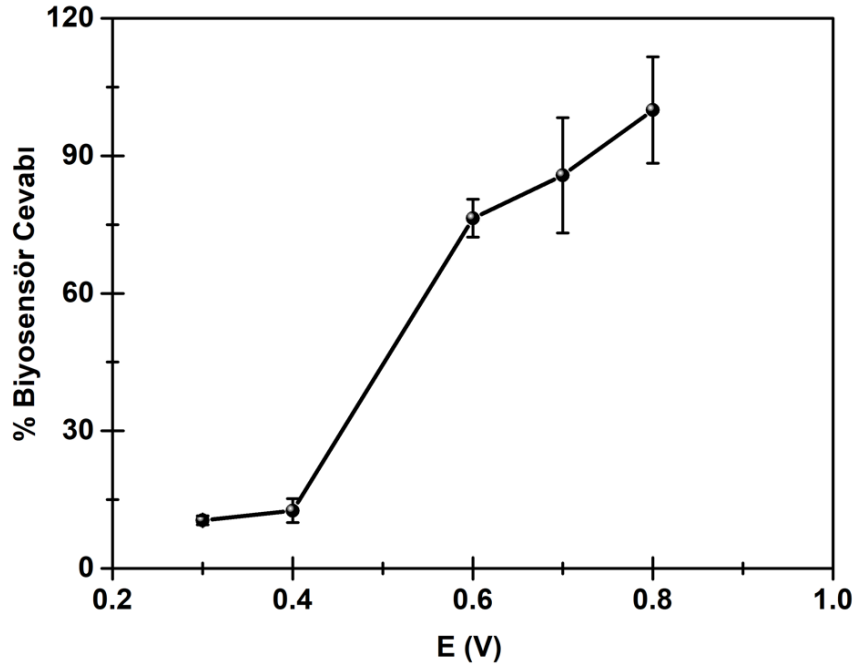
Geliştirilen bir biyosensör uzun vadede kullanıma yönelik tasarlanmalı ve gerçek örnek uygulamaları için kararlı ve tekrar üretilebilir olmalıdır. Böyle bir biyosensör elde etmek için biyosensörün performansını etkileyen tüm koşullar (uygun çalışma potansiyeli, poli(BT) filminin kalınlığı, glutaraldehit miktarı, pH değeri) optimize edilmelidir. Bu nedenle, biyosensör cevabını etkileyen bütün parametreler optimize edilmiş ve ölçümler esnasında sabit tutulmuştur.

Özellikle enzim bazlı biyosensörlerde, uygun immobilizasyon matrisin seçimi biyosensörün performansı açısından önemli bir yere sahiptir. İyi tasarlanmış bir matris ile biyomoleküllerin üç boyutlu yapısı korunarak uzun raf ömrüne sahip biyosensörler elde edebilmek mümkündür. İletken polimerler, enzimi çevirici yüzeyinde sabitlerken aynı zamanda da enzimlerin en uygun bir konformasyon yapısında konumlanmalarını sağladığından bu bağlamda ideal adaylardır.

Bu çalışmada, AChE biyosensörlerinin optimizasyonuna ilişkin çalışmalarda çeşitli parametrelerin biyosensör cevabına etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, hazırlama ve çalışma koşullarının optimizasyonuna yönelik olarak enzim miktarının, polimer film kalınlığının, çalışma potansiyelinin ve pH'ın biyosensör cevabına etkisi araştırılmıştır.

#### **4.2.1 Uygulama Potansiyelinin Belirlenmesi**

Çalışmanın hem biyosensör optimizasyon aşamasında hem de pestisit çalışmalarında kullanılmak üzere +0.3 V ile +0.8 V arasında değişen uygulama voltaj değerlerinde ölçümler yapılmıştır. Şekil 4.3 incelendiğinde çalışma potansiyeli +0.3 V'dan +0.8 V'a doğru arttıkça akım değerlerinin arttığı gözlenmiştir. Fakat analiz örneklerinde bulunabilecek elektroaktif girişim yapabilecek maddeler yüksek çalışma potansiyellerinde kolaylıkla yükseltgenip girişim etkisi yapabilmektedir (Zhang ve ark., 2007). Bu nedenle çalışmada ölçümlerdeki tekrarlanabilirliğin yüksek olduğu ve girişim etkilerinin en az olabileceği +0.6 V çalışma potansiyeli olarak seçilmiştir (Şekil 4.3.). AChE temelli biyosensör çalışmaları incelendiğinde, pestisitlerin tespiti için tasarlanan AChE sensörlerinin çoğu, enzimatik ürün olan tiyokolinin yüksek bir potansiyel gerektirdiğinden +0.6 ila +0.8 V aralığında çalıştığı görülmüştür. Bu tez kapsamında, sistem potansiyeli olan +0.6 V de literatür ile uyumlu olup, olası bir girişim etkisi olmadan süt ve çeşme suyu numunelerinde rahatlıkla analiz yapılabilmektedir. Ayrıca, en düşük standart sapmaya sahip ölçüm sonuçları ve kararlı amperometrik sinyaller bu potansiyel değeri uygulandığında elde edilmiştir.



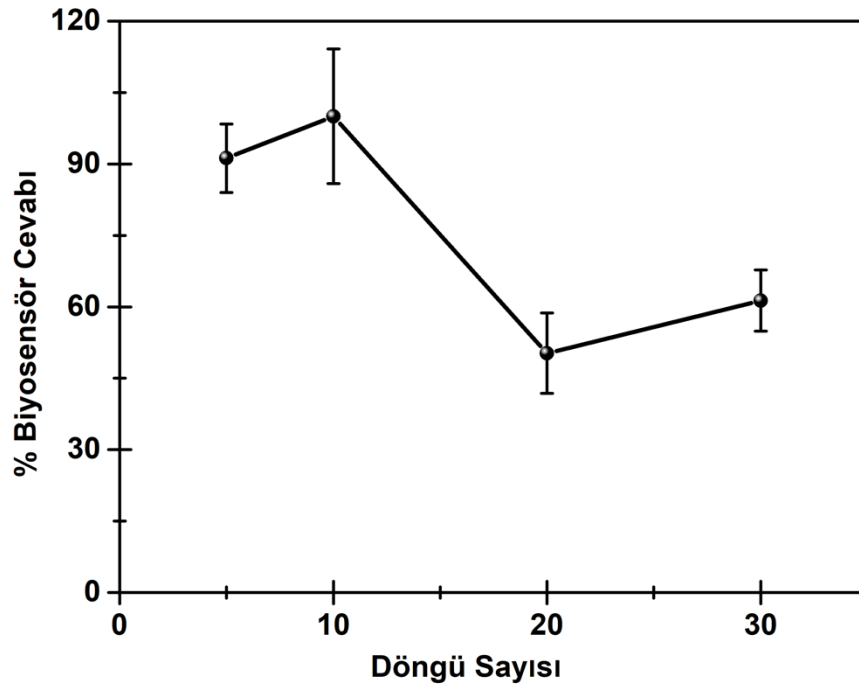
**Şekil 4.3** Çalışma potansiyelinin belirlenmesi (50 mM, pH = 7 fosfat tamponu, 25 °C). Hata çubukları, üç ölçümün standart sapmasını (SD) göstermektedir ([AThCl]: 4.0 mM)

#### 4.2.2 Poli(BT) Film Kalınlığının Belirlenmesi

AChE enziminin poli(BT) iletken polimerinin yüzeyine etkin bağlanmasını sağlamak için, polimer kalınlığı optimize edilmiştir. Bu olay, elektropolimerizasyon esnasında gerçekleşmiştir. Döngü sayısı, polimer yüzeyindeki yük sayısını dolayısıyla polimer filminin kalınlığını belirlemektedir. Diğer parametreler sabit tutularak farklı döngü sayıları (5, 10, 20 ve 30) ile hazırlanan elektrotların amperometrik cevapları karşılaştırılmıştır.

Optimum döngü sayısının belirlenmesi için potansiyometrik döngü sayısı 5, 10, 20 ve 30 olarak değiştirilmiştir. Elde edilen sonuçlarla polimer döngü sayısı ve % biyosensör cevabı arasında grafik çizilmiştir. En yüksek amperometrik sinyale sahip biyosensöre göre optimum döngü sayısı 10 olarak bulunmuştur (Şekil 4.4). Şekil 4.4'ten görüldüğü gibi döngü sayısı 20 ve 30 olan polimerlerle elde edilen enzimatik biyosensörlerdeki akım değerleri optimum değer kullanıldığında elde edilen akım değerlerine oranla oldukça düşüktür. Polimer film elektrot yüzeyinde çok kalın olduğunda, grafit elektrot yüzey ile enzim moleküllerinin aktif bölgesi arasındaki

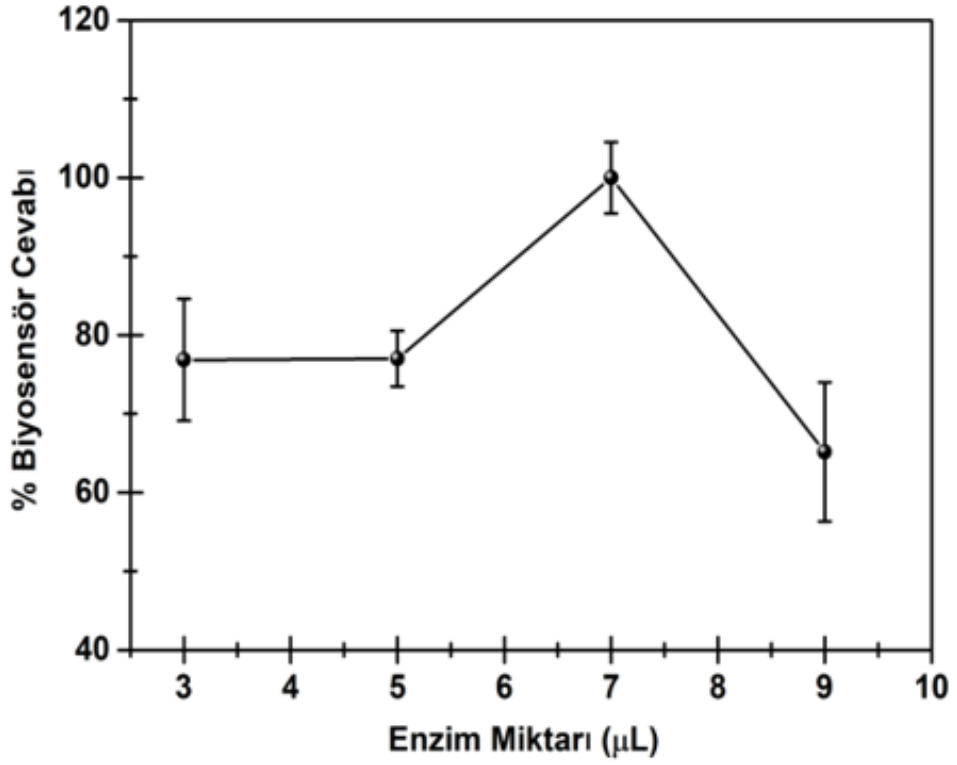
mesafe istenmeyen şekilde fazla olmakta ve bu da substratın enzim molekülü ile etkileştiğinde enzimatik reaksiyon sonucu açığa çıkan elektronların transducer yüzeyine uygun bir şekilde transfer olamamasına neden olabilmektedir. Ya da tam tersi bir durum olduğunda, çok ince polimer filmlerle elde edilen biyosensörlerde enzim molekülü çevresel koşullardan yeterli derecede korunamayabilmektedir (Soylemez ve ark., 2017). Sonuç olarak optimum değerle elde edilen biyosensörün diğerlerine göre daha iyi sonuç verdiği bulunmuştur.



**Şekil 4.4** Poli(BT) kalınlığının biyosensöre etkisi (50 mM, pH = 7 fosfat tamponu, 25 °C)

#### 4.2.3 Enzim Miktarının Belirlenmesi

Biyosensör performansını etkileyen parametrelerden biri de enzim miktarıdır. Çalışmanın bu kısmında diğer bileşenler sabit tutularak farklı miktarlarda AChE içeren biyosensörlere ilişkin sonuçlar verilmektedir. Hazırlanan AChE biyosensörleri ile farklı enzim miktarları ve % biyosensör cevabı arasında grafik oluşturulmuştur. Şekil 4.5'den görüldüğü gibi 3, 5 ve 9  $\mu\text{L}$  AChE ile hazırlanan enzimatik biyosensörlerle elde edilen % biyosensör cevabı 7  $\mu\text{L}$  AChE kullanılarak elde edilen % biyosensör cevabına oranla oldukça düşüktür. Bu nedenle 7  $\mu\text{L}$  AChE sahip biyosensörler ile çalışmalara devam edilmiştir.

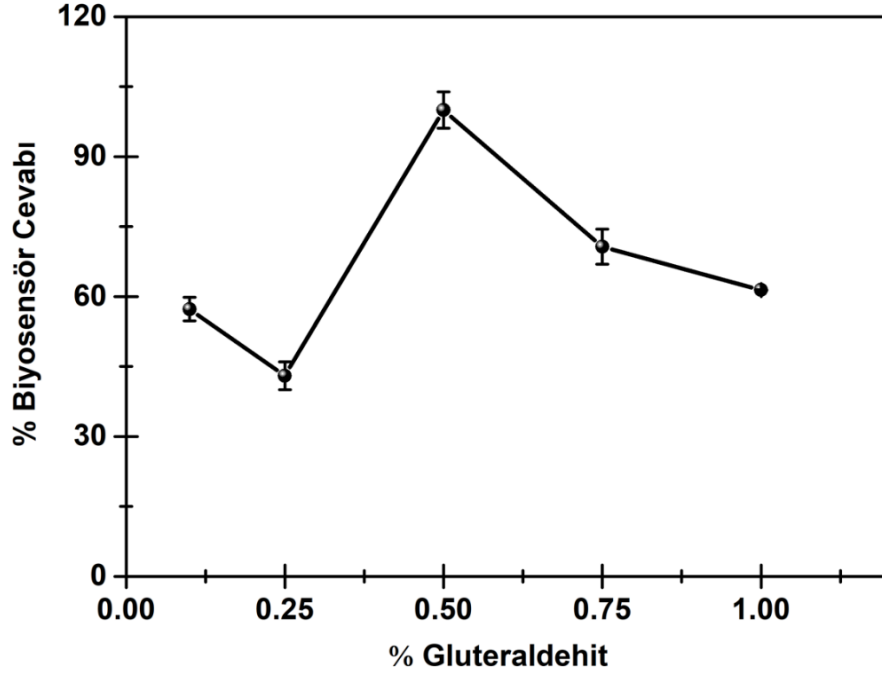


Şekil 4.5 Enzim miktarının biyosensör yanıtına etkisi (50 mM, pH = 7 fosfat tamponu, 25 °C).

#### 4.2.4 Çapraz Bağlayıcı Miktarının Belirlenmesi

Glutaraldehit (GA), biyosensör hazırlanmasında çapraz bağlama ajanı olarak kullanılmıştır. GA, Poli(BT) matriks yüzeyinde konumlanan enzim molekülünün uygun konformasyonunda olmasını sağlamaktadır. Yapılan deneylerle, %0.1, %0.25, %0.5, %0.75 ve %1.0 GA değerleri test edilmiş ve optimum değer % 0.5 GA ile elde edilmiştir (Şekil 4.6).

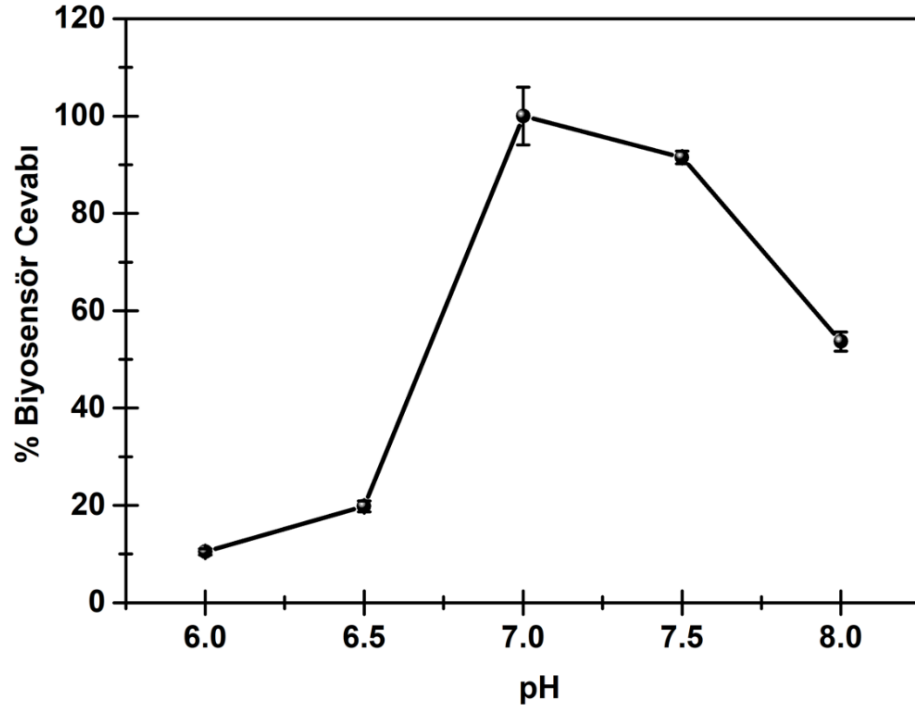




**Şekil 4.6** Biyosensör yanıtına çapraz bağlayıcı (GA) etkisi (50 mM, pH = 7 fosfat tamponu, 25 °C)

#### 4.2.5 pH Optimizasyonu

Enzimler protein yapısındaki moleküller olduklarından katalitik aktiviteleri ortamın pH değerinden önemli oranda etkilenmektedir. AChE biyosensörlerinin optimum pH değerini belirlemek amacıyla Poli(BT)/AChE biyosensörleri ile farklı pH değerlerine sahip tampon çözeltilerde amperometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda pH ve % biyosensör cevabı arasında çizilen optimum pH grafiği Şekil 4.7’de verilmiştir. Görüldüğü üzere sistem için optimum pH değeri 7 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar literatürde yer alan AChE biyosensörlerdeki pH değeri ile uyumludur (Kesik ve ark., 2014; Chauhan ve ark., 2016).



Şekil 4.7 pH değişiminin biyosensöre etkisi (50 mM, pH 7 fosfat tamponu, 25 ° C)

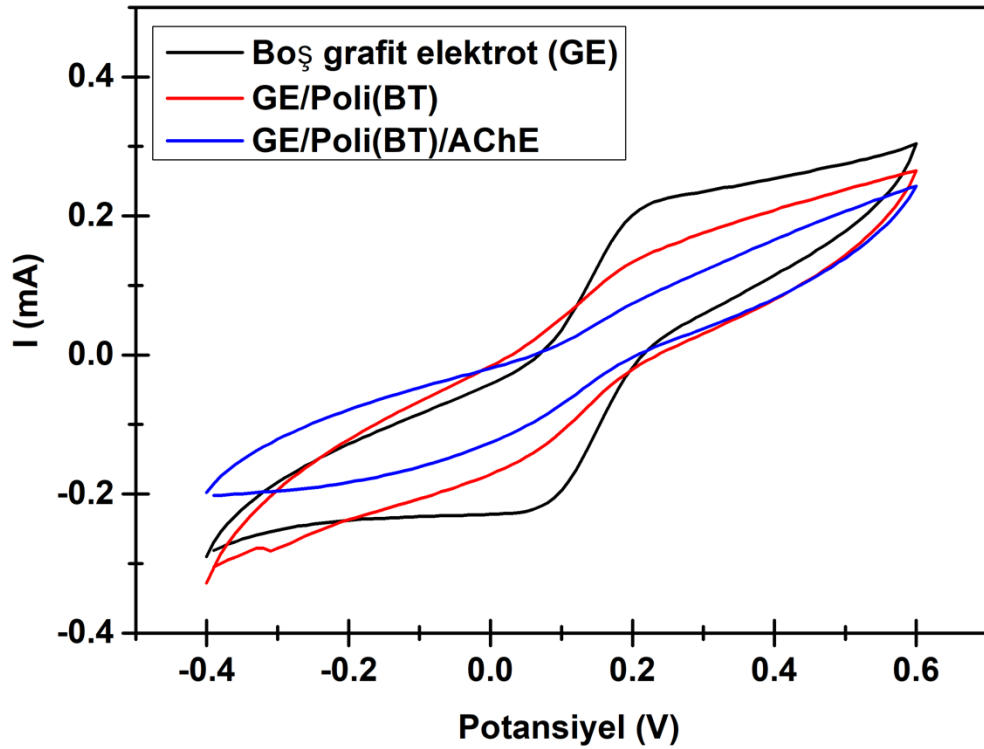
#### 4.3 Poli(BT) ve Poli(BT)/AChE Modifiye Edilmiş Yüzeylerin Elektrokimyasal ve Morfolojik Karakterizasyonu

Optimum koşullarda hazırlanan Poli(BT) ve Poli(BT)/AChE modifiye elektrotların yüzey karakterizasyonu ve elektron transferi mekanizmalarını araştırmak amacıyla, döngüsel voltametri (CV) tekniği kullanılmıştır. Modifiye edilmemiş elektrot modifiye elektrotlarla kıyaslamalar yapılmıştır. Ayrıca, modifiye yüzeylerdeki morfolojik değişimler de taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edilmiştir. Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) ile de elementel dağılım incelenmiştir.

Çözelti içindeki elektrot yüzeyi ve türler arasındaki elektron transfer mekanizmasını incelemek amacıyla, döngüsel voltametri deneyleri 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  varlığında gerçekleştirilmiştir. Çıplak, Poli(BT) ve Poli(BT)/AChE modifiye grafit elektrot için,  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  yükselgenme-indirgenme pikleri Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

Ortalama elektroaktif yüzey alanı Randles-Sevcik eşitliğine göre hesaplanmıştır. Bu eşitliğe göre, pik akımlarındaki artışın etkin yüzey alanlarındaki

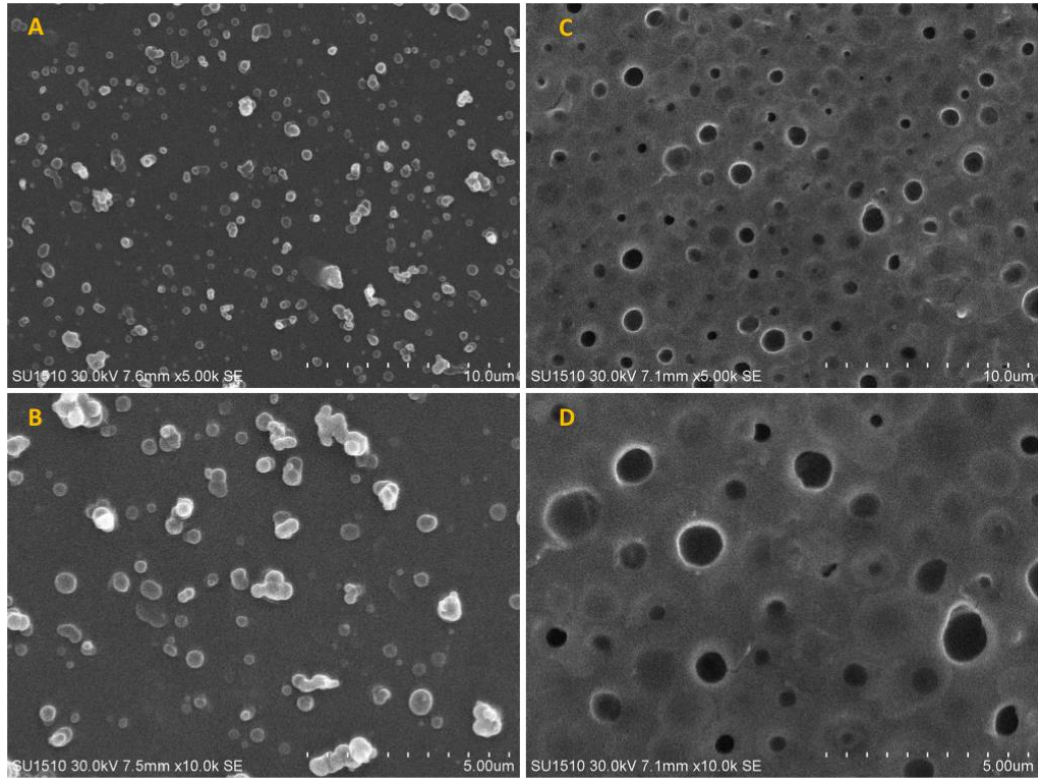
artışla ilişkili olduğu bilinmektedir. Elektroaktif yüzey alanı, çıplak elektrot için  $0.186 \text{ cm}^2$ , Poli(BT) ve Poli(BT)/AChE için ise sırasıyla  $0.124 \text{ cm}^2$  ve  $0.07 \text{ cm}^2$  olarak hesaplanmıştır. Boş elektrot için CV değerlerine bakıldığı zaman redoks mediyatör varlığında dönüşümlü oksidasyon ve redüksiyon pikleri keskin bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.8). Çıplak grafit elektrota kıyasla poli(BT)'de elektrot yüzeyine bir tabaka eklenmesi nedeniyle oksidasyon akımında düşüş gözlemlenmiştir. Elektrot yüzeyi üzerinde art arda katman oluşumu, farklı ara yüzey yapılarına neden olmuştur. Sonraki adımda, elektrot yüzeyinin Poli(BT)/AChE ile modifikasyonu sonrasında pik akımlarında belirgin bir azalma olduğu görülmektedir. Her ne kadar yüzey iletken polimer ile kaplanmış olsa da yalıtkan özelliğe sahip biyomolekülün yüzeyde bulunması iletkenlikte azalmaya neden olmuştur. Ancak, biyomolekül modifiyeli elektroaktif yüzey alanı etkin elektron transferi için yeterlidir. Ayrıca, pik akımlarında azalmasının olması grafit elektrot yüzeyinde modifikasyon adımlarının başarıyla gerçekleştiğini kanıtlamaktadır.



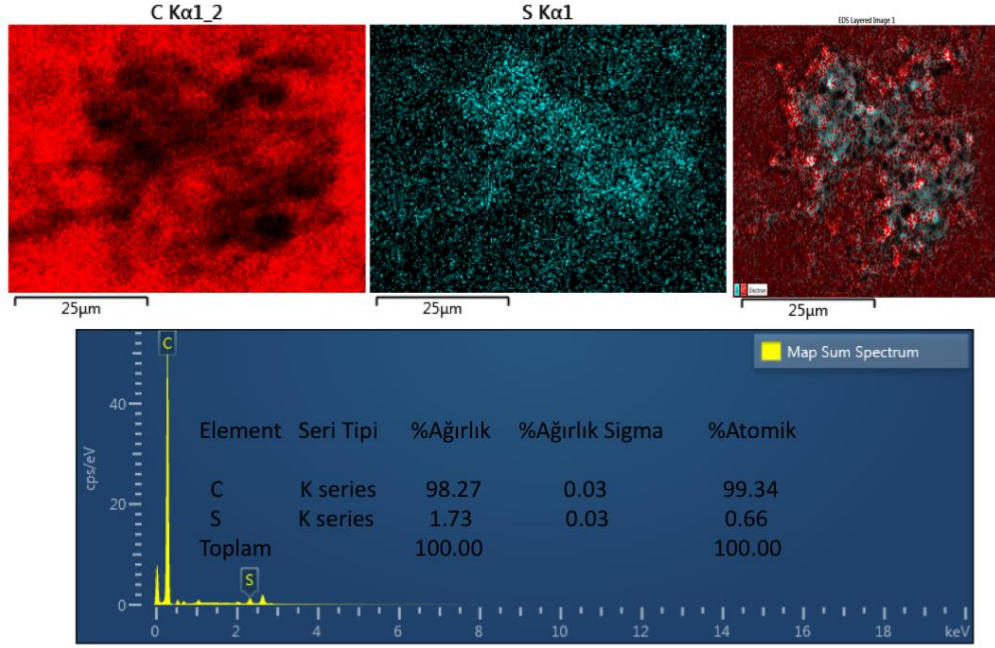
**Şekil 4.8** Boş grafit elektrot, Poli(BT) ve Poli(BT)/AChE'in sırasıyla döngüsel voltajları

Poli(BT) ve Poli(BT)/AChE modifiye yüzeylerin morfolojisi incelenmek üzere, SEM görüntüleri alınmıştır. Şekil 4.9'da sırasıyla farklı büyütme ölçeklerinde Poli(BT)

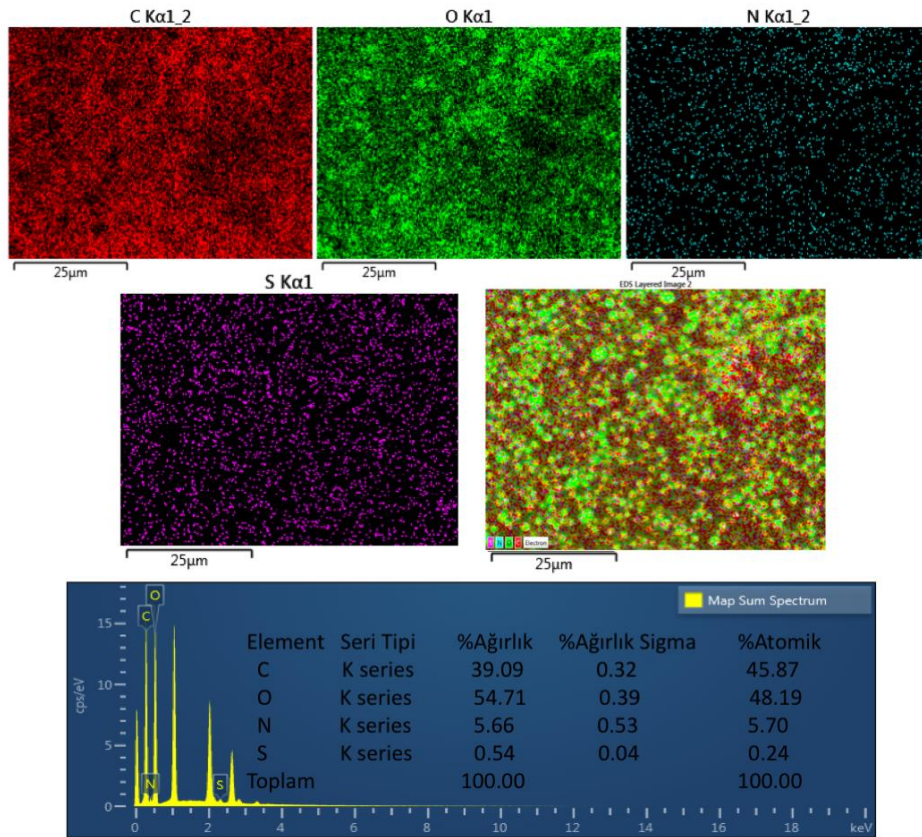
modifiye elektrot (Şekil 4.9 A-B) ve Poli(BT)/AChE modifiye elektrot (Şekil 4.9-C-D)'a ait SEM görüntüleri verilmektedir. Şekil 4.9'da gösterildiği üzere modifiye yüzeylerin homojen film dağılımına sahip olduğu gözlenmiştir. Poli(BT)'nin elektron yüzeyine homojen bir şekilde kaplandığı gözlenmiştir (Şekil 4.9.A-B). AChE enziminin Poli(BT)/Grafitelektrotu yüzeyine immobilizasyonundan sonra yüzey morfolojisinin tamamen değiştiği ve enzimlerin yüzeyde ikinci bir tabaka olarak kaplandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.9.C-D). Ayrıca, yapılarıdaki elemental dağılım EDX analiz sonuçları ile Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de gösterilmiştir. Polimerik yapı ve polimer kaplı elektrot yüzeyindeki biyomolekülün varlığı EDX analizi ile de aydınlatılmıştır.



**Şekil 4.9** A ve B Poli(BT) (5000x ve 10000x büyütmede); C ve D Poli(BT)/AChE için (5000x ve 10000x büyütmede) SEM görüntüleri



Şekil 4.10 Poli(BT) modifiye elektrot için EDX analiz sonuçları



Şekil 4.11 Poli(BT)/AChE modifiye elektrot için EDX analiz sonuçları

## 4.4 Poli(BT)/AChE Biyosensörünün Analitik Uygulamaları

### 4.4.1 Kalibrasyon Eğrisi Ve Dedeksiyon Limiti

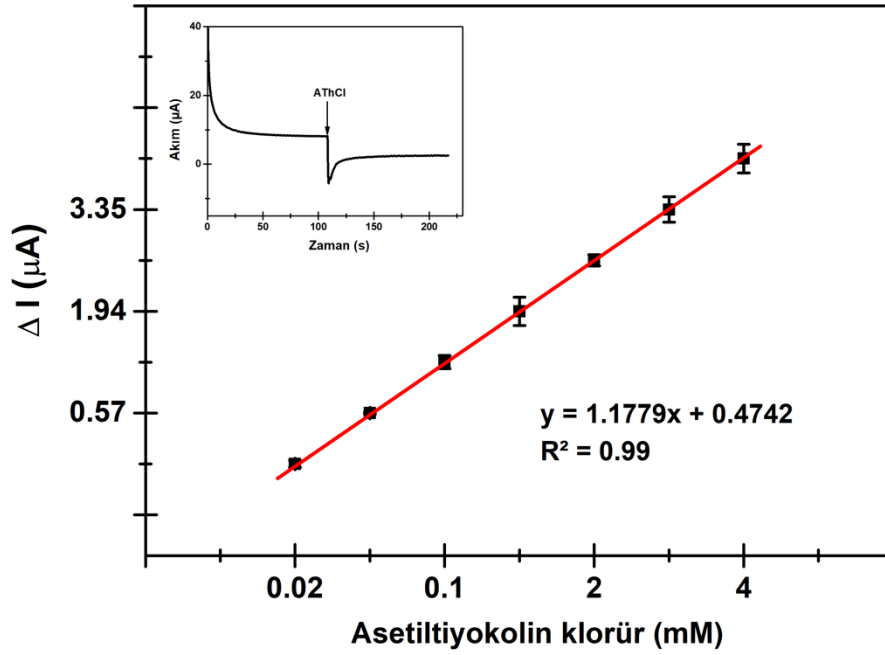
Poli(BT)/AChE biyosensörünün AThCl için kalibrasyon eğrileri Şekil 4.12' de gösterilmiştir. Amperometrik ölçümler, optimum koşullarda hazırlanan Poli(BT) modifiyeli grafit elektrot ile gerçekleştirilmiştir. Poli(BT)/AChE biyosensörünün 0.025-4.0 mM doğrusal AThCl konsantrasyonu aralığındaki kalibrasyon denklemi  $y=1.1779x+0.4742$  ( $R^2=0.99$ ) olarak bulunmuştur. Aynı zamanda  $K_M$  (gözlünen) ve  $I_{max}$  değerleri Linewaver–Burk eşitliğine göre hesaplanmıştır. Poli(BT)/AChE biyosensörü için bu değerler sırasıyla 0.21 mM ve 2.77  $\mu A$  olarak bulunmuştur. Bu tez kapsamında hesaplanan  $K_M$  değeri literatür örnekleri ile karşılaştırıldığında (polietilenimin/AChE (1.5 mM) (Vakurov ve ark., 2004); AChE PbO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub>/Ti/AChE (1.34 mM) (Wei ve ark., 2009); karbon past elektrota entrap edilen AChE (1.12 mM) (Di ve ark., 2011); poli(FBThF)/f-MNPs/AChE (0.7311 mM) (Cancar ve ark., 2016); Karbon nanotüp modifiyeli GC/AChE (1.75 mM) (Liu ve Lin, 2006) ve MWCNT-modifiyeli poli(SNS-NH<sub>2</sub>) (1.038 mM) (Kesik ve ark., 2014) daha düşük olduğu görülmüştür. Sonuçlara göre, tasarlanan biyosensördeki elektrot yüzeyinde bulunan AChE'nin substrata yüksek ilgi gösterdiği söylenebilir.

Poli(BT) her ne kadar yüzeyinde enzim ile kovalent bağ yapabilecek fonksiyonel grup barındırmasa da polimer yapısında alkil grupların bulunması sayesinde enzim molekülündeki hidrofobik kısımlar ile etkin şekilde etkileşime girebilmektedir. Ayrıca, polimerdeki aromatik gruplar ile enzimdeki aromatik yapılar güçlü  $\pi$ - $\pi$  etkileşimlere sahiptirler. Böylece, tüm bu etkileşimler biyomoleküllerin üç boyutlu yapılarının korunmasını sağlarken aynı zamanda da iyi bir enzim immobilizasyonu için etkin bir matriks meydana getirmektedir. İlaveten, enzim immobilizasyonu sonrasında meydana gelen yapılar üzerindeki gözenekler, substratın difüzyonunu kolaylaştırdığı düşünülmektedir.

Poli(BT)/AChE biyosensörünün alt tayin sınırının belirlenmesi amacıyla gözlenebilme sınırı olarak da tanımlanan dedeksiyon limiti (LOD) hesaplanmalıdır. Bu amaçla, Poli(BT)/AChE biyosensörünün kalibrasyon eğrisinin en küçük değeri olan 0.025 mM AThCl konsantrasyonu ile art arda alınan ölçümler ile kalibrasyon denklemi kullanılarak LOD hesaplanmıştır. Bunun sonucunda LOD yani biyosensörün tayin edebileceği en küçük değer 0.015 mM olarak bulunmuştur. Biyosensörün



hassasiyet değeri ise  $19.12 \mu\text{AmM}^{-1}\text{cm}^{-2}$  olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan hassasiyet değerinin literatür örnekleri ile karşılaştırıldığında cGO-NTA-Ni-AChE ( $2.23 \mu\text{AmM}^{-1}$ ) (Zhang ve ark., 2014); AChE/CPE ( $0.69 \mu\text{AmM}^{-1}$ ) (Di Tuoro ve ark., 2011); AChE/hybridpolymer/MWCNT ( $0.093 \mu\text{AmM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ ) (Ivanov ve ark., 2012) ve AChE- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}/\text{c-MWCNTs}$  ( $0.402 \text{ mA}/\mu\text{M}$ ) (Chauhan ve ark., 2012) geliştirilen biyosensörün yüksek hassasiyete ve uzun sürede kullanım potansiyeline sahip olduğu görülmektedir.



**Şekil 4. 12** Poli(BT)/AChE ile hazırlanan biyosensörünün AThCl kalibrasyon eğrisi (50 mM, pH 7 fosfat tamponu çalışma ortamı; 25 °C, +0.6 V çalışma potansiyeli; hata çubukları üç ölçümün standart sapmasını gösterir)

#### 4.4.2 Tekrarlanabilirlik ve Operasyonel Kararlılık

Poli(BT)/AChE biyosensörünün belirli AThCl konsantrasyonunda alınan 10 tekrarlı ölçüm sonucunda hesaplanan ölçümlerin standart sapmaları (S.S.) ve yüzde varyasyon katsayısı (%V.K.) hesaplanmıştır. AThCl konsantrasyonuyla alınan sonuçlara göre, S.S.:  $\pm 0.16$  ve %V.K.: % 3.6 olarak hesaplanmıştır. Operasyonel kararlılık analizi için geliştirilen biyosensör ile belirli AThCl konsantrasyonunda belirli süre boyunca tekrarlı ölçümler alınarak gerekli hesaplamalar yapılmıştır. Bunun sonucunda biyosensör kararlılığında 24 saat boyunca herhangi bir düşüş gözlenmezken; 96 saat sonra % 10, aktivite kaybı gözlenmiştir. 18 günün sonunda ise geliştirilen Poli(BT)/AChE biyosensörün cevabının yaklaşık % 82'sini koruduğu

görülmüştür. Hazırlanan biyosensörün kararlılığın iyi olması elektrot modifikasyonunda kullanılan Poli(BT)'nin AChE'in enzimatik aktivitesini koruması için uygun bir mikroçevre oluşturması ile ilişkilendirilebilir. Literatürde AChE biyosensörleri ile ilgili çalışmalar incelendiğinde farklı raf ömrüne sahip elektrotlar bulunduğu görülmüştür (Zhang ve ark., 2019; Li ve ark., 2017; Cancar ve ark., 2016). Geliştirilen biyosensörlerin raf ömürlerinin birbirinden farklılık göstermesinin immobilizasyon yöntemi ve matriks seçimi ile ilgili olduğu söylenebilir. Biyosensörün analitik performans değerleri Çizelge 4.1'de özetlenmiştir.

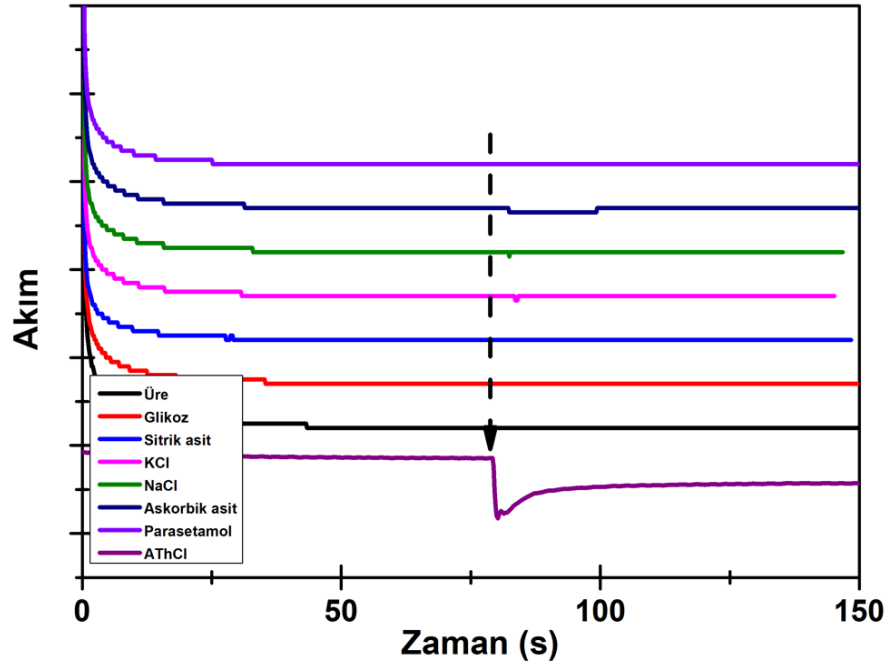
**Çizelge 4.1** Poli(BT)/AChE biyosensörünün analitik performans değerleri

Parametre	Sonuç
$K_M$	0.21 mM
$I_{max}$	2.77 $\mu A$
Doğrusal aralık	0.025-4.0 mM
Hassasiyet	19.12 $\mu A \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$
Dedeksiyon limiti	0.015 mM
Operasyonel kararlılık	% 10 azalma (96 saat sonra)

#### 4.4.3 Girişimci Etkisi

Enzimatik biyosensörlerdeki en kritik noktalardan biri, gerçek örneklerin kompleks matriksinde bulunan diğer bileşiklerin girişim etkisini önlemeye çalışmaktır. Bu nedenle, Poli(BT)/AChE biyosensöründe girişim etkisinin analizi için ölçüm hücrelerinde son konsantrasyon AThCl ve her biri 0.25 mM olacak şekilde parasetamol, askorbik asit, sitrik asit, glikoz, üre, KCl ve NaCl ayrı ayrı substrat olarak eklenerek Şekil 4.13' deki grafik elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, substrat olarak eklenen kimyasal bileşiklerin AThCl karşılaştırıldığında Poli(BT)/AChE biyosensörü üzerinde herhangi bir girişim etkisi göstermediği gözlenmiştir.





**Şekil 4.13** Bazı kimyasal bileşiklerin biyosensör cevabına etkisi (50 mM, pH 7 fosfat tamponu içerisinde; 25 °C, +0.6 V çalışma potansiyeli)

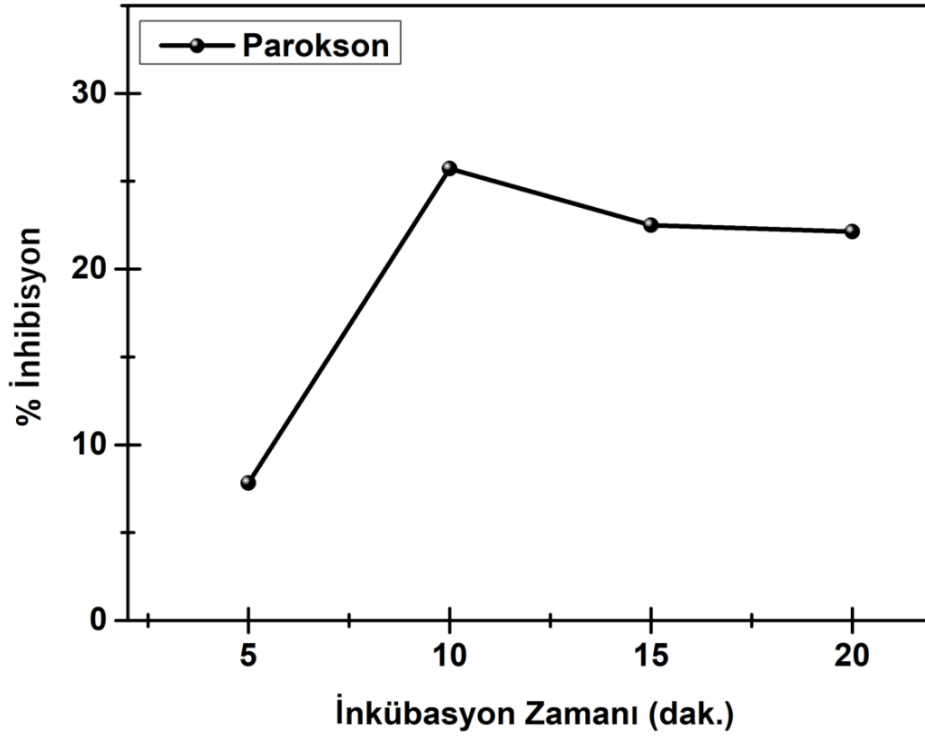
## 4.5 AChE İnhibisyon Deneyleri

### 4.5.1 Poli(BT)/AChE Biyosensörü ile Parokson Tayini

Poli(BT)/AChE biyosensörünün oluşturulmasından sonra, AChE'ye karşı pestisit duyarlılığını araştırmak için model inhibitör olarak parokson kullanılmıştır. Pestisit analizinde en önemli parametrelerden biri inkübasyon süresidir. Geliştirilen biyosensör, belirli bir konsantrasyonda standart pestisit çözeltisine birkaç dakika daldırılmış ve biyosensör tepkileri araştırılmıştır. Maruziyetin ardından, pestisitler AChE'nin serin aktif bölgesine kovalent olarak bağlanmaktadır. Serin hidroksil grubunun pestisitte bulunan fosfat grubu tarafından bloke edilmesi, biyosensör yanıtında azalmaya neden olmaktadır. Dolayısıyla bu inhibisyon, enzimin aktivitesinde de bir azalmaya yol açmaktadır. Başka bir deyişle, inkübasyon süresi, enzim ile inhibitör arasındaki reaksiyon için gereken süredir. Uzun kuluçka süreleri, analizi oldukça yavaşlatmaktadır.

Enzim inhibisyonu için optimum zaman aralığını araştırmak için optimize edilmiş biyosensör belirli bir süre için ayrı ayrı belirli konsantrasyona sahip pestisit çözeltisine daldırılmıştır. Geliştirilen biyosensör 0.01  $\mu$ M parokson çözeltisinde 5, 10, 15 ve 20 dakikalık farklı inkübasyon sürelerinde bekletilmiştir. Daha sonra 4 mM

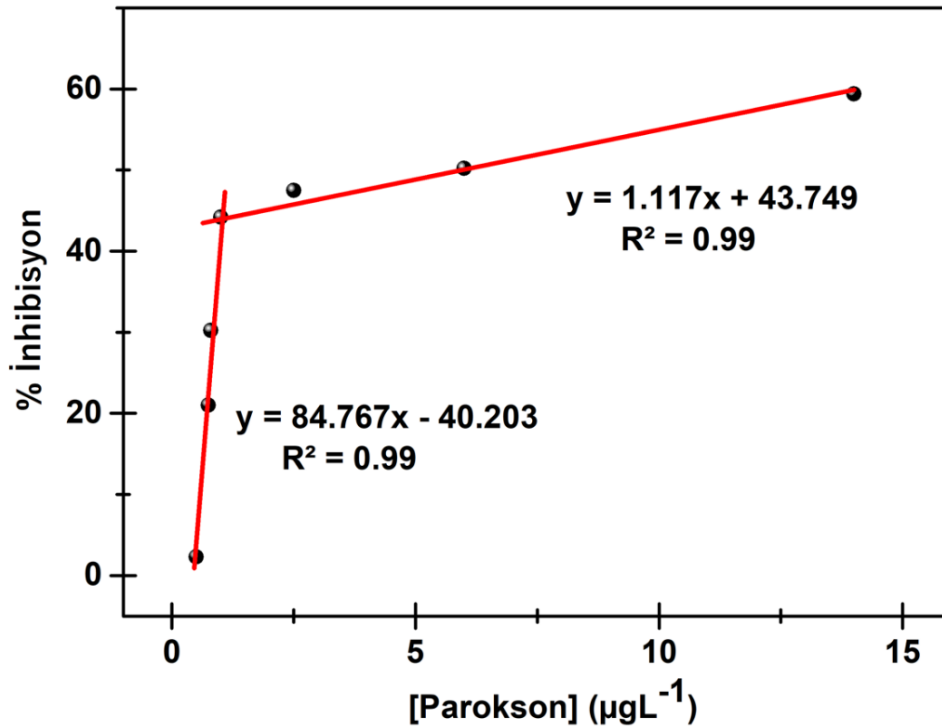
A<sub>Th</sub>Cl substratına karşı amperometrik cevabı izlenmiştir. 10 dk. inkübasyon süresi uygun bulunmuş ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmıştır (Şekil 4.14). Bu süreden sonra enzim inhibisyon derecesinin azaldığı ve sonrasında ise sabitlendiği görülmüştür. Hazırlanan biyosensör 10 dk. pestisit çözeltisinde bekletildikten sonra % 25.72 inhibisyon gözlenmiştir (Şekil 4.14). Ancak, parokson pestisiti için maksimum inhibisyon derecesi %100 olmadığı gözlenmiştir. Bu gözlemin, pestisitlerin enzimin bağlanma bölgeleriyle olan bağlanma dengesine bağlı olduğu bildirilmektedir. Dolayısıyla; pestisitlerin tespiti için optimum kuluçka süresi olarak 10 dakika seçilmiştir.



**Şekil 4.14** Poli(BT)/AChE biyosensöründe inhibisyon inkübasyon süresi optimizasyonu

Biyosensörün tespit limiti ve lineer çalışma aralığı parokson pestisiti için incelenmiştir. Bu amaçla, sensör farklı konsantrasyonlarda 10 dk. süreyle pestisit çözeltisine daldırıldıktan sonra yüzde inhibisyon hesaplanmıştır ve pestisit için kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 4.15). Enzim aktivitesi inhibitörler tarafından azaltıldığından, pestisit çözeltilerinin konsantrasyonunun artması algılanan biyosensör sinyallerinde azalmaya yol açmıştır. Optimum deneysel koşullar altında, parokson pestisiti için farklı duyarlılıklara sahip iki doğrusal aralık gözlenmiştir. Paraokson

inhibisyonu, 0.99 lineerizasyon katsayısı ile 0.5-1 µg/L ve 1-14 µg/L aralığındaki konsantrasyonuyla orantılı olduğu bulunmuştur. Pestisit ve enzimin aktif bölgeleri arasında kurulan denge nedeniyle maksimum inhibisyon %100 değildir. Ayrıca mevcut biyosensörün tespit limitleri, paraokson için 0.033 µg/L olarak bulunmuştur ve bu değer literatür özetinde verilen çalışmalarla kıyaslanabilir düzeyde olduğu görülmüştür. Örneğin, sistemin modifiyeli altın baskı elektrot üzerine immobilize edilen AChE biyosensörü'nün LOD değeri paraokson için 2 µg/L (Arduini ve ark., 2013); polipirol polimeri içerisine hapsedilen AChE elektrodu için LOD değeri 1.1 µg/L (Dutta ve Puzari, 2014) ve karbon pasta elektrot üzerine jelatin membran içinde yakalanan AChE için ise LOD değeri 0.86 µg/L (Di Tuoro ve ark., 2011) olarak rapor edilmiştir. İlâveten, literatürde paraokson tayinine yönelik mevcut AChE temelli biyosensör çalışmaları detaylı bir şekilde Çizelge 4.2' de özetlenmiştir.



**Şekil 4.15** Parokson için kalibrasyon eğrisi (50 mM, pH 7 fosfat tamponu içerisinde; +0.6 V çalışma potansiyeli, 10 dk. inkübasyon süresi)

**Çizelge 4.2** Literatürde parokson analizine yönelik AChE biyosensörleri

Elektrot modifikasyonu	Metot	Doğrusal aralık	Dedeksiyon limiti	Uygulaması	Referans
f-MWCNT/poly(SNS-NH <sub>2</sub> )/AChE	Amperometrik	0.005-0.1 g/L ve 0.1-10 g/L	2.46 ng/L	Çeşme suyu	(Kesik ve ark., 2014)
AuNPs-MoS <sub>2</sub> -reduced graphene oxide/polyimide flexible film (rGO/PI)	DPV	0.005-0.150 µg/mL	0.0014 µg/mL	Sebze suyu	(Jia ve ark., 2020)
Paste carbon electrode	Amperometrik	0.86-22.93 µg/L	0.86 µg/L	Çeşme suyu	(Tuoro ve ark., 2011)
Cellophanemembrane/AuE	Amperometrik	1.45 µM	1.45-7.26 µM	-	(Rekha ve ark., 2008)
PVA-SbQ polymer/SPE	Amperometrik	-	1.91 x 10 <sup>-2</sup> µM	-	(Andreescu ve ark., 2002)
Zinc oxide sol-gel/SPE	Amperometrik	0.127-5.010 µM	0.127 µM	-	(Sinha ve ark., 2010)
Single-walled CNTs-CoPC/SPE	Amperometrik	6.36x 10 <sup>-3</sup> -0.159 µM	0.01 µM	Musluk ve köpüklü su	(Ivanov ve ark., 2011)
Poly(allylamine hydrochloride)/CdTe QDs/glass	Optik	1.0x 10 <sup>-6</sup> -1.0 µM	1.05x 10 <sup>-5</sup> µM	Elma, Fasulye, Çeşme suyu	(Zheng ve ark., 2011)
AChE/AuNRs/GCE	Amperometrik	1 nM-5 µM	0.7 nM	Çeşme, nehir ve deniz suları	(Lang ve ark., 2016)
PPy-AChE-Geltn-Glut/Pt	Amperometrik	0.1-12.5 µg/L ve 12.5-150 µg/L	1.1 µg/L	-	(Dutta ve Puzari, 2014)
poly(FBThF)/f-MNPs/AChE	Amperometrik	0.05-5 µg/L ve 5-9.28 µg/L	0.022 µg/L	Çeşme suyu	(Cancar ve ark., 2016)
Poly(BT)/AChE	Amperometrik	0.5-1 µg/L ve 1-14 µg/L	0.033 µg/L	Çeşme suyu ve süt	Bu çalışma

#### 4.5.2 Örnek Uygulama

Çeşme suyu ve süt örneklerinde standart ekleme yöntemi ile parokson içeren numuneler hazırlanmış ve parokson tespiti için biyosensörlerin uygulanabilirliği araştırılmıştır. Paraokson tayini için çeşme suyu örneklerine ön işlem yapılmamıştır. Süt numunelerinde basit bir seyreltme yöntemi kullanılmıştır; 2.5 mL süt ve 2.5 mL pH 7 fosfat tamponu karıştırılmıştır ve ardından karışıma paraokson eklenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.3’de ayrıntılı olarak verilmiştir. Elde edilen yüksek geri kazanım değerleri hazırlanan Poli(BT)/AChE temelli amperometrik biyosensörünün belirtilen örneklerde pestisit tayininde uygulanabilirliğinin oldukça iyi olduğunu göstermektedir. Buna göre, diğer girişim etkisi gösterebilecek kimyasal türler ortamda bulunurken herhangi bir girişim olmaksızın gerçek örneklerde pestisit tayini yapılabilabileceği sonucuna varılmıştır.

**Çizelge 4.3** Musluk suyu ve süt örneklerinde parokson tayini geri kazanım çalışmalarının sonuçları.

Örnek matriksi	Eklenen parokson ( $\mu\text{g/L}$ )	Bulunan parokson ( $\mu\text{g/L}$ )	Geri kazanım (%)
Çeşme suyu	0.8	0.76	95.0
Süt	0.8	0.79	98.75

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tarımsal uygulamalarda etkin olarak kullanılan pestisitlerin besin zinciri üzerindeki yan etkilerinin zararları açıkça bilinmektedir. Bu pestisitler kolinesteraz enzimlerinin aktivitesini inhibe ederek, merkezi sinir sisteminde çeşitli hasarlara yol açmakta ve sergilemiş oldukları nörotoksik etki ile sinirsel iletileri engellemektedirler. Sonuç olarak da sinir iletişimi daha az verimli olmakta ve bu da beyin ve vücut fonksiyonlarında gerilemeye neden olmaktadır. Dolayısıyla, bu grup pestisitlerin analizleri oldukça önemlidir. Bu nedenle, gaz ve likit kromatografisi ile ayırmadan sonra kütle spektrometrisi gibi geleneksel, pahalı ve zahmetli yöntemler yerine çabuk sonuç veren, yeni, ucuz ve pratik yöntemlerin geliştirilmesi bir ihtiyaç haline gelmiştir. Son yıllarda, kolinesteraz inhibitörlerinin elektrokimyasal olarak tayinlerinde enzime dayalı biyosensörler oldukça ilgi çekici bir araştırma sahası haline gelmiştir. Ancak, enzime dayalı biyosensörlerle tayinlerinde karşılaşılan ilk zorluk enzimin elektrot yüzeyine konumlandırılmasıdır. Bunun için çeşitli yollar bulunmaktadır. Biyosensör hazırlanmasında iletken polimerlerin kullanımı, biyosensörleri çok daha kullanışlı, hassas ve pratik hale getirmektedir. İletken polimerlerin biyosensör teknolojisiyle kombinasyonları, enzimin elektrot yüzeyine pratik bir şekilde ve çoğu zaman tek adımda immobilizasyonunu sağlarken, hızlı elektron iletimiyle elektrokimyasal cevap süresini kısaltmakta ve biyosensörün kararlılığını artırmaktadır. İletken polimer temelli matrislere fiziksel ya da kimyasal yollarla immobilize edilen enzimler, katalitik aktivitelerini koruyarak birden fazla kullanıma olanak sağlamaktadır. İletken polimerlerin kullanımıyla elektron transferinin en hızlı şekilde sağlanarak sensör cevabına en hızlı şekilde ulaşılması ve geleneksel yöntemlere alternatif hızlı, ucuz ve pratik bir dedektörünün tasarlanması hedeflenmiştir.

Tez kapsamında floren grubu içeren poli-2,2'-(9,9-dioktil-9h-floren-2,7-diyl)bistiyofen Poli(BT) olarak adlandırılan polimerin sentezi elektrokimyasal yöntemle gerçekleştirilmiştir. Daha sonrasında, Poli(BT) kaplı grafit elektrot yüzeye asetilkolinesteraz enzim immobilizasyonu yapılmıştır ve elde edilen biyosensörün elektrokimyasal ölçüm sistemlerine entegrasyonu sağlanmıştır. Literatürde farklı türde birimler; benzimidazol, benzotriazol, karbazol, bitiyofen, floren ve 3,4 etilen dioksitiyofen (EDOT), elektrokimyasal polimerizasyon, elektrokromik ve biyosensör uygulamalar için yaygın olarak kullanılmıştır. Çok sayıda elektroaktif polimerler

arasında poliflorenler, göstermiş oldukları üstün özellikler sayesinde elektrokimyasal uygulamalarda sıklıkla tercih edilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre, Poli(BT) polimerinin elektrot yüzeylere başarılı bir şekilde modifiye edildiği ve AChE enzimi için iyi bir immobilizasyon platformu oluşturduğu söylenebilmektedir.

AChE enzimi, model enzim olarak seçilerek çapraz bağlayıcı ajan aracılığıyla grafit çubuk elektrot yüzeyinde Poli(BT) polimeri üzerine immobilize edilmiştir. Hazırlanan Poli(BT)/AChE biyosensörünün yüzey karakterizasyonu CV ve SEM teknikleriyle aydınlatılmıştır. Ayrıca, yapıdaki elemental dağılım EDX analizleri ile gösterilmiştir. Poli(BT)/AChE biyosensörünün analitik karakterizasyonu için ATChCl varlığında amperometrik ölçümler alınmıştır. Tüm bu ölçümler, 10 mL fosfat tamponu (50 mM, pH 7) ölçüm hücresinde gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümlerde, reaksiyon hücresinde elektroaktif tiyokolinin takibine yönelik +0.6 V da izlenmesi temel alınmıştır. İlgili potansiyel değerine gerekli optimizasyon çalışması neticesinde karar verilmiştir. Ölçümü etkileyecek tüm parametreler optimize edilmiştir. Polimer film kalınlığının biyosensör cevabı üzerine etkisini incelemek amacıyla farklı döngü sayısına sahip polimerler elektrot yüzeylere kaplanmıştır. Poli(BT)/AChE için optimum döngü sayısı 10 olarak bulunmuştur. AChE miktarının optimizasyonu için farklı AChE miktarları Poli(BT) içeren elektrot yüzeylere immobilize edilerek, biyosensör cevapları kaydedilmiştir. Buna göre, en uygun AChE miktarı 7 µL seçilerek, diğer çalışmalar için aynı miktarda AChE kullanılarak biyosensörler elde edilmiştir. Enzim immobilizasyonunda kullanılan GA konsantrasyonu da optimize edilerek % 0.5 olarak bulunmuştur. Geliştirilen biyosensör için optimum pH denemeleri de gerçekleştirilmiş ve Poli(BT)/AChE biyosensörü için optimum pH 7 olarak bulunmuştur. Optimizasyon çalışmalarının tamamlanmasından sonra optimum şartlarda hazırlanan biyosensörün analitik karakterizasyonunun yapılması amacıyla amperometrik ölçümler Poli(BT)/AChE modifiye edilen grafit elektrot ile gerçekleştirilmiştir. Poli(BT)/AChE biyosensörünün 0.025-4.0 mM doğrusal ATChCl konsantrasyonu aralığındaki kalibrasyon denklemi  $y=1.1779x+0.4742$  ( $R^2=0.99$ ) olarak bulunmuştur. Aynı zamanda  $K_M$  (gözlenen) ve  $I_{max}$  değerleri hesaplanarak sırasıyla 0.21 mM ve 2.77 µA olarak belirlenmiştir. Poli(BT)/AChE biyosensörünün LOD ve hassasiyet değerleri ise sırasıyla 0.015 mM ve  $19.12 \mu A mM^{-1} cm^{-2}$  olarak hesaplanmıştır. İlâveten, poli(BT)/AChE biyosensörünün tekrarlanabilirliği, belirli

konsantrasyona sahip AThCl ile alınan sonuçlara göre, S.S:  $\pm 0.16$  ve %V.K: % 3.6 olarak hesaplanmıştır. Poli(BT)/AChE biyosensörünün operasyonel kararlılık analizi için 4 mM AThCl konsantrasyonu ile ölçümler alınmıştır. Buna göre, biyosensör kararlılığında 24 saat boyunca herhangi bir düşüş gözlenmezken; 96 saat sonra % 10 aktivite kaybı gözlenmiştir. 18 günün sonunda ise geliştirilen Poli(BT)/AChE biyosensörün cevabının yaklaşık % 82'sini koruduğu görülmüştür. Poli(BT)/AChE biyosensöründe girişim etkisinin analizi için ölçüm hücresinde son konsantrasyon 0.25 mM olacak şekilde parasetamol, askorbik asit, sitrik asit, glikoz, üre, KCl ve NaCl ayrı ayrı substrat olarak eklendiğinde, kimyasal bileşiklerin AThCl ile karşılaştırıldığında herhangi bir sinyal değişikliği meydana getirmediği gözlenmiştir. Buna göre, ilgili kimyasal bileşiklerin Poli(BT)/AChE biyosensörü üzerinde herhangi bir girişim etkisi göstermediği söylenebilmektedir.

İnhibisyon çalışmaları için biyosensörün musluk suyu ve süt örneklerinde pestisiti analiz etme kabiliyeti gösterilmiştir. Bu amaçla, öncelikle enzim inhibisyonu için inkübasyon süresi tespit edilmiş ve 10 dakika olarak bulunmuştur. Sonrasında, parokson için kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve biyosensörün iki lineer çalışma aralığı parokson pestisiti için 0.99 lineerizasyon katsayısı ile 0.5  $\mu\text{g/L}$ - 1  $\mu\text{g/L}$  ve 1  $\mu\text{g/L}$  - 14  $\mu\text{g/L}$  olarak bulunmuştur. Biyosensörün tespit limiti ise 0.033  $\mu\text{g/L}$  olarak belirlenmiştir. Poli(BT)/AChE biyosensörünün gerçek örneklerle uygulanabilirliği amacıyla musluk suyu ve süt örneklerinde amperometrik pestisit tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre herhangi bir girişim olmaksızın gerçek örneklerde pestisit tayini yapılabilabileceği sonucuna varılmıştır.

Literatüre bakıldığında iletken polimer temelli AChE modifiye ile oluşturulan organofosforlu pestisitlere yönelik az sayıda çalışma olduğu görülmektedir. Ayrıca, tez kapsamında kullanılan Poli(BT) polimerinin kullanıldığı pestisit biyosensörüne ilişkin çalışma da bulunmamaktadır. Tez kapsamında elde edilen tüm sonuçlara göre, Poli(BT) ile modifiye edilen elektrot yüzeylerinin biyomoleküllerin immobilizasyonunda başarılı bir model olduğu söylenebilmektedir. Elde ettiğimiz iyi bir biyosensör özelliğine sahip olan ve uygulanması kolay bu biyosensörün geliştirilmesinde kullanılan Poli(BT) iletken polimere ilaveten farklı materyallerin sisteme ilavesi ile biyosensör özelliklerinin daha da iyileştirilebileceğinin mümkün olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, tez kapsamında elde edilen bulgular kullanılan



iletken polimerin düşük maliyetli, kararlı ve iyi biyosensör performansı sergilemesi gibi önemli etkileri göz önünde bulundurulduğunda farklı biyosensör uygulamaları için de yeni stratejilere olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Adeloju, SB. & Wallaceb, GG. (1996). Conducting polymers and the bioanalytical sciences: New tools for biomolecular communications. *A Review, Analyst, 121*, 1147-1147.
- Ahuja, T., Mir, IA. & Kumar, D. (2007). Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. *Biomaterials, 28*(5), 791-805.
- Akgül, B. (2021). Asetilkolinesterazin iletken tiyolen'e kürlenebilen filmler üzerine immobilizasyonu ve AChE biyosensörünün geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, İstanbul.
- Albery, WJ., Bartlett, PN. & Cass, AE. (1987). Amperometric enzyme electrodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 316*(1176), 107–119.
- Aldridge, WN. (1950). Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E 605) and analogues. *Biochemical Journal, 46*(4), 451.
- Alexander, SP., Fabbro, D., Kelly, E., Marrion, NV., Peters, JA., Faccenda, E.& Davies, JA. (2017). The concise guide to Pharmacology 2017/2018: Enzymes. *British journal of pharmacology, 174*, S272–S359.
- Andreescu, S., Noguer, T., Magearu, V.& Marty, J.-L. (2002). Screen-printed electrode based on AChE for the detection of pesticides in presence of organic solvents, *Talanta 57*(1), 169–176.
- Arduini, F., Guidone, S., Amine, A., Palleschi, G.& Moscone, D. (2013). Acetylcholinesterase biosensor based on self-assembled monolayer-modified gold-screen printed electrodes for organophosphorus insecticide detection. *Sensor Actuat. B: Chemical, 179*, 201-208.
- Astolti, P., Brandi, P., Galli, C., Gentili, P., Gerini, MF., Greci, L. & Lanzalunga, O. (2005). New mediators for the enzyme laccase: Mechanistic features and selectivity in the oxidation of non-phenolic substrates. *New Journal of Chemistry, 29*(10), 1308–1317.
- Baklaya, N. (2000). Pestisitlerin canlılar üzerindeki toksik etkileri. GAP Çevre Kongresi, 16-18 Ekim 2000, Şanlıurfa.
- Bard, AJ. & Faulkner, LR. (2000). *Electrochemical Methods: Fundamentals and applications*. John Wiley and Sons.
- Bernardes M F F., Pazin M., Pereira LC. & Dorta D J. (2015). Impact of pesticides on environmental and human health. *Toxicology Studies-Cells, Drugs and Environment, 195-233*.
- Bhagavan, NV. & Ha, CE. (2011). Enzymes and enzyme Regulation. *Essentials of Medical Biochemistry, 47–58*.
- Bright, F. (1987). Optical and piezoelectric biosensors. *Analytical Chemistry, 59* (19), 1161A–1164A.

- Can, F. (2010). Glikoz oksidaz enziminin iletken polimerlere immobilizasyonu ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hatay.
- Cancar, HD., Soylemez, S., Akpınar, Y., Kesik, M., Göker, S., Gunbas, G., Volkan, M. & Toppare, L. (2016). A Novel acetylcholinesterase biosensor: core-shell magnetic nanoparticles incorporating a conjugated polymer for the detection of organophosphorus pesticides. *ACS Applied Materials & interfaces*, 8(12), 8058–8067.
- Chandrasekhar, P. (1999). *Conducting polymers, fundamentals, and applications: a practical approach*. Kluwer academic publishers. pp. 9-15, 26-36, 86,102, Boston.
- Chapalamadugu, S. & Chaudhry, GR. (1992). Microbiological and biotechnological aspects of metabolism of carbamates and organophosphates. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12(5-6), 357–389.
- Chaubey, A. & Malhotra, BD. (2002). Mediated biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 17(6-7), 441–456.
- Chauhan, N. & Pundir, CS. (2012). An Amperometric acetylcholinesterase sensor based on fe<sub>3</sub>o<sub>4</sub> nanoparticle/multi-walled carbon nanotube-modified ito-coated glass plate for the detection of pesticides. *Electrochimica Acta*, 67, 79–86.
- Chauhan, N., Narang, J. & Jain, U. (2016). Amperometric acetylcholinesterase biosensor for pesticides monitoring utilising iron oxide nanoparticles and poly(indole-5-carboxylic acid), *Journal of Experimental Nanoscience*, 11(2), 111-122.
- Clark Jr, L. (1956). Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. *Transactions – Asaio Journal*, 2(1), 41-48.
- Clark, L.& Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102(1), 29-45.
- Clifford, E. (1984). “Enzyme nomenclature: Recommendations of the nomenclature committee of the international union of biochemistry on the nomenclature and classification of enzyme-catalysed reactions”.
- Colak, Ö. (2014). Sakkaroz tayini için biyosensör hazırlanması. Doktora tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Compos, TLA., Kersting, DF. & Ferreira, CA. (1999). Chemical synthesis of polyaniline using sulphanilic acid as dopant agent into the reactional medium. *Surface and Coatings Technology*, 122(1), 3-5.
- Costa LG. (2017). Organophosphorus compounds at 80: some old and new issues. *Toxicological. Sciences*, 162(1), 24-35.
- Di Tuoro, DD., Portaccio, M., Lepore, M., Arduini, F., Moscone, D., Bencivenga, U. & Mita, DG. (2011). An acetylcholinesterase biosensor for determination of low concentrations of paraoxon and dichlorvos. *New Biotechnology*, 29(1), 132–138.

- Dikshith, TSS. (1991). Pesticides, in: T.S.S. Dikshith (Ed.), Toxicology of pesticides in animals, CRC Press, Boston, pp. 1–39.
- Du, D., Ding, J., Cai, J. & Zhang, A. (2007). One-step electrochemically deposited inter-face of chitosan–gold nanoparticles for acetylcholinesterase biosensor design, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 605(1), 53–60.
- Du, D., Huang, X., Cai, J. & Zhang, A. (2007). Comparison of pesticide sensitivity by electrochemical test based on acetylcholinesterase biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(2), 285–289.
- Du, D., Chen, S., Cai, J. & Zhang, A. (2007). Immobilization of acetylcholinesterase on gold nanoparticles embedded in sol–gel film for amperometric detection of organophosphorous insecticide. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(1), 130–134.
- Dutta, RR. & Puzari, P. (2014). Amperometric Biosensing of organophosphate and organocarbamate pesticides utilizing polypyrrole entrapped acetylcholinesterase electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 52, 166–172.
- Fukuta, R. (1990). Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives*, 87, 245–254.
- Garcia-Galan, Berenguer-Murcia, Fernandez-Lafuente ve Rodrigues, 2011; Mateo, Palomo, Fernandez-Lorente, Guisan ve Fernandez).-Lafuente, 2007; Messing, 1975.
- Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, Á., Fernandez-Lafuente, R. & Rodrigues, RC. (2011). Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 353(16), 2885–2904
- Gerard, M., Chaubey, A. & Malhotra, BD. (2002). Application of conducting polymers to Biosensors. *Biosensors and bioelectronics*, 17(5), 345–359.
- Güven, A. (2000). Asetilkolinesterazın önemi ve inhibitörleri. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1-2), 145-151.
- Ivanov, Y., Marinov, I., Portaccio, M., Lepore, M., Mita, DG. & Godjevargova, T. (2012). Flow-injection system with site-specific immobilization of acetylcholinesterase biosensor for amperometric detection of organophosphate pesticides. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 26(3), 3044-3053.
- Ju, H. & Kandimalla, VB. (2008). *Biosensors for pesticides in electrochemical sensors. biosensors and their biomedical applications*, Academic Press. Inc., Oxford, pp. 31–56.
- Jia, L., Zhou, Y., Wu, K., Feng, Q., Wang, C. & He, P. (2020). Acetylcholinesterase modified AuNPs-MoS<sub>2</sub>-rGO/PI flexible film biosensor: Towards efficient fabrication and application in paraoxon detection. *Bioelectrochemistry*, 131, 107392.
- Kaplay SS. (1976). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase of developing human brain. *Neonatology*, 28(1-2), 65-73.

- Karyakin, AA., Gitelmacher, OV. & Karyakina, EE. (1995). Prussian blue-based first-generation biosensor. a sensitive amperometric electrode for glucose. *Analytical chemistry*, 67(14), 2419-2423.
- Keha, E. & Küfrevioğlu, G. (2009). *Biyokimya*. Aktif Yayınevi, 6. Baskı, İstanbul, 93-95s, 116-123s.
- Kesik, M., Ekiz Kanik, FE., Turan, J., Kolb, M., Timur, S., Bahadır, M. & Toppare, L. (2014). An acetylcholinesterase biosensor based on a conducting polymer using multiwalled carbon nanotubes for amperometric detection of organophosphorous pesticides. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 205, 39-49.
- Koçancı, FG. & Aslım, B. (2016). Structure and functions of acetylcholinesterase and acetylcholinesterase inhibitory activity of plants. *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences*, 6(1), 19-35.
- Kumar, D. & Sharma, RC. (1998). Advances in conductive polymers. *European polymer journal*, 34(8), 1053-1060.
- Kumar, SV., Fareedullah, MD., Sudhakar, Y., Venkateswarlu, B. & Ashok Kumar, E. (2010). Current review on organophosphorus poisoning. *Arch ApplSci Res*, 2, 199-215.
- Lang, Q., Han, L., Hou, C., Wang, F. & Liu, A. (2016). A sensitive acetylcholinesterase biosensor based on gold nanorods modified electrode for detection of organophosphate pesticide. *Talanta*, 156–157, 34-41.
- Li K., Zhu X., Wang, Y., Zheng S. & Dong G. (2017). Effect of aerobic exercise intervention on DDT degradation and oxidative stress in rats. *Saudi journal of biological sciences*, 24(3), 664-671.
- Li, Y., Zhao, R., Shi, L., Han, G. & Xiao, Y. (2017). Acetylcholinesterase biosensor based on electrochemically inducing 3D graphene oxide network/multi-walled carbon nanotube composites for detection of pesticides. *RSC advances*, 7(84), 53570-53577.
- Lineweaver, L. & Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American chemical society*, 56(3), 658-666.
- Liu, G. & Lin, Y. (2006). Biosensor based on self-assembling acetylcholinesterase on carbon nanotubes for flow injection/amperometric detection of organophosphate pesticides and nerve agents. *Analytical Chemistry*, 78(3), 835-843.
- Liu, Q., Fe, A., Huan, J., Mao, H. & Wang, K. (2015). Effective amperometric biosensor for carbaryl detection based on covalent immobilization acetylcholinesterase on multiwall carbon nanotubes/graphene oxide nanoribbons nanostructure. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 740, 8-13.
- Liu, T., Su, H., Qu, X., Ju, P., Cui, L. & Ai, S. (2011). Acetylcholinesterase biosensor based on 3-carboxyphenylboronic acid/reduced graphene oxide–gold nanocomposites modified electrode for amperometric detection of organophosphorus and carbamate pesticides. *Sensors and actuators B: Chemical*, 160(1), 1255-1261.

- Malinauskas, A. (2001). Chemical deposition of conducting polymers. *Polymer*, 42(9), 3957-3972.
- Mcafee, A. (2017). A Brief History of Pesticide. *American Bee Journal.*, 157(7):781-783.
- Meister, RT. (1999). Farm chemicals handbook 99. Meister Publishing Company, Willoughby, ABD, 1-990.
- Mohanty, SP. & Kougiianos, E. (2006). Biosensors: A tutorial review. *Lee Potentials*, 25(2), 35-40.
- Nelson, DL. & Cox, MM. (2005). *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri* (Üçüncü Baskıdan çeviri, Çeviri Editörü: Kılıç, N.), Türkiye: Palme Yayıncılık, 444.
- Otero, TF., Martinez, JG. & Arias-Pardilla, J. (2012). Biomimetic electrochemistry from conducting polymers. A review: Artificial muscles, smart membranes, smart drug delivery and computer/neuron interfaces. *Electrochimica Acta*, 84, 112-128.
- Paddle, BM. (1996). Biosensors for chemical and biological agents of defence interest. *Biosensors and Bioelectronics*, 11(11), 1079-1113.
- Periasamy, AP., Umasankar, Y. & Chen, SM. (2009). Nanomaterials-acetylcholinesterase enzyme matrices for organophosphorus pesticides electrochemical sensors: A Review. *Sensors*, 9(6), 4034-4055.
- Pohanka, M. (2011). Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*, 155(3).
- Pohanka, M. (2012). "Acetylcholinesterase inhibitors; A patent review", Expert Opinion on Therapeutic Patents, ss: 871–886.
- Pohanka, M., Jun, D. & Kuca, K. (2008). Amperometric biosensors for real time assays of organophosphates. *Sensors*, 8(9), 5303-5312.
- Pundir, CS. & Chauhan, N. (2012). Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. *Analytical Biochemistry*, 429(1), 19-31.
- Račáková, V., Jun, D., Opletalová, V. & Kuča, K. (2006). Reactivation of acetylcholinesterase inhibited by the pesticide chlorpyrifos. *Journal of Applied Biomedicine*, 4(3), 147-151.
- Rao, AA., Sridhar, GR. & Das, UN. (2007). Elevated butyrylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Medical Hypotheses*, 69(6), 1272-1276.
- Rekha, K. & Murthy, BN. (2008). Studies on the immobilisation of acetylcholinesterase enzyme for biosensor applications. *Food and agricultural immunology*, 19(4), 273-281.
- Reynoso EC., Torres E., Bettazzi F. & Palchetti, I. (2019). Trends and perspectives in immunosensors for determination of currently used pesticides: the case of glyphosate, organophosphates, and neonicotinoids. *Biosensors*, 9(1), 20.
- Saçak, M. (2010). *Polimer Kimyası*. Gazi Kitabevi, Ankara, 423-433s.

- Schuhmann, W. (1995). Conducting polymer based amperometric enzyme electrodes. *Microchimica Acta*, 121(1), 1-29.
- Shirakawa, H., Louis, E.J., Macdiarmid, A.G., Chiang, C.K. & Heeger, A.J. (1977). Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH)<sub>x</sub>. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (16), 578-580.
- Singh, M., Kaur, M. & Kukreja, H. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors as alzheimer therapy: from nerve toxins to neuroprotection. *European journal of medicinal chemistry*, 70, 165-188.
- Singh, T. & Singh, A.K. (2019). Enzymes as diagnostic tools. *In Advances in Enzyme Technology* (pp. 225–271). Elsevier.
- Sinha, R., Ganesana, M., Andreescu, S. & Stanciu, L. (2010). AChE biosensor based on zinc oxide sol–gel for the detection of pesticides. *Analytica chimica acta*, 661(2), 195-199.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. & Nieman, T.A. 1998. *Elektroanalitik kimyaya giriş: Enstrümantal analiz*. Editörler: Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., Bilim Kitap Kırtasiye, Ankara, s: 639-673.
- Song, Y., Luo, Y., Zhu, C., Li, H., Du, D. & Lin, Y. (2016). Recent advances in electrochemical biosensors based on graphene two-dimensional nanomaterials. *Biosensors and Bioelectronics*, 76, 195-212.
- Soylemez, S. & Kurbanoglu, S. (2021). Enzyme-based electrochemical nanobiosensors using quantum dots: *In Electroanalytical Applications of Quantum Dot-Based Biosensors*, Ed: Uslu B., Elsevier 307-339
- Soylemez, S., Yılmaz, T., Buber, E., Udum, Y. A., Özçubukçu, S. & Toppare, L. (2017). Polymerization and biosensor application of water-soluble peptide-SNS type monomer conjugates. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(35), 7384-7392.
- Sun, X. & Wang, X. (2010). Acetylcholinesterase biosensor based on Prussian blue-modified electrode for detecting organophosphorous pesticides. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(12), 2611-2614.
- Sunding, D. & Zivin, J. (2000). Insect population dynamics, pesticide use and farmworker health. *American Journal of Agricultural Economics*, 82(3), 527-540.
- Scheller, F. & Schubert, F. (1992). *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry: Biosensors*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Pub. Co.
- Tang M., Zhao M., Shanshan Z., Chen K., Zhang C. & Liu W. (2014). Assessing the underlying breast cancer risk of Chinese females contributed by dietary intake of residual DDT from agricultural soils. *Environment international*, 73, 208-215.
- Thevenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S. (2001). Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Biosensors and bioelectronics*, 16(1-2), 121-131.

- Tuoro, DD., Portaccio, M., Lepore, M., Arduini, F., Moscone, D., Becivenga, U. & Mita, DG. (2011). An Acetylcholinesterase biosensor for determination of low concentrations of paraoxon and dichlorvos. *New Biotechnology*, 29(1), 132-138.
- Turan, J., Kesik, M., Soylemez, S., Goker, S., Coskun, S., Unalan, HE. & Toppare, L. (2016). An effective surface design based on a conjugated polymer and silvernanowires for the detection of paraoxon in tap water and milk. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 228, 278-286.
- Uçan, D. (2015). Poli(metoksietoksi)etoksi-ko-3-formilfenoksi)fosfazen'in sentezi ve biyosensör uygulamalarında kullanımı. Yüksek Lisans Tezi, Ahi Evran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırşehir.
- Vakurov, A., Simpson, CE., Daly, CL., Gibson, TD. & Millner, PA. (2004). Acetylcholinesterase-based biosensor electrodes for organophosphate pesticide detection: I. Modification of carbon surface for immobilization of acetylcholinesterase. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(6), 1118-1125.
- Vidal, JC., Ruiz, EG. & Castillo, JR. (2003). Recent advances in electropolymerized conducting polymers in amperometric biosensors. *Microchimica Acta*, 143(2), 93-111.
- Waksmundzka, M. & Sherma Joseph. (2010). *High performance liquid chromatography in phytochemical analysis*. CRC Press.
- Wang, J. (2000). Flux-averaging analysis of type Ia supernova Data. *The Astrophysical Journal*, 536(2), 531.
- Wang, J. (2005). Nanomaterials-based electrochemical biosensors. *Analyst*, 130(4), 421-426.
- Wei, Y., Li, Y., Qu, Y., Xiao, F., Shi, G. & Jin, L. (2009). A novel biosensor based on photoelectro- synergistic catalysis for flow-injection analysis system/amperometric detection of organophosphorous pesticides. *Analytica Chimica Acta*, 643(1-2), 13-18.
- Yang, Y., Asiri, AM., Du, D. & Lin, Y. (2014). Acetylcholinesterase biosensor based on a gold nanoparticle-polypyrrole-reduced graphene oxide nanocomposite modified electrode for the amperometric detection of organophosphorus pesticides. *Analyst*, 139(12), 3055-3060.
- Yıldız, M., Gürkan, M.O., Turgut, C., Kaya, Ü. & Ünal, G. (2005). Tarımsal savaşımında kullanılan pestisitlerin yol açtığı çevre sorunları. VI. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, 3-7 Ocak 2005, Ankara.
- Yin, H., Ai, S., Xu, J., Shi, W. & Zhu, L. (2009). Amperometric biosensor based on immobilized acetylcholinesterase on gold nanoparticles and silk fibroin modified platinum electrode for detection of methyl paraoxon, carbofuran and phoxim. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 637(1-2), 21-27.
- Zhang, H., Li, Z.-F., Snyder, A., Xie, J. & Stanciu, LA. (2014). Functionalized graphene oxide for the fabrication of paraoxon biosensors. *Analytica Chimica Acta*, 827, 86-94.



- Zhang, W. & Li, G. (2004). Third-generation biosensors based on the direct electron transfer of proteins. *Analytical sciences*, 20(4), 603-609.
- Zhang, P., Sunc, T., Rong, S., Zeng, D., Yu, H., Zhang, Z., Chang, D. & Pan, H. (2019). A sensitive amperometric ache-biosensor for organophosphate pesticides detection based on conjugated polymer and Ag-RGO-NH<sub>2</sub> nanocomposite. *Bioelectrochemistry*, 127, 163-170.
- Zheng, Z., Zhou, Y., Li, X., Liu, S. & Tang, Z. (2011). Highly-sensitive organophosphorous pesticide biosensors based on nanostructured films of acetylcholinesterase and CdTe quantum dots. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(6), 3081-3085.

## ÖZGEÇMİŞ

<b>Kişisel Bilgiler</b>	
Adı Soyadı	Hüzeyfe ÇELİK
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	T.C.
Telefon	
E-Posta Adresi	
<b>Eğitim Bilgileri</b>	
<b>Lisans</b>	
Üniversite	ORDU ÜNİVERSİTESİ
Fakülte	EĞİTİM FAKÜLTESİ
Bölümü	FEN BİLİMLERİ ÖĞRETMENLİĞİ
Mezuniyet Yılı	2019
<b>Yüksek Lisans</b>	
Üniversite	Ordu Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Kimya Anabilim Dalı
Programı	Fizikokimya Programı
Mezuniyet Tarihi	2022