

## Grafen Oksit-Polianilin Nanokompozit Temelli Amperometrik Glukoz Biyosensörü Geliştirilmesi

Sadık Çoğal  

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Polimer Mühendisliği Bölümü, Burdur

Geliş Tarihi (Received): 20.02.2017, Kabul Tarihi (Accepted): 05.06.2017

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): [sadik\\_cogal@yahoo.com](mailto:sadik_cogal@yahoo.com) (S. Çoğal)

☎ 0 248 213 27 62 📠 0 248 213 27 04

### ÖZ

Bu çalışmada, Pt elektrot, grafen oksit-polianilin (GO-PANI) nanokompoziti ile modifiye edilerek amperometrik glukoz biyosensörü geliştirilmesinde kullanılmıştır. Modifiye edilmiş Pt elektroda glukoz oksidaz (GOD) enzimi çapraz bağlayıcı kullanılarak immobilize edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan Pt/GO-PANI/GOD biyosensörünün optimum çalışma koşullarında amperometrik yöntemle glukozu karşı cevabı çalışılmış ve  $36.11 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$  hassasiyet, 0.59-9.15 mM lineer çalışma aralığı ve 0.24 mM tayin limiti sergilemiştir. Geliştirilen glukoz biyosensörü üzerine askorbik asit (AA) ve ürik asidin (UA) girişim etkileri incelenmiş ve biyosensörün glukozu karşı oldukça seçici olduğu gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Glukoz, Glukoz oksidaz, Grafen oksit, Polianilin, Biyosensör

### Development of Graphene Oxide-Polyaniline Nanocomposite Based Amperometric Glucose Biosensor

#### ABSTRACT

In this study, Pt electrode was modified with graphene oxide-polyaniline (GO-PANI) nanocomposite and used in the fabrication of amperometric glucose biosensor. Glucose oxidase (GOD) was immobilized on the modified Pt electrode by using a cross-linking agent. The proposed Pt/GO-PANI/GOD biosensor exhibited a sensitivity value of  $36.11 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$  with a linear range of 0.59-9.15 mM and the detection limit of 0.24 mM under optimum conditions. The interference effects of ascorbic acid (AA) and uric acid (UA) on the developed glucose biosensor were studied, and it was observed that the biosensor was highly selective to glucose.

**Keywords:** Glucose, Glucose oxidase, Graphene oxide, Polyaniline, Biosensor

### GİRİŞ

Çoğu gıda sistemleri ve onların ham maddeleri, çeşitli kimyasal bileşikler içinde bulunduran oldukça kompleks karışımlardan oluşmaktadır. Gıda maddelerinin analizi bu nedenle zordur. Gıda ürünlerinin analizinde

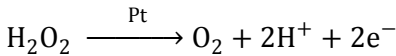
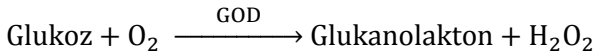
genellikle kromatografik ve spektroskopik yöntemler kullanılmaktadır. Ancak, bu yöntemler ön hazırlık gerektiren, zaman alıcı, oldukça pahalı cihazlara ve deneyimli personele ihtiyaç duyan yöntemlerdir. Bu yüzden, araştırmacılar maliyeti düşürmek ve daha hızlı analiz sonuçlarına ulaşmak için yeni yöntemlerin arayışına girmişlerdir. Bu anlamda biyosensörler, basit kullanımları,

hızlı tayin imkanı sunmaları ve pahalı cihazlara ihtiyaç duymamalarından dolayı gıda endüstrisinden çevresel izleme ve klinik analizlere kadar geniş uygulama alanlarına sahiptirler [1-2]. Gıda endüstrisinde biyosensörler, meyve suları, süt, peynir, buğday, meyve ve sebze gibi gıdalarda glukoz, fruktoz, laktöz, askorbik asit, etanol, nişasta, pestisit, antibiyotik kalıntıları, bakteri ve daha birçok bileşenin tayini amacıyla kullanılmaktadır [3-5, 26].

Gıda ürünlerinin kalitesi ve güvenliği için glukozun hızlı ve doğru bir şekilde tayin edilmesi önemlidir. Ayrıca, glukoz konsantrasyonunun önemli olduğu diyabet ve endokrin metabolik hastalıklarında doğru ve hızlı bir şekilde tayin edilmesi büyük önem arz etmektedir [6-7]. Glukoz miktarını belirlemek için birçok yöntem bulunmaktadır. Ancak bunlar içerisinde, biyosensörlerin kullanılmasının önemli bir yeri vardır.

Elektrokimyasal, kemilüminesans, vb. yöntemler kullanılarak güvenilir glukoz biyosensörleri geliştirmek amacıyla birçok uğraş verilmektedir [8-9]. Bu yöntemler içerisinde, enzim-esaslı elektrokimyasal glukoz biyosensörleri basitlik, yüksek seçicilik ve düşük maliyet gibi nedenlerden dolayı çok yoğun bir şekilde çalışılmaktadır.

Glukoz oksidaz (GOD), glukozu karşı yüksek seçiciliği ve kararlılığından dolayı glukoz biyosensörlerinde en çok kullanılan enzimdir. GOD, iki flavin adenin dinükleotit (FAD) kofaktörü içermekte ve aşağıdaki reaksiyona göre glukozun yükseltgenmesini kataliz etmektedir:



Bu enzimatik reaksiyona göre; glukoz miktarı, oluşan hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ile doğru orantılıdır. Bundan dolayı, glukoz konsantrasyonu  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin elektrokimyasal reaksiyonundan kaynaklanan akım değişiminin ölçülmesi ile kolaylıkla belirlenmektedir.

Biyosensör geliştirme sürecinde en zor ve en kritik aşamalardan biri enzim immobilizasyonudur. Uzun ömürlü ve kararlı biyosensörler hazırlamak için, enzim molekülleri immobilizasyondan sonra aktivitelerini uzun süre korumaları gerekmektedir. Bundan dolayı, enzim immobilizasyon metodunun seçimi biyosensörler için en önemli adımlardan birisidir ve immobilize edilecek biyomolekülün yapısıyla yakından ilgilidir. GOD enzimi, çapraz-bağlanma [10], fiziksel adsorpsiyon [11] ve kovalent bağlanma [12] gibi farklı tekniklerle immobilize edilebilmektedir.

Etkin enzim immobilizasyonu için öncelikle elektrotların modifiye edilmesine gereksinim duyulmaktadır. Bu

amaçla, araştırmacılar birçok malzemeyi elektrot modifikasyonunda kullanmışlardır. Bu malzemeler içerisinde, iletken polimerlerden biri olan polianilin (PANI), düşük maliyet, çevresel kararlılık, yüksek işlenebilirlik ve ilginç redoks özelliklerinden dolayı biyosensör vb. uygulamalarda yaygın bir şekilde çalışılmıştır [13]. Diğer bir taraftan, karbonun iki-boyutlu tek katmanlı formu olan grafen, mükemmel mekanik, optik, termal ve elektriksel özellikleri nedeniyle bilimsel ve teknolojik uygulamalarda oldukça fazla ilgi gören bir malzemedir [14]. Grafen oksit (GO) ise, yüzeyinde birçok fonksiyonel grubu (karboksil, hidroksil, epoksi, vb.) içeren bir grafen türevidir. Aynı zamanda yüzeyindeki bu fonksiyonel gruplar sayesinde su vb. farklı çözgenlerde dispersiyonu artmakta ve başka moleküllerle etkileşerek kompozit yapısında yeni özelliklere sahip malzemelerin elde edilmesine olanak vermektedir [15]. GO ve PANI içeren kompozit malzemeler araştırmacılar tarafından yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Bunun nedeni, bu kompozitlerin sinerjik etkiden dolayı her bir bileşenin iyi özelliklerini sergilemesidir. Bu şekilde hazırlanan kompozitler farklı uygulamalar da kullanılmış ve iyi performans sergilediği gözlemlenmiştir [16-17].

Bu çalışmada, kimyasal yöntem ile hazırlanmış GO-PANI nanokompoziti kullanılarak biyosensör geliştirilmiş ve glukoz tayini için kullanılmıştır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Kullanılan Malzemeler

Bu çalışmada kullanılan grafen oksit Hummers metodu ile [18] ve GO-PANI nanokompoziti kimyasal yöntemle Gui ve ark. [19] tarafından önerilen yöntemle göre hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar; glukoz oksidaz (Tip VII, Aspergillus niger), glutraldehit (GA) (suda %25'lik), glukoz, sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ve di-sodyum hidrojen fosfat dihidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir.

### Biyosensörün Hazırlanması

GO-PANI nanokompoziti 5 mg/mL olacak şekilde etanol içerisinde ultrasonik banyoda dispers edilmiştir. Bu karışımdan 10  $\mu\text{L}$  alınarak Pt elektrodu üzerine damlatılmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. GO-PANI kaplı elektrot tampon çözelti ile yıkanmış ve üzerine 10  $\mu\text{L}$  %2.5'lik GA çözeltisi damlatılarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Bu şekilde hazırlanan elektrot tampon çözelti ile üç kez yıkanmış ve 5 mg/mL GOD enzim çözeltisinde 3 saat bekletilmiştir. Tutuklanmayan enzim moleküllerini uzaklaştırmak için elektrot tampon çözeltisi ile üç kez yıkanmış ve tampon çözeltisine daldırılarak  $+4^\circ\text{C}$ 'de buzdolabında 30 dakika bekletilmiştir. Bu şekilde Pt/GO-PANI/GOD biyosensör elektrodu hazırlanması tamamlanmıştır. Biyosensör elektrodu kullanılmadığı durumlarda  $+4^\circ\text{C}$ 'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

## Elektrokimyasal Ölçümler

Elektrokimyasal ölçümler için potansiyostat/galvanostat cihazı (Ivium CompactStat, Ivium Technologies, Hollanda) kullanılmıştır. Biyosensörün elektrokimyasal davranışlarını ve glukozu karşı tepkisi üç elektrotlu elektrokimyasal sistem kullanılarak incelenmiştir. Bu sistemde, karşı elektrot olarak Pt tel, referans elektrot olarak Ag/AgCl ve çalışma elektrodu olarak platin elektrot kullanılmıştır. Ölçümlerde pH'sı 6.7 olan 0.1 M fosfat tampon çözeltisi kullanılmıştır.

## ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

### Potansiyelin Akım Cevabı Üzerindeki Etkisi

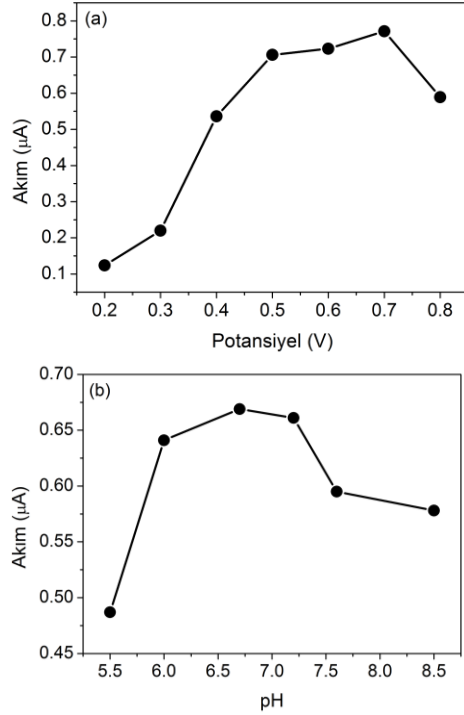
Uygulanan potansiyelin biyosensörün performansı üzerindeki etkisini incelemek için farklı potansiyellerde ölçümler gerçekleştirilmiş ve uygulanacak potansiyel optimize edilmiştir. Şekil 1a, 0.6 mM glukoz için 0.2'den 0.7 V'a kadar uygulanan potansiyele karşılık biyosensörden elde edilen akım değişimlerini göstermektedir. Akım değişimlerinden de görüldüğü gibi uygulanan potansiyel arttıkça akım artmakta ve 0.8 V'dan itibaren düşmektedir. Potansiyel yüksek olduğunda gerçek örneklerde glukozun yanında bulunabilen askorbik asit (AA) ve ürik asit (UA) gibi elektroaktif türler girişim yapabilmektedir. Bundan dolayı, çalışmalarda 0.5 V gibi düşük bir uygulama potansiyeli kullanılmıştır.

### pH Değerinin Akım Cevabı Üzerindeki Etkisi

Pt/GO-PANI elektroduna immobilize edilmiş GOD enziminin aktivitesi ayrıca tampon çözeltinin pH'sına da bağlıdır. Şekil 1b, farklı pH'larda 0.6 mM glukoz için elde edilen akım değişimlerini göstermektedir. Aynı glukoz konsantrasyonuna karşı biyosensörden elde edilen en yüksek akım değişimi pH 6.7'de elde edilmiştir. Bundan dolayı, çalışmalarda pH'sı 6.7 olan fosfat tampon çözeltisi kullanılmıştır.

### Glukozun Amperometrik Tayini

Şekil 2a, optimize edilen koşullar altında standart glukoz eklemeye karşılık geliştirilen biyosensörün tipik akım-zaman grafiğini göstermektedir. Sabit karıştırma altında bulunan tampon çözeltiliye 100 µL 60 mM glukoz çözeltisi eklendiğinde akım hızlı bir şekilde belli bir değere çıkmakta ve belli bir sabit değerde durmaktadır. Bu şekilde akımda artış olmayana kadar eklemeye devam edilir. Şekil 2b ise, eklenen glukoz konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak biyosensörün kalibrasyon grafiğini göstermektedir.



Şekil 1. (a) Uygulanan potansiyelin biyosensör cevabı üzerindeki etkisi, (b) pH'nın etkisi

Akım cevabı glukoz konsantrasyonu arttıkça lineer bir şekilde artmakta ve kademeli olarak yüksek konsantrasyonlarda sabit bir değere ulaşmaktadır. Bu durum, belli bir glukoz konsantrasyonundan sonra enzimin aktif bölgelerinin doygunluğa ulaştığını göstermektedir. Kalibrasyon grafiğinden lineer çalışma aralığı 0.59-9.15 mM olarak belirlenmiş ve korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) 0.995 olarak hesaplanmıştır. Biyosensörün hassasiyeti lineer bölgenin eğiminden  $36.11 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$  olarak bulunmuştur. Biyosensörün tayin limiti (LOD) eşitlik 1'e göre 0.24 mM olarak belirlenmiştir. Bu eşitlikte, SD kör tampon çözeltinin (glukoz içermeyen) 0.5 V'daki akım değerlerinin standart sapmasını ( $N=10$ ) ve hassasiyet kalibrasyon grafiğinin lineer bölgesinden hesaplanan hassasiyeti ifade etmektedir.

$$LOD = \frac{3SD}{Hassasiyet} \quad (1)$$

Görünür Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) enzim-substrat etkileşimi hakkında bilgi vermekte ve genellikle immobilize edilmiş enzimin biyolojik aktivitesini belirlemek için kullanılmaktadır. Amperometrik metod ile  $K_m$  değerini bulmak için Lineweaver-Burk grafiğinden [20] türetilen eşitliğin eğim ve y-kesen değerlerinden faydalanılmıştır. Lineweaver-Burk eşitliği;

$$\frac{1}{I} = \frac{K_m}{I_{max}} \frac{1}{C} + \frac{1}{I_{max}} \quad (2)$$

şeklinde. Bu eşitlikte,  $I$ ; substrat ekledikten sonra elde edilen akım değerini,  $c$ ; substrat konsantrasyonunu ve  $I_{max}$ ; doygun substrat konsantrasyonunda ölçülen maksimum akım değerini ifade etmektedir. Pt/GO-PANI/GOD biyosensörü için  $K_m$  değeri 55.3 mM olarak belirlenmiştir. Düşük  $K_m$  değeri, GOD'ın biyolojik aktivitesini çok fazla bozmadan immobilize olduğunu ve elektrot modifikasyonunda kullanılan malzeme ile biyoyumlu olduğunu göstermektedir. Ancak, bu çalışmada belirlenen  $K_m$  değeri, GOD'ın çözeltideki değerinden (27 mM) biraz büyüktür [21]. Immobilizasyon işlemi için çapraz bağlayıcı kullanılması Pt/GO-PANI/GOD biyosensörünün daha yüksek  $K_m$  değeri sergilemesine neden olabilir.

Geliştirilen glukoz biyosensörü benzer çalışmalar ile karşılaştırılmış ve elde edilen bulgular Tablo 1'de verilmiştir. Daha önceki çalışmalarla kıyaslandığında bu çalışmada geliştirilen glukoz biyosensörünün daha yüksek hassasiyet sergilediği görülmüştür. Örnek olarak, Feng ve ark. elektrokimyasal polimerizasyon yöntemi ile grafen ve polianilin nanokompoziti hazırlamış ve üzerine kitosan-glukoz oksidaz (CS-GOD) çözeltisi kullanılarak GOD immobilize etmiştir [22]. Bu şekilde hazırlanan biyosensör 0.01-1.48 mM lineer tayin aralığında  $22.1 \mu A mM^{-1} cm^{-2}$  hassasiyet sergilemiştir. Başka bir çalışmada ise, altın nanoparçacıkları içeren grafen-polianilin biyokompozit ile modifiye edilmiş karbon elektrot üzerine çapraz bağlayıcı ile GOD immobilize edilerek bir glukoz biyosensörü geliştirilmiş ve bu biyosensörün 0.01-1.48 mM çalışma aralığında  $20.32 \mu A mM^{-1} cm^{-2}$  hassasiyete sahip olduğu bulunmuştur [23]. Unnikrishnan ve ark., elektrokimyasal yöntemle elektrot üzerinde grafen oksiti indirgeyerek indirgenmiş grafen oksit-glukoz oksidaz (RGO-GOD) bazlı biyosensör hazırlamıştır [25]. Bu biyosensörün hazırlanması basit bir yaklaşımla gerçekleştirilmiş olsa da hassasiyet çok düşük olup  $1.85 \mu A mM^{-1} cm^{-2}$  olarak belirlenmiştir.

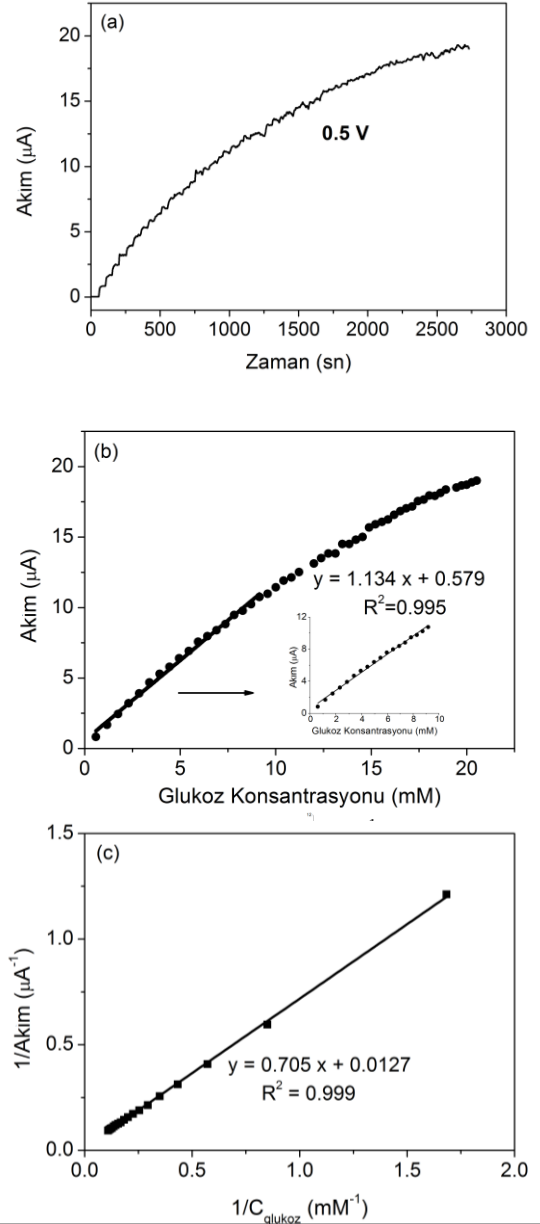
### Girişim Etkisi

Glukozun bulunduğu örneklerde yaygın olarak bulunabilen elektroaktif türler olan askorbik asit (AA) ve ürik asit (UA) gibi maddelerin girişim etkileri incelenmiştir. Şekil 3, 0.6 mM glukoz, 0.1 mM askorbik asit ve 0.1 mM ürik asit eklemelerine karşılık biyosensörün cevabını göstermektedir. AA ve UA'ye karşı biyosensörün herhangi bir akım değişimi göstermemesi hazırlanan biyosensörün glukozla karşı oldukça seçici olduğunu göstermektedir.

### Biyosensörün Kararlılığı

Biyosensör çalışmalarında kararlılık önemli bir parametredir. Bundan dolayı, geliştirilen glukoz biyosensörü farklı günlerde 0.6 mM glukozla karşı cevabı incelenmiş ve elde edilen veriler Şekil 4'de verilmiştir. 20

günlük kullanımın sonunda biyosensörün aynı glukoz derişimine karşı gösterdiği akım değerinde sadece %30'luk bir düşüş olduğu bulunmuştur.

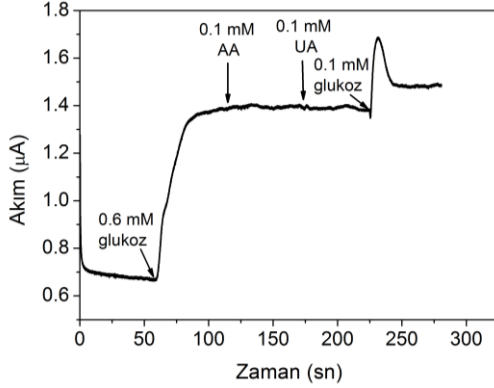


Şekil 2. Standart glukoz çözeltisi eklemeye karşı biyosensörün kronoamperometrik cevabı (a), kalibrasyon grafiği (b) ve Lineweaver-Burk grafiği (c)

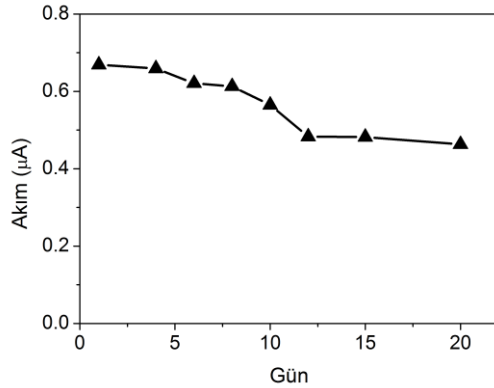
Tablo 1. Glukoz biyosensörlerinin karşılaştırılması

| Biyosensör        | Hassasiyet ( $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ ) | Tayin Limiti (mM) | Lineer Tayin Aralığı (mM) | Kaynak     |
|-------------------|---|-------------------|---------------------------|------------|
| GO-PANI/GOD       | 36.11   | 0.24              | 0.59-9.15                 | Bu çalışma |
| GR-PANI/CS-GOD    | 22.10   | 0.0028            | 0.01-1.48                 | [22]       |
| GR/PANI/AuNPs/GOD | 20.32   | 0.10              | 0.2-11.2                  | [23]       |
| PANI-PEO/GOD      | 16.04   | 0.82              | 1-10                      | [24]       |
| RGO/GOD           | 1.85  | -                 | 0.1 - 27                  | [25]       |

GOD: glukoz oksidaz, GO: grafen oksit, PANI: polianilin, GR: grafen, RGO: indirgenmiş grafen oksit, CS: kitosan AuNPs: altın nanopartikülleri, PEO: poli(etilen oksit)



Şekil 3. Glukoz, askorbik asit (AA) ve ürik asit (UA) eklemeye karşı biyosensörün kronoamperometrik cevabı



Şekil 4. GO-PANI bazlı glukoz biyosensörünün kararlılığı

## SONUÇ

Pt elektrot grafen oksit-polianilin nanokompoziti ile modifiye edilmiş, nanokompozite glukoz oksidaz (GOD) enzimi immobilize edilerek amperometrik glukoz biyosensörü (Pt/GO-PANI/GOD) geliştirilmiştir. Optimum çalışma koşullarında, Pt/GO-PANI/GOD biyosensörü 0.59-9.15 mM lineer çalışma aralığına, 36.11  $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$  hassasiyete ve 0.24 mM tayin limitine sahip olduğu belirlenmiştir. Geliştirilen biyosensörün benzer çalışmalar ile kıyaslandığında daha yüksek hassasiyet sergilediği görülmüştür. Biyosensörün glukozu karşı oldukça seçici olduğu ve kararlılığını, 20 günün sonunda sadece %30'luk akım kaybıyla, uzun süre koruduğu bulunmuştur.

## KAYNAKLAR

- [1] Mello, L.D., Kubota, L.T., 2002. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry* 77: 237-256.
- [2] Borisov, S.M., Wolfbeis, O.S., 2008. Optical Biosensors. *Chemical Reviews* 108: 423-461.
- [3] Luong, J.H.T., Bouvrette, P., Male, K.B., 1997. Developments and applications of biosensors in food analysis. *Trends in Biotechnology* 15: 369-377.
- [4] McGrath, T.F., Elliott, C.T., Fodey, T.L., 2012. Biosensors for the analysis of microbiological and chemical contaminants in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403: 75-92.
- [5] Ayenimo, J.G., Adeloju, S.B. 2017. Amperometric detection of glucose in fruit juices with polypyrrole-based biosensor with an integrated permselective layer for exclusion of interferences. *Food Chemistry* 229: 127-135.
- [6] Boujtita, M., Boitard, M., El Murr, N., 1999. Development of renewable surface biosensors to meet industrial needs for measurement of glucose in fruit juices. *Biosensors and Bioelectronics* 14: 545-553.
- [7] Ocvirk, G., Buck, H., DuVall, S.H., 2017. Electrochemical glucose biosensors for diabetes care. *Bioanalytical Reviews* 6.
- [8] Marquette, C.A., Degiuli, A., Blum, L.J., 2003. Electrochemiluminescent biosensors array for the concomitant detection of choline, glucose, glutamate, lactate, lysine and urate. *Biosensors and Bioelectronics* 19: 433-439.
- [9] Wang, J., 2008. Electrochemical glucose biosensors. *Chemical Reviews* 108: 814-825.
- [10] Hong, S.G., Kim, J.H., Kim, R.E., Kwon, S.J., Kim, D.W., Jung, H.T., Dordick, J.S., Kim, J., 2016. Immobilization of glucose oxidase on graphene oxide for highly sensitive biosensors. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 21: 573-579.
- [11] Ekanayake, E.M.I.M., Preethichandra, D.M.G., Kaneto, K., 2008. Effect of glucose oxidase immobilizing techniques on performances of nano scale polypyrrole glucose biosensors. *Japanese Journal of Applied Physics* 47: 1321-1324.
- [12] Schuhmann, W., Huber, J., Mirlach, A., Daub, J., 1993. Covalent binding of glucose oxidase to functionalized polyazulenes. The first application of polyazulenes in amperometric biosensors. *Advanced Materials* 5: 124-126.

- [13] Stejskal, J., Gilbert, R.G., 2002. Polyaniline. Preparation of a conducting polymer (IUPAC Technical Report). *Pure Applied Chemistry* 74: 857–867.
- [14] Geim, A.K., 2009. Graphene: status and prospects. *Science* 324: 1530–1534.
- [15] Chen, D., Feng, H., Li, J., 2012. Graphene oxide: Preparation, functionalization, and electrochemical applications. *Chemical Reviews* 112: 6027-6053.
- [16] Xu, G., Wang, N., Wei, J., Lv, L., Zhang, J., Chen, Z., Xu, Q., 2012. Preparation of graphene oxide/polyaniline nanocomposite with assistance of supercritical carbon dioxide for supercapacitor electrodes. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 51: 14390-14398.
- [17] Yang, Y., Kang, M., Fang, S., Wang, M., He, L., Zhao, J., Zhang, H., Zhang, Z., 2015. Electrochemical biosensor based on three-dimensional reduced graphene oxide and polyaniline nanocomposite for selective detection of mercury ions. *Sensors and Actuators, B: Chemical* 214: 63-69.
- [18] Hummers, W.S., Offeman, R.E., 1958. Preparation of Graphitic Oxide. *Journal of the American Chemical Society* 80: 1339-1339.
- [19] Gui, D., Liu, C., Chen, F., Liu, J., 2014. Preparation of polyaniline/graphene oxide nanocomposites for the application of supercapacitor. *Applied Surface Science* 307: 172-177.
- [20] Kamin, R.A., Wilson, G.S., 1980. Rotating ring-disk enzyme electrode for biocatalysis kinetic studies and characterization of the immobilized enzyme layer. *Analytical Chemistry* 52: 1198-1205.
- [21] Rogers, M.J., Brandt, K.G., 1971. Interaction of d-glucal with *Aspergillus niger* glucose oxidase. *Biochemistry* 10: 4624–4630.
- [22] Feng, X., Cheng, H., Pan, Y., Zheng, H., 2015. Development of glucose biosensors based on nanostructured graphene-conducting polyaniline composite. *Biosensors and Bioelectronics* 70: 411-417.
- [23] Kong, F.Y., Gu, S.X., Li, W.W., Chen, T.T., Xu, Q., Wang, W., 2014. A paper disk equipped with graphene/polyaniline/Au nanoparticles/glucose oxidase biocomposite modified screen-printed electrode: Toward whole blood glucose determination. *Biosensors and Bioelectronics* 56: 77-82.
- [24] Hansen, B., Hocevar, M.A., Ferreira, C.A., 2016. A facile and simple polyaniline-poly(ethylene oxide) based glucose biosensor. *Synthetic Metals* 222: 224-231.
- [25] Unnikrishnan, B., Palanisamy, S., Chen, S.M., 2013. A simple electrochemical approach to fabricate a glucose biosensor based on graphene-glucose oxidase biocomposite. *Biosensors and Bioelectronics* 39(1): 70-75.
- [26] Çoğal, S., Şen Gürsoy, S., Çelik Çoğal, G., Gürsoy, O., 2016. Sütte laktoz tayini için biyosensörlerin kullanımı. *Akademik Gıda* 14(1): 33-42.
-