

Karbon Nanotüp Katkılı Biyosensör Tasarımı ve Biyosensörün Çevresel Kirleticisi Olan Fenol ve Türevlerinin Tespitinde Kullanılması

Design of Carbon Nanotube Embedded Biosensor and Its Usage for Detection of Phenol and Its Derivatives Which are Environmental Pollutants

Muhammet Samet Kılıç¹, Şeyda Korkut^{2*}

¹Bülent Ecevit Üniversitesi, Kimya Bölümü, Zonguldak, Türkiye

²Bülent Ecevit Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Zonguldak, Türkiye

Öz

Bu çalışmada, su kaynakları ve atıksularda izlenmesi gereken önemli kirleticisi parametrelerden olan fenol ve fenol türevlerinin güvenli, seçici, hassas ve hızlı ölçülmesi amacıyla karbon nanotüp ile modifiye edilmiş iletken polimerik film kaplı çalışma elektrodu tabanlı fenol biyosensörü geliştirilmiştir. Fenol oksidasyonundan sorumlu olan tyrosinase enzimi çalışma elektrodu üzerine immobilize edilmiştir. Tasarlanan biyosensörde 18 farklı fenol türü analiz edilmiş, ölçüm için analitik parametreler hesaplanarak sonuçlar tartışılmıştır. Biyosensörün test edilen 5 fenol türüne tepki göstermesi, tyrosinase enziminin farklı fenolikler için geliştirilecek biyosensörlerde yüksek seçicilikte bir enzim olduğunu göstermiştir. Sistemde, karbon nanotüpün elektroaktiviteyi artırarak biyosensör sinyal gücüne katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Amperometrik sensör, Fenol biyosensörü, İletken polimerler, Tyrosinase

Abstract

In this study, a phenol biosensor based on the carbon nanotube modified conductive polymeric film coated working electrode has been developed for safe, selective, sensitive and fast detection of phenol and its derivatives, which are important pollutants should be detected in water sources and wastewaters. Enzyme tyrosinase responsible for phenol oxidation has been immobilized onto the working electrode. Various 18 phenol derivatives have been analyzed by the designed biosensor, and the results have been discussed by calculating the analytical parameters of the measurement. Response of the biosensor to 5 phenolics among the tested phenols showed that the tyrosinase was highly selective enzyme for biosensors would be developed for different phenols. It was concluded that carbon nanotube contributed to the biosensor signal by enhancing the electroactivity.

Keywords: Amperometric sensor, Phenol biosensor, Conductive polymers, Tyrosinase

1. Giriş

Uygun bir sinyal dönüştürücüyle ilişkilendirilmiş biyolojik birimlerin (enzimler, antikorlar, ilaç reseptörleri, bakteriler, DNA vs.) elektronik parçalarla entegrasyonu sonucu oluşan biyosensörler, fizyolojik değişimler, toksik, kanserojen madde veya organizmaların konsantrasyon bilgileri gibi biyokimyasal sinyalleri ölçülebilir elektriksel verilere dönüştüren analitik sistemlerdir. Biyosensör sisteminde en önemli ana eleman, analite karşı son derece seçimli ve tersinir

etkileşmeye sahip biyoajanlardır. Biyokatalitik ajanların arasında biyosensörlerde kullanılan en yaygın ajanlar enzimlerdir. Enzimlerin substratlarına karşı oldukça yüksek bir özgünlüğü ve afinitesi vardır. Enzimler, birçok kimyasal arasından ilgili oldukları substratı seçer ve reaksiyonu hızla katalizlerler. Enzim tabanlı biyosensörlerde, enzimler elektrot yüzeyine polimerler üzerinden immobilize edilmektedir. Söz konusu polimerlerden biri olan Polipirol, elektriksel iletkenliği yüksek bir polimerdir (Diaz vd. 1979). Polipirol filmlerin mekanik özellikleri diğer iletken polimerlerden iyi ve atmosfer koşullarında daha karardır. Polipirolün bu avantajı, biyosensör çalışmalarında uygun bir destek materyali olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Kullanılan polimerlerin yanı sıra enzim elektrotlarının elektriksel

*Sorumlu yazarın e-posta adresi: s.korkut@beun.edu.tr

iletkenliğini artırmak için medyatörler kullanılarak modifiye çalışma elektrotları hazırlanır. Medyatörler enzim ve elektrot yüzeyi arasındaki elektron transferini kolaylaştıran ya da hızlandıran elektroaktif maddelerdir. Son yıllarda biyosensör ve yakıt hücresi çalışmalarında kullanılan en önemli ve güncel medyatörlerden biri, yüksek kalitede mekanik ve elektronik özelliklere sahip olan karbon nanotüpleridir (CNT) (Çubukçu 2008). CNT'lerle yapılan iletimde, polifenilen esaslı zincirlerden 10 ila 100 kat daha fazla akım iletimi sağlanmaktadır. CNT'lerin ısı iletkenlikleri, en iyi ısı iletken olan elmasın 2 katıdır ve bakır telden 1000 kat daha fazla elektrik taşıyabilir. Bu özellikleriyle CNT'lerin gelecekte nanoelektronikğin temeli olacağı düşünülmektedir (Merkoçi vd. 2005, Wang ve Musameh 2003). CNT'lerin düşük potansiyellerde elektron transfer reaksiyonlarının hızlarını artırma özellikleri, son yıllarda araştırmacıların CNT ile hazırlanmış enzim elektrotlarının geliştirilmesi üzerine yoğun çalışmalar yapmasına neden olmuştur. CNT-enzim tabanlı biyosensörlerin en ilginç özelliği gelişmiş çalışma kararlılığıdır (Merkoçi vd. 2005).

Fenol ve fenol türevlerini ölçme amacıyla geliştirilmekte olan biyosensörler çoğunlukla polifenol oksidaz grubu (*tyrosinase*, *laccase*) ve *horseradish peroxidase* enzimlerini içeren çalışma elektrotları kullanılarak hazırlanır. *Tyrosinase* enzimi, bitki ve hayvansal dokularda yaygın olarak bulunan oksidoreduktaz sınıfı (redoks reaksiyonlarını katalizleyen) bir enzimdir. Aktif merkezi prostetik grup (demir ya da bakır ihtiva eden grup) içermektedir. *Tyrosinase* enziminin aktif merkezinde her biri üç histidin aminoasidi grubuna bağlanmış iki bakır atomu bulunmaktadır ve bu bakır atomları iki tane oksijen atomuyla etkileşim halindedir. Prostetik grubunda bulunan bakır sayesinde enzim, redoks tepkimelerine rahatlıkla girebilmektedir. Enzimin ana substratı tirozin, fenolik yapıda bir madde olduğundan fenol ve bazı türevleri de bu enzimin spesifik substratlarıdır. Enzim genel olarak, nötr tamponda, oda sıcaklığında moleküler oksijeni farklı fenolleri kullanarak indirgeyen oldukça kararlı bir enzimdir (Ikehata 2000). Bu avantajları sayesinde *tyrosinase* enziminin, fenol için geliştirilen biyosensörlerde biyoajan olarak kullanılması tercih sebebidir.

Bu çalışmada, çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) ile modifiye edilmiş Polipirol ve *tyrosinase* enzimi kullanılarak fenol biyosensörü tasarlanmıştır. MWCNT, oksidasyon prosedürüne tabi tutularak hem suda çözünebilir hale getirilmiş, hem de üzerine kimyasal yoldan enzim immobilizasyonuna olanak sağlayacak karboksil (-COOH) fonksiyonel grupları takılmıştır. Biyosensörün işletim

koşulları en iyi performansı elde edebilmek amacıyla optimize edilerek tasarlanan biyosensör, 18 farklı fenol türevinin konsantrasyonunun ölçümünde kullanılmıştır.

2. Gereç ve Yöntem

2.1. Kimyasallar ve Aparatlar

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallardan, potasyum fosfat, asetik asit, sodyum asetat Merck'den, fenol, *p*-benzokinon, hidrokinon, 2,6-dimetoksifenol, 2- klorofenol, 3-klorofenol, 4-klorofenol, 2-aminofenol, 4-metoksifenol, pirokatekol, guaiakol (2-metoksifenol), *m*-kresol, *o*-kresol, *p*-kresol, katekol, 4-asetamidofenol, pirogallol, 2, 4- dimetilfenol, pirol (%99), sodyum dodesil sülfat (SDS), 1-siklohegzil-3(2-morfolinoetil) karbodiimid toluen sülfonat Sigma'dan, *tyrosinase* (E.C.1.11.1.7) Fluka'dan, çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) Nanocs. Inc.'den temin edilmiştir. Elektrokimyasal ölçümler CHI 1040B Marka potansiyostat kullanılarak yapılmıştır. Cam karbon çalışma elektrodu (3 mm çapında), platin çubuk karşıt elektrot ve Ag/AgCl (3M NaCl) referans elektrottan oluşan konvansiyonel üçlü elektrot sistemi CH Instruments firmasından temin edilmiştir.

2.2. Karbon Nanotüp ile Modifiye Edilmiş Çalışma Elektrodunun Hazırlanması

Karbon nanotüp (CNT), suda çözünmeyen bir yapıya sahiptir. CNT içeren elektropolimerizasyon ortamlarında CNT mutlaka suda çözünebilir halde olmalıdır. CNT'nin suda çözünebilmesi için literatürde farklı oksidasyon basamakları kullanılmaktadır (Zhao vd. 2002). Bu metoda göre; 14 mg CNT, hacimsel olarak 9:1 oranında hazırlanmış H₂SO₄/H₂O₂ karışımının 5 mL'sine eklenmiş ve 30 dakika karıştırılmıştır. Reaksiyondan sonra çözelti aynı H₂SO₄/H₂O₂ karışımı ile 20 mL'ye tamamlanmıştır. Çözelti ultrasonik banyoda 5 dakika sonike edildikten sonra, saf su ile 1 L'ye tamamlanmış ve 0.45 µM por çaplı selüloz membrandan süzümüştür. Membranda tutulan CNT, pH değeri 7 olana kadar 10 mM'lık NaOH çözeltisiyle yıkanmış ve son olarak saf sudan geçirilmiştir. CNT tartılmış ve son konsantrasyonu 0.03 mg/L olacak şekilde saf suda çözülmüştür. Çözelti 2 dakika sonike edilmiştir. Bu işlem sayesinde ayrıca, CNT üzerinde, kimyasal yoldan enzim immobilizasyonuna olanak sağlayan fonksiyonel karboksil grupları oluşturulmuştur (Korkut vd. 2008).

Çalışma elektrodu yüzeyinde Polipirol film sentezi için elektropolimerizasyon ortamı, okside edilmiş 10 mL CNT çözeltisine, 6 mg sodyum dodesil sülfat (SDS) ve konsant-

rasyonu 0.01 M olacak şekilde pirol eklenip karıştırılarak hazırlanmıştır. Üçlü elektrot sistemi ortama daldırılmış ve potansiyostata 0 ile +1.2 V arasında potansiyel uygulanarak 100 mV/s'lik tarama hızında 4 dakikalık sürede elektrokimyasal pirol polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon işlemi bittikten sonra cam karbon elektrot saf suyla yıkanmış, 0.1 M, pH 7 fosfat tamponuna daldırılmış, +2 V'luk potansiyel uygulanarak 5 dakika temizlemeye tabi tutulmuştur. 1 g 1-siklohegzil-3(2-morfolinoetil) karbodümid toluen sülfonat, 50 mM pH 4.8 asetat tamponunun 20 mL'sinde çözünmüştür. Polipirol kaplı cam karbon elektrot bu çözeltiliye daldırılmış, 200 rpm'lik karıştırma altında 3.5 saat karıştırılarak CNT katkılı Polipirol film kaplanmış çalışma elektrodundaki enzim bağlayıcı karboksil gruplarının aktivasyonu sağlanmıştır. 0.1 M, pH 7 fosfat tamponunun 2 mL'sinde 3 mg *tyrosinase* çözülerek, enzim çözeltisi hazırlanmıştır. Kaplanan elektrot bu çözelti içerisine daldırılmış ve 4°C'de 1 gece bekletilerek enzim immobilizasyonu sağlanmıştır.

2.3. Biyosensör Deneysel Düzeni

Bir reaksiyon hücresi içerisine daldırılmış üçlü elektrot sistemi potansiyostata bağlanmıştır. Enzim tutuklu çalışma elektrodu ile birlikte, referans elektrot ve karşıt elektrot hücreye daldırılarak biyosensörün çalışma elektroduna, sabit bir elektrik potansiyeli uygulanmıştır. Oksijene doyurulmuş, 10 mL hacminde 0.1 M, pH 7 fosfat tamponu içeren hücreye farklı konsantrasyonlarda fenolik çözeltiler eklenerek reaksiyon sonucu oluşacak olan akım değerleri ölçülmüştür.

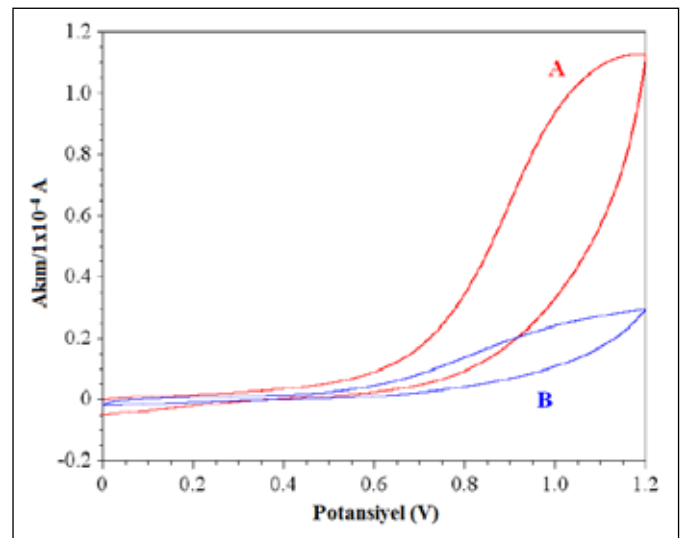
3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Çalışma Elektrodu Karakterizasyonu

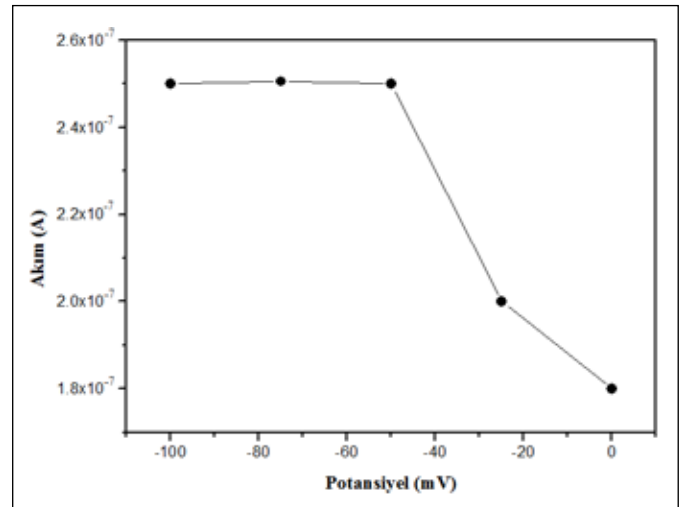
CNT'nin etkinliğini araştırmak amacıyla CNT içermeyen ve CNT içeren iki çalışma elektrodunun, 0.1 M pH 7 fosfat tamponu içerisinde 0 ile +1.2 V aralığında ve 50 mV/s tarama hızında gerçekleştirilen dönüşümlü voltametri grafiği Şekil 1'de gösterilmiştir. Şekil 1'de görüldüğü gibi CNT ile modifiye olan elektrodun akım değerlerinin CNT içermeyen elektroda göre oldukça yüksek olması, CNT katkısıyla elektrot yüzeyindeki elektroaktivitenin arttığının göstergesidir. Çalışma elektrodu yüzeyinden geçen akımın artması, biyosensör sinyal gücünün de mutlak surette artmasına ve sonuç olarak biyosensörün daha düşük analit konsantrasyonlarına yüksek sinyallerle tepki vermesini sağlamaktadır. Ayrıca, pozitif potansiyel değerlerinde elektrottan geçen yüksek akım değerleri, pirolün CNT katkısıyla elektrot yüzeyinde daha iyi okside edilerek yüzeyin kaplandığını göstermektedir.

3.2. Çalışma Potansiyeli ve pH'ın Biyosensör Sinyaline Etkisi

Amperometrik fenol biyosensörlerinde biyomolekül olarak *tyrosinase* enzimi kullanıldığında, elektrot üzerinde gerçekleşen reaksiyon mekanizması fenollerin ardışık iki tepkimeyle katalizlenmesi sonucu şu şekilde açıklanabilir: ilk basamakta monofenollerin moleküler oksijen varlığında enzimatik reaksiyon sonucu *o*-difenollere (katekol) dönüşümü sağlanır. İkinci basamakta ise, oluşan difenoller de aynı enzimatik reaksiyon üzerinden *o*-kinonlara dönüştürülür. Bu arada moleküler oksijen direkt olarak suya indirgenir. Ardışık tepkimelerin son ürünü olan kinonlar uygun potansiyel değere



Şekil 1. CNT ile modifiye edilmiş (A) ve CNT ile modifiye edilmemiş (B) çalışma elektrotlarına ait dönüşümlü voltametri grafiği.



Şekil 2. Biyosensörün optimum çalışma potansiyelinin belirlenmesi.

rinde elektrot yüzeyinden elektron olarak indirgenir ve tekrar katekole dönüşür. Bu sırada elektrottan geçen elektron miktarı ortamdaki fenol konsantrasyonuyla orantılı olarak değişim göstermekte ve bu elektron akışı cihaz tarafından uygun potansiyel altında akım sinyallerine çevrilmiştir (Tsai ve Cheng-Chiu 2007). Devreden geçen akım, ortama eklenen fenolik konsantrasyonuyla orantılı olarak artar.

Farklı çalışma potansiyellerinde biyosensörün 10 μL , 20 μM 'lık pirokatekol eklemelerine olan tepkisi Şekil 2'de gösterilmiştir. İndirgenme akımı 0 mV'dan itibaren -50 mV'a kadar hızlı bir şekilde artmış ve daha negatif potansiyellerde indirgenme akımının değişmediği görülmüştür. Şekilden de anlaşıldığı gibi fenolik madde için en yüksek indirgenme akımı -50 mV'luk potansiyelde gerçekleşmiştir. Bu nedenle sistem için en iyi çalışma potansiyeli -50 mV olarak seçilmiştir. Pirokatekol dışındaki diğer fenolik türler için de aynı deneyler yapılmış ve benzer sonuçlara ulaşılmıştır.

Tyrosinase enziminin maksimum aktivite gösterdiği pH değerinin tespiti için, sırasıyla pH değeri 5, 6, 7, 8 ve 9 olan 0.1 M'luk tampon ortamına 20 μM pirokatekol çözeltisi eklenmiş ve biyosensörden elde edilen akım değerleri Şekil 3'de gösterilmiştir. Akım değerleri pH 5-7 aralığında artarken 7'den sonra enzimatik reaksiyondaki aktivite düşüşüne bağlı olarak akım değerlerinde düşüşler kaydedilmiştir. Şekil 3'den enzimin maksimum aktivite gösterdiği optimum pH değeri 7 olarak tespit edilmiştir. Diğer fenol bileşikleri için de pH 7 reaksiyon ortamı kullanılmıştır.

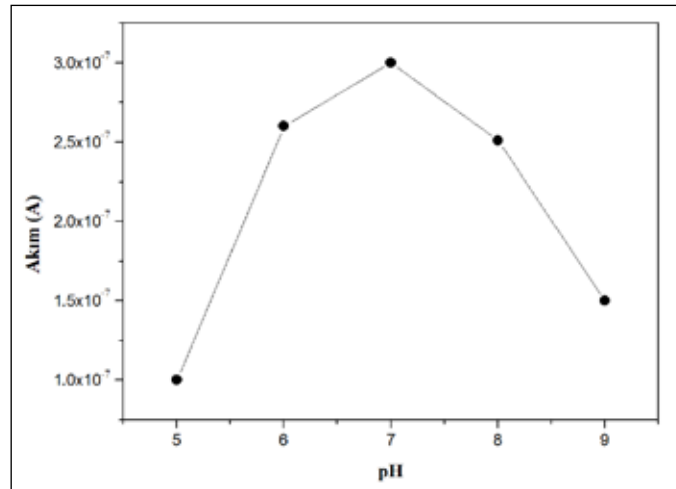
3.3. Biyosensörde Fenolik Bileşiklerin Ölçümü

Biyosensörün fenol, katekol, *p*-benzokinon, *m*-kresol, *o*-kresol, *p*-kresol, guaiakol, 2,4-dimetilfenol, 2,6-dimetoksifenol, 2-klorofenol, 3-klorofenol, 4-klorofenol, hidrokinon, 4-asetamidofenol, pirogallol, 4-metoksifenol, pirokatekol, 2-aminofenol'den oluşan 18 farklı fenol türüne verdiği tepki incelenmiştir. Kesikli ortamda, 600 rpm'lik karıştırma altında, -50 mV'luk (vs. Ag/AgCl) çalışma potansiyelinde her bir fenol bileşiği için, 0.1 M pH 7 tampon ortamına 5 μM konsantrasyondan başlamak üzere düzenli olarak artan konsantrasyonlarda her fenol türü için eklemeler yapılmış ve akım değişimleri gözlenmiştir. Pirokatekol için elde edilen akım-zaman grafiği Şekil 4'de verilmiştir (Her fenolik bileşik için gösterilmemiştir).

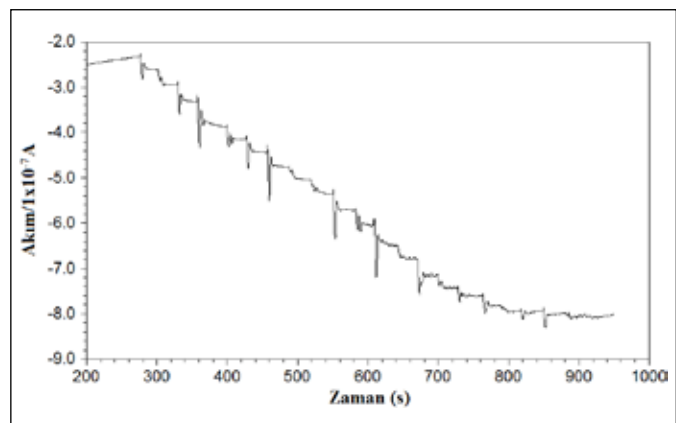
Amperometrik akım-zaman grafikleri kullanılarak her bir ekleme sonunda elde edilen akım değişimleri ekleme konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilmiştir. Farklı fenol bileşikleri için elde edilen akım değişimlerinin karşılaştırmaları Şekil 5'de verilmiştir. Bu değerler kullanılarak hesaplanmış

biyosensör analitik parametreleri Çizelge 1'de gösterilmiştir. Biyosensörün, test edilen 18 fenolik tür arasından pirokatekol, katekol, *p*-kresol, 4-metoksifenol ve 4-asetamidofenol bileşiklerine tepki verdiği gözlenmiştir. Çizelge 1'den görüldüğü gibi test edilen fenoller arasında en düşük belirleme limiti (LOD) 4-asetamidofenol için 0.17 μM , en yüksek LOD ise katekol için 2.38 μM olarak hesaplanmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda hazırlanmış olan çeşitli fenol biyosensörlerinde belirleme limiti yukarıdaki fenol bileşikleri için 0.34-5 μM aralığında verilmiştir (Kim ve Lee 2003, Verdine vd. 2003, Turner 2000, Wang vd. 2000).

Ölçüm hassasiyeti genel olarak enzimin analite ilgisine, kullanılan iletken polimerin çeşidine, enzim immobilizasyon metoduna, iletkenliğe ve enzimatik reaksiyonla oluşan fenoksi radikallerinin stabilitesine ve önemli ölçüde fenol üzerindeki elektron verici grupların konjugasyon yapılarına bağlıdır (Marko-Varga vd. 1995). Başka bir deyişle, fenol üzerindeki bir grubun (metil, klor, vb.) farklı olması ya da



Şekil 3. Ölçümler için optimum pH'nın belirlenmesi.



Şekil 4. Pirokatekol için akım-zaman grafiği.

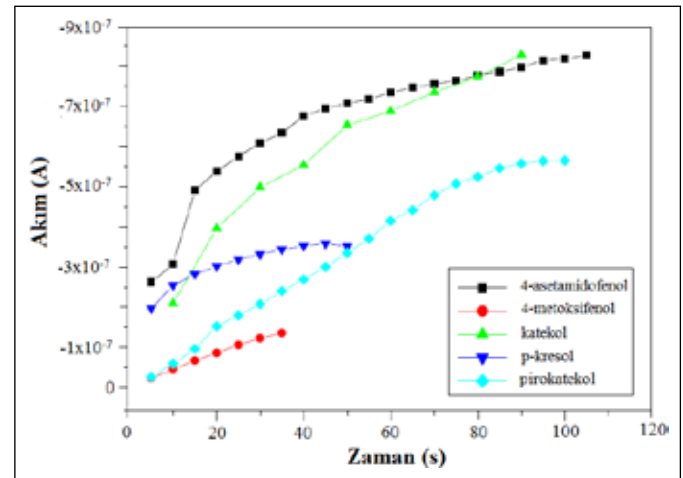
molekül üzerindeki yerinin değişmesi, enzimin fenolik bileşiklerle kompleks oluşturma hızını etkilemektedir. Bu durum, biyosensörün farklı fenollere farklı sinyaller vermesine yol açmaktadır. Çalışmada en yüksek ölçüm hassasiyeti pirokatekol için $7 \text{ nA}/\mu\text{M}$, en düşük ölçüm hassasiyeti ise 4-asetamidofenol için $2 \text{ nA}/\mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. Literatürde farklı fenol biyosensörleri için hesaplanmış hassasiyet değerleri $0.01\text{-}746 \text{ nA}/\mu\text{M}$ aralığında değişim göstermektedir (Li vd. 2006, Chang vd. 2002). Koile ve Johnson (1979), yüksek konsantrasyonlardaki fenol eklemelerinde akım değişimindeki doğrusallığın bozulmasını reaksiyon ürünlerinin yüzeyi yavaşça kaplamasına bağlamıştır. Literatürde, CNT tabanlı çalışma elektrotlarının elektrokatalitik aktiviteyi arttırdığı ve CNT sayesinde yüzeyin reaksiyon ürünleriyle kaplanmasının minimize edildiği rapor edilmiştir (Tsai ve Cheng-Chiu 2007). Çalışmamızda, CNT olmadan hazırlanmış çalışma elektrodunda pirokatekol için elde edilen ölçüm hassasiyeti $0.5 \text{ nA}/\mu\text{M}$, 4-asetamidofenol için ise $0.15 \text{ nA}/\mu\text{M}$ 'dir. Çalışmamızda, CNT katkılı biyosensörde test edilen her fenolik tür için yüksek R^2 değerlerine sahip geniş doğrusal aralıkların ve CNT'siz elektroda kıyasla yüksek ölçüm hassasiyetinin elde edilmesi CNT'nin biyosensör sinyal gücünü artırmasının sonucudur. CNT, literatür sonuçlarına uyumlu olarak bu çalışmada dizayn edilen biyosensörde elektrot yüzeyinde elektron transfer hızını artırmış (Korkut vd. 2008, Tsai ve Cheng-Chiu 2007) ve buna bağlı olarak daha hassas fenol ölçümleri sağlanmıştır.

Biyosensörün işletme kararlılığının tespiti için, 0.1 M pH 7 fosfat tamponunun 10 mL 'sine -50 mV 'luk çalışma potansiyeli altında, ard arda $20 \mu\text{M}$ 'lık fenolik eklemeleri yapılmış ve elde edilen akım değişimleri kaydedilmiştir (Şekil 6). Sinyal alınan her fenolik bileşiğin aynı konsantrasyonları için elde edilen akım değerlerinin rölatif standart sapmaları (%RSD) $\%0.91\text{-}\%11.2$ aralığında değişim göstermiştir. Biyosensör, tepki verdiği fenollere karşı yüksek ölçüm hassasiyeti, düşük belirleme limiti, geniş doğrusal ölçüm aralığı, hızlı cevap süresi ve aynı konsantrasyon için ölçümlerarası stabilite göstermiştir. Literatürde biyosensörler için CNT'li değişik kompozit polimer yapıları oluşturulmuştur. Örneğin; Poli(amidoamin)/CNT kompozit polimerinin bir camı karbon yüzeyinde sentezlenerek hazırlandığı çalışma elektroduna *glucose oxidase* ve *horseradish peroxidase* enzimi bağlanarak hem glikoz hem de hidrokinon tayini (Zeng vd. 2007), kitosan/CNT polimerinin yine bir camı karbon yüzeyinde sentezlenerek hazırlandığı çalışma elektrodu ile sürekli sistemde galaktoz tayini (Tkac vd. 2007), nafyon/

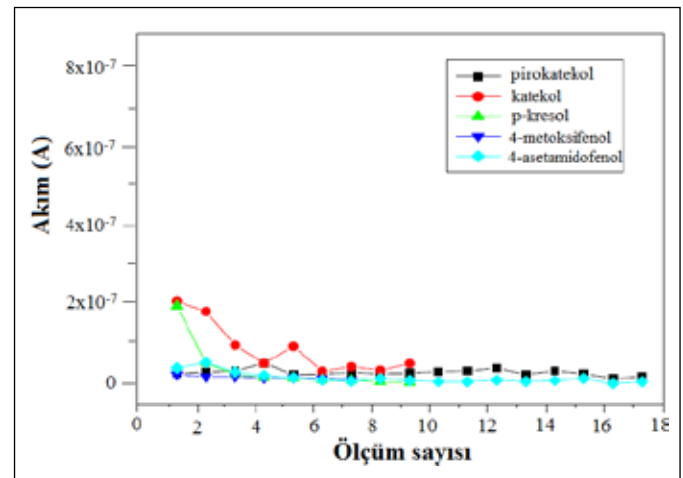
CNT polimerinin camı karbon yüzeyinde sentezlenerek hazırlandığı çalışma elektrodu ile kesikli sistemde fenol ve 4 türevinin tayini gerçekleştirilmiştir (Tsai ve Cheng-Chiu 2007). Çalışmaların çoğunda CNT'nin çalışma elektrodu üzerine olumlu etkisi vurgulanmış, söz konusu analiz için hesaplanan analitik parametrelerde iyileşme sağladığı rapor edilmiştir.

4. Sonuç

Çalışmada, karbon nanotüp katkılı Polipirol filmle kaplanmış çalışma elektrodunu içeren bir biyosensör tasarlanmıştır. Hazırlanan biyosensörün, 18 farklı fenol türü arasında pirokatekol, katekol, *p*-kresol, 4-metoksifenol ve 4-asetamidofenol bileşiklerine tepki verdiği gözlenmiştir. Bu bakımdan *tyrosinase* enziminin, biyosensör sistemlerinde farklı



Şekil 5. Farklı fenol bileşikleri için biyosensör akım değişimlerinin karşılaştırılması.



Şekil 6. Biyosensörün farklı fenol bileşiklerinin ölçümü için işletme kararlılığı grafiği.

Çizelge 1. Biyosensörün farklı fenolik türleri için hesaplanmış ölçüm analitik parametreleri.

Fenolik Tür	R ²	Hassasiyet (nA/μM)	Lineer aralık (μM)	LOD (μM)	%RSD
pirokatekol	0.99	7	5-85	0.41	2.7
<i>p</i> -kresol	0.98	3	15-40	2.05	11.2
katekol	0.98	6	20-90	2.38	9.1
4-asetamidofenol	0.97	2	35-105	0.17	0.91
4-metoksifenol	0.99	4	5-35	1.08	6.82
fenol			<i>Tepki yok</i>		
<i>p</i> -benzokinon			<i>Tepki yok</i>		
hidrokinon			<i>Tepki yok</i>		
2,6-dimetoksifenol			<i>Tepki yok</i>		
2-klorofenol			<i>Tepki yok</i>		
3-klorofenol			<i>Tepki yok</i>		
4-klorofenol			<i>Tepki yok</i>		
2-aminofenol			<i>Tepki yok</i>		
4-aminofenol			<i>Tepki yok</i>		
guaiakol			<i>Tepki yok</i>		
<i>m</i> -kresol			<i>Tepki yok</i>		
<i>o</i> -kresol			<i>Tepki yok</i>		
pirogallol			<i>Tepki yok</i>		

fenol türleri için yüksek seçicilikte bir enzim olduğu sonucuna varılmıştır. Biyosensör test edilen fenollere karşı yüksek hassasiyet değeri, düşük belirleme limiti, geniş lineer aralık, hızlı cevap süresi ve güvenilir aralıkta ölçüm stabilitesi göstermiştir. Karbon nanotüpün, sistemde fenolik reaksiyonlar sonucu gerçekleşen elektron akışını hızlandırarak sistemin sinyal gücünü artırdığı görülmüştür. Test edilen farklı fenoller için LOD değerleri 4-asetamidofenol<pirokatekol<4-metoksifenol<*p*-kresol<katekol şeklindedir. Aynı ölçümlerin relatif standart sapma değerleri %0.91-%11.2 aralığında değişim göstermiştir.

5. Kaynaklar

- Chang, SC., Rawson, K., McNeil, CJ. 2002.** Disposable tyrosinase-peroxidase bi-enzyme sensor for amperometric detection of phenols. *Biosens. Bioelectron.*, 17: 1015-1023.
- Çubukçu, M. 2008.** Nanokompozitler ve elektrokimyasal sensör uygulamaları. *Yüksek Lisans Tezi*, Muğla Üniversitesi, 100 s.
- Diaz, AF., Kanazawa, KK., Gadrini, GP. 1979.** Electrochemical polymerization of pyrrole. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 62: 635-636.
- Ikehata, K. 2000.** Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols. *Bioresource Technol.*, 74: 191-199.
- Kim, MA., Lee, WY. 2003.** Amperometric phenol biosensor based on sol-gel silicate/Nafion composite film. *Anal. Chim. Acta*, 479:143-150.
- Koile, R., Johnson, D. 1979.** Electrochemical removal of phenolic films from a platinum anode. *Anal. Chem.*, 51: 741-744.
- Korkut, S., Keskinler, B., Erhan, E. 2008.** An amperometric biosensor based on multiwalled carbon nanotubepoly (pyrrole)-horseradish peroxidase nanobiocomposite film for determination of phenol derivatives. *Talanta*, 76:1147-1152.
- Li, YF., Liu, ZM., Liu, YL., Yang, YH., Shen, GL., Yu, RQ. 2006.** A mediator-free phenol biosensor based on immobilizing tyrosinase to ZnO nanoparticles. *Anal. Biochem.*, 349: 33-40.
- Marko-Varga, G., Emneus, MJ., Gorton, L., Ruzgas, T. 1995.** Development of enzyme-based amperometric sensors for the determination of phenolic compounds. *Trends Analyt. Chem.*, 14: 319-328.
- Merkoçi, A., Pumera, M., Llopis, X., Perez, B., del Vale, M., Alegret, S. 2005.** New materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes. *Trends Analyt. Chem.*, 24: 826-838.

- Tkac, J., Whittaker, JW., Ruzgas, T. 2007.** The use of single walled carbon nanotubes dispersed in a chitosan matrix for preparation of a galactose biosensor. *Biosens. Bioelectron.*, 22: 1820-1824.
- Tsai, YC., Cheng-Chiu, C. 2007.** Amperometric biosensors based on multiwalled carbon nanotube-nafion-tyrosinase nanobiocomposites for the determination of phenolic compounds. *Sensor. Actuat. B- Chem.*, 125: 10-16.
- Turner, APF. 2000.** Biochemistry: biosensors-sense and sensitivity. *Science*, 290: 1315-1317.
- Vérdine, C., Fabiano, S., Tran-Minh, C. 2003.** Amperometric tyrosinase based biosensor using an electrogenerated polythiophene film as an entrapment support. *Talanta*, 59: 535-544.
- Wang, B., Zhang, J., Dong, S. 2000.** Silica sol-gel composite film as an encapsulation matrix for the construction of an amperometric tyrosinase-based biosensor. *Biosens. Bioelectron.*, 15:397-402.
- Wang, J., Musameh, M. 2003.** Carbon nanotube/teflon composite electrochemical sensors and biosensors. *Anal. Chem.*, 75: 2075-2079.
- Zeng, YL., Huang, YF., Jiang, JH., Zhang, XB., Tang, CR., Shen, GL., Yu, RQ. 2007.** Functionalization of multi-walled carbon nanotubes with poly(amidoamine) dendrimer for mediator-free glucose biosensor. *Electrochem. Commun.*, 9: 185-190.
- Zhao, W., Song, C., Pehrsson, E. 2002.** Water-soluble and optically pH-sensitive singlewalled carbon nanotubes from surface modification. *J. Am. Chem. Soc.*, 124:12418-12419.