



BİSFENOL-A TAYİNİ İÇİN BİR BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI

Hasan KOÇAK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2020

Hasan KOÇAK tarafından hazırlanan “BİSFENOL-A TAYİNİ İÇİN BİR BİYSENSÖR HAZIRLANMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Kimya Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Fatma ARSLAN

Kimya Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Başkan: Doç. Dr. Servet ÇETE

Kimya Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Merve KESKİN

Kimya Ana Bilim Dalı, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Tez Savunma Tarihi: 17/01/2020

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

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

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

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

Hasan KOÇAK

17.01.2020

BİSFENOL-A TAYİNİ İÇİN BİR BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI
(Yüksek Lisans Tezi)

Hasan KOÇAK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2020

ÖZET

Yapılan bu çalışmada, bisfenol-A (BFA) tayini için yeni bir biyosensör hazırlanmıştır. Bu amaçla ilk olarak Poli (amidoamin) salisilaldehit platin (II) (PAMAM-Sal-Pt (II)) içeren karbon pasta ve modifiye karbon pasta elektrodu hazırlandı. Daha sonra tirozinaz enzimi modifiye edilen karbon pasta elektrot yüzeyine gluteraldehit ile çapraz bağlanarak immobilize edildi. Bisfenol-A bileşiği oksijenli ortamda tirozinaz enzimi katalizörlüğünde p-bisbenzokinon bileşiğine yükseltgenir. Bisfenol-A tayini enzimatik reaksiyon sonucu oluşan p-bisbenzokinon bileşiğinin -0,15 V'da elektrokimyasal olarak indirgenmesine dayanılarak yapıldı. Daha sonra hazırlanan bisfenol-A biyosensörünün uygun çalışma koşulları araştırıldı. Bu amaçla biyosensörün doğrusal çalışma aralığı belirlendi. Yapılan çalışmalar sonunda immobilize elektrodun en iyi çalışma koşulları sıcaklık, pH, polimer miktarı, tekrarlanabilirlik, raf ömrü belirlenip gerçek örneklerde bisfenol-A tayinine girişim yapabilecek muhtemel bazı maddelerin girişim etkileri incelendi. Hazırlanan biyosensör diş hekimliğinde braket yapıştırıcı olarak kullanılan ortodontik bir malzeme içindeki bisfenol-A tayini için kullanıldı.

Bilim Kodu : 20104
Anahtar Kelimeler : Biyosensörler, tirozinaz, karbon pasta elektrot
Sayfa Adedi : 51
Danışman : Prof. Dr. Fatma ARSLAN

PREPARATION OF BIOSENSOR FOR BISFENOL-A DETERMINATION

(M. Sc. Thesis)

Hasan KOÇAK

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

January 2020

ABSTRACT

In this study, a novel biosensor was prepared for bisphenol A determination. For this purpose firstly, a carbon paste electrode modified with PAMAM-Sal-Pt (II)-active carbon composite and tyrosinase enzyme (polyphenol oxidase) were prepared. For PAMAM-Sal-Pt (II); Synthesized and characterized from PAMAM, Salyclaldehyde. And then, Tyrosinase enzyme was immobilized onto the modified carbon paste electrode surface by cross-linking with glutaraldehyde. Bisphenol-A compounds form p-bisbenzoquinone compounds in oxygenated environment were catalyzed by tyrosinase enzyme. Bisphenol-A determination was made on the basis of the reduction of the reaction product p-bisbenzoquinone on the modified carbon paste electrode surface at $-0,15$ V. Then, appropriate working conditions of the prepared bisphenol-A biosensor were investigated. For this purpose, the linear working range of the enzyme electrode was determined. The effect of pH and temperature on the amperometric response of the biosensor were investigated. In addition, reusability and shelf life were determined. The interference effects of some cations, anions and molecules in bisphenol-A determination were investigated. The prepared biosensor was used for the determination of bisphenol-A in an orthodontic material used as a bracket bonding adhesive in dentistry.

Science Code : 20104

Key Words : Biosensors, Tyrosinase, carbon paste electrode

Page Number : 51

Supervisor : Prof. Dr. Fatma ARSLAN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca bilgisi ve deneyimleri ile bana ışık tutan, her konuda yardımcı olan, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyduğum danışman hocam Prof. Dr. Fatma ARSLAN'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım boyunca bana destek olan her konuda yardımlarını esirgemeyen hocam Doç. Dr. Halit ARSLAN ve Doç. Dr. Servet ÇETE'ye çok teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarında sahip olduğu deneyimi benimle paylaşan Arş. Gör. Onur Can BODUR'a teşekkür ederim. Sadece bu tez çalışmamda değil, hayatımın her anında desteklerini sınırsız şekilde hissettiğim, her konuda ona güvendiğim kardeşim, Öğr. Gör. Dr. Harun KOÇAK'a sonsuz sevgim ile birlikte teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Bisfenol-A ve Özellikleri.....	5
2.2. Enzimler ve Özellikleri.....	7
2.3. Tirozinaz Enzimi	11
2.4. Biyosensörler	12
2.4.1. Biyosensörlerin çeşitleri	13
2.4.2. Biyosensörlerin yapısı	14
2.4.3. Biyosensörlerin uygulama alanları	15
2.5. Enzimler ve Enzim Temelli Biyosensörler.....	15
2.6. Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemi	16
2.7. İmmobilize Enzimlerin Serbest Enzimlere Göre Üstünlükleri.....	18
2.8. Karbon Pasta Elektrotlar.....	19
2.9. Kaynak Araştırması	20
3. DENEYSEL KISIM.....	23
3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	23

	Sayfa
3.2. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler	23
3.3. Deneylerde Kullanılan Cihazlar	24
3.3.1. Elektrokimyasal analiz cihazı	24
3.3.2. Hücre ve elektrotlar	24
3.3.3. pH metre	25
3.3.4. Su banyosu.....	26
3.3.5. Mikro pipet	26
3.3.6. Saf su cihazı.....	26
3.4. BFA Biyosensörünün Hazırlanması ve En İyi Koşulların Belirlenmesi	26
3.4.1. Çalışma elektrodun hazırlanması: Karbon pasta elektrot (CPE), modifiye karbon pasta elektrot (MCPE) hazırlanması.....	26
3.4.2. CPE' nin sabit akıma getirilmesi	27
3.4.3. CPE ve MCPE' nin bisfenol-A' ya duyarlılığının belirlenmesi	28
3.4.4. MCPE' ye tirozinaz enziminin immobilizasyonu	28
3.4.5. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi.....	28
3.4.7. PAMAM-Sal-Pt (II) Polimer miktarının belirlenmesi	29
3.4.6. Gluteraldehit miktarının belirlenmesi.....	29
3.4.8. Enzim elektrodun en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi.....	30
3.4.9. Bisfenol-A tayinine girişim yapan türlerin etkisinin incelenmesi	32
3.4.10. Gerçek örneklerle biyosensörün uygulanması	32
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	33
4.1. Biyosensörün En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi.....	33
4.1.1. CP ve MCP Elektrotların BFA' ya duyarlılığı	33
4.1.2. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi.....	34
4.1.3. PAMAM-Sal-Pt (II) Polimer miktarının belirlenmesi	35

	Sayfa
4.1.4. Gluteraldehit miktarının belirlenmesi.....	36
4.1.5 pH ‘nın belirlenmesi	37
4.1.6 Sıcaklık etkisi	38
4.1.7 Bisfenol-A derişiminin etkisi.....	39
4.1.8. Tekrarlanabilirlik	41
4.1.9. Raf ömrünün belirlenmesi	42
4.1.10. Bisfenol-A tayinine girişim yapan türlerin etkisinin incelenmesi	43
4.1.11. Gerçek örneklere biyosensörün uygulanması.....	44
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	45
KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ	51

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Plastiklerin geri dönüşüm numaraları	6
Çizelge 2.2. Bisfenol-A' nın fiziksel ve kimyasal özellikleri	6
Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan maddeler	23

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Bisfenol -A' nın fenol ve asetonan elde edilme reaksiyon	5
Şekil 2.2. Bisfenol-A' nın molekül formülü	7
Şekil 2.3. Enzimatik reaksiyon.....	8
Şekil 2.4. Michaelis – Menten grafiği	9
Şekil 2.5. Lineweaver – Burk grafiği	10
Şekil 2.6. Tirozinazın organizmada görevi.	12
Şekil 2.7. Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi	13
Şekil 2.8. Biyosensörlerin çalışma prensibi ve bileşenleri.....	14
Şekil 2.9. Glutaraldehit ile çapraz bağlama reaksiyonu..	18
Şekil 2.10. Grafit tozu ve karbon pasta uygulaması için kullanılan teflon.	19
Şekil 2.11. Grafitin molekül yapısı.	20
Şekil 3.1. Özel olarak teflondan yapılan karbon pasta elektrot.....	25
Şekil 3.2. Elektrotların yerleşimi.....	25
Şekil 3.3. MCPE hazırlanması ve çalışma hücresi şeması	27
Şekil 3.4. PAMAM-Sal-Pt(II)	29
Şekil 4.1. BFA tayini için biyosensörün çalışma şeması	33
Şekil 4.2. CPE-MCPE bisfenol A'ya duyarlılığı.....	34
Şekil 4.3. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi	34
Şekil 4.4. Biyosensörün bisfenol-A ya duyarlılığına kullanılan polimer miktarının etkisi.....	35
Şekil 4.5. Biyosensörün bisfenol-A ya duyarlılığına kullanılan glutaraldehit miktarının etkisi	37
Şekil 4.6. Biyosensörün bisfenol-A ya duyarlılığına pH etkisi.....	38
Şekil 4.7. Biyosensörün bisfenol-A ya duyarlılığına pH'nın etkisi	39

Sayfa

Şekil 4.8. Biyosensörün bisfenol-A ya duyarlılığına substrat miktarının etkisi.....	40
Şekil 4.9. Bisfenol-A biyosensörü için kalibrasyon grafiği	41
Şekil 4.10. Tirozinaz enzimi için Lineweaver – Burk grafiği	41
Şekil 4.11. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi	42
Şekil 4.12. Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi	43

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklamalar
$^{\circ}\text{C}$	Derece Celcius
g	Gram
mg	Miligram
M	Molar derişim
mM	Milimolar derişim
mL	Mililitre
mV	Milivolt
s	Saniye
dk	Dakika
nA	Nanoamper
μA	Mikroamper
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar derişim
mM	Milimolar derişim
V	Volt
Δi	Akım farkı
%	Yüzde
R²	Lineer regresyon katsayısı

Kısaltmalar**Açıklamalar****BFA**

Bisfenol-A

CPE

Karbon pasta elektrot

E

Enzim

EC

Enzim Kodu

ES

Enzim-substrat ara kompleksi

I_{max}

Maksimum akım farkı

K_i

İnhibisyon sabiti

K_m

Michealis-Menten sabiti

LC

Sıvı Kromatografi

MCPE

Modifiye karbon pasta elektrot

MS

Kütle Spektrometresi

RDS

Bağıl standart sapma

S

Substrat

SPE

Katı Faz Ekstraksiyonu

UV

Ultraviyole

V_{max}

Maksimum hız

1. GİRİŞ

Bisfenol-A ilk kez 1891 yılında sentezlenmiş bir kimyasal maddedir. Bisfenol-A günlük yaşamın her alanında kullanılan ürünlerin yapısında bulunur. Bisfenol-A plastik malzemelere sertlik, parlaklık kazandıran ve daha uzun süre dayanmasını sağlayan organik bir bileşiktir. Bisfenol-A birçok ürünün yapımında kullanılmaktadır. Bunlar; mutfakta kullanılan saklama kapları, su şişeleri, damacana, CD, DVD, çocuk oyuncakları, emzikleri, biberonları, alışveriş fişlerinde, diş dolgusu yapımında ve çeşitli ortodontik malzemelerdir. Bisfenol-A'nın tercih edilmesinin sebebi gıdaları ve içecekleri epoksi yapıştırıcısı gibi sarmasıdır. Bisfenol-A bir endokrin bozucudur ki bu doğal hormonların fonksiyonuna hareketine, transferine, salgısına ve üretimine müdahale eden bir maddedir.

Yapılan araştırmalara göre insanların bisfenol-a maddesini paketlenmiş gıda ve içeceklerden alındığı tespit edilmiştir. Bisfenol-A maddesinin ayrıca insan metabolizmasında beyin gelişimi, davranışsal değişiklikler, tiroid hormonları, obezite, erkek ve dişi üreme sistemi, meme dokusu, meme kanseri üzerinde toksik etkisinin olduğu da yapılan çalışmalar sonucunda gözlemlenmiştir (Dündar, 2014).

Yapısında fenol içeren ürünler doğal çevrede çok fazla bulunur. Bu bileşikler polimerlerin, ilaçların ve diğer organik maddelerin içinde bulunur. Ekosisteme evsel veya endüstriyel atıkların yüzeysel suya drenajı sonucu giren fenol bileşikleri çok sayıdaki bileşiğin üretimi, yıkımı ve jenerasyonu ile ilişkilidir. Andropojenik orjinli fenollerin çevrede bulunması petrol veya ilaç endüstrilerindeki kimyasal sebeplere bağlıdır. Fenoller, klor atomlarıyla reaksiyona girebilen, nitratlanabilen, metillenebilen ve alkillenebilen tehlikeli ekzotoksinlerdir (Michalowicz, 2007).

Bisfenol A dünyada yaygın olarak kullanılan kimyasallardan biridir. Bisfenol-A'nın dünyadaki üretiminin 2006 yılında 3,9 milyon tondan fazla olduğu bilinmekte ve 2010 yılında yaklaşık 5 milyon ton olacağı tahmin edilmektedir. Dünyada Almanya, Hollanda, Amerika Birleşik Devleti ve Japonya gibi ülkeler bisfenol-A açısından yüksek üretim kapasitesine sahiptir. Bu tüketimin büyük bir kısmı gıda ve içeceklerin depolandığı polikarbonat kapların yapımında kullanılan monomerlere ait olduğu belirtilmektedir (Le ve diğerleri, 2008).

Bisfenol-A'nın canlılar üzerindeki etkileri, çevreye verdiği zararlar, toksikolojik etkileri göz önünde bulundurulduğunda hayatımızın her alanında yer alan bu toksik maddenin tespit edilmesi de çok önemlidir. Örneğin her gün içtiğimiz su, plastik şişelerde bulunmaktadır ve plastik şişeden ne kadar bisfenol-A suya geçmiştir bilmiyoruz. İçme suyundaki bisfenol-A maddesi HPLC-FLD (floresan dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografi), UV, MS, floresans, elektrokimyasal yöntemleri ile birlikte gaz kromatografisi gibi yöntemlerle tayin edilmektedir (Dündar, 2014).

BFA'nın belirlenen bu sağlığa zararlarından dolayı dünya ülkeleri BFA kullanımına sınır getirmeye başlamışlardır (Sur, 2017).

Mart 2010'da Danimarka hükümeti üç yaş altı çocukların kullanabileceği tüm ürünlerde BPA'nın bulunmasını yasaklamıştır.

Temmuz 2010'da Fransa, BPA içeren tüm biberonların üretimini, ithalatını ve ihracatını durdurmuştur.

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi, 2 Eylül 2010'da BPA'nın günlük 0,05 mg/kg vücut ağırlığı düzeyinde alımının güvenli olduğunu belirtmiştir. 2011 yılında Avrupa Komisyonu yapılan birçok çalışma ışığında, BPA'nın biberonlarda kullanımına kısıtlama getirmiştir.

A.B.D.'de ise, BPA'nın yasaklanması açısından eyaletler arası farklı uygulamalar yapılmıştır. New York eyaleti 1 Aralık 2010'dan itibaren bebek biberonları, bebek bardakları ve emziklerinde BPA kullanımını yasaklamıştır.

BFA'nın kullanımı ne kadar kısıtlansa da kullanım alanlarının çok fazla olmasından dolayı hala hayatımızda yeri vardır. BFA'nın canlılar üzerindeki etkileri, çevreye verdiği zararlar, toksikolojik etkileri göz önünde bulundurulduğunda hayatımızın her alanında yer alan bu toksik maddenin tespit edilmesi de çok önemlidir.

Kullanılan yöntemlerdeki cihazlar çok pahalıdır. Bu yöntemlerin kullanılmasına karşılık daha basit ve ucuz yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu yüzden bisfenol-A tayini için daha ucuz, çabuk cevap veren, doğru ve selektif bir biyosensör tasarlamak önem arz etmektedir.

BFA tayinine yönelik literatürlerde bir çok biyosensör bulunmaktadır (Najib, 2018), (Pengyu, 2013), (Sanju, 2017), (Daodong, 2015), (Gerardo, 2005), (Portaccio, 2013).

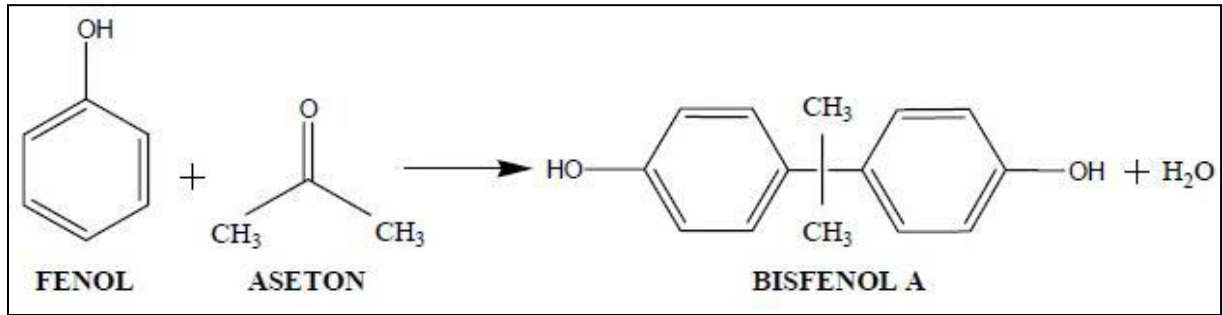
Bu çalışmada, PAMAM-Sal-Pt (II) ve tirozinaz enzimi ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrot kullanılarak amperometrik bisfenol-A biyosensörünün hazırlanması amaçlanmıştır.

BFA tayini için hazırlanan biyosensör, bu çalışma için ilk defa sentezlenmiş ve karakterize edilmiş PAMAM-Sal-Pt (II)'nin kullanılmasıyla diğer biyosensörlerden farklılık kazanmıştır. PAMAM-Sal-Pt (II) Prof. Dr. Nurşen SARI ve Dr. Elvan HASANOĞLU ÖZKAN tarafından sentezlenerek karakterize edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bisfenol-A ve Özellikleri

Bisfenol-A (BFA) genel olarak 2,2-bis (4-hidroksifenil) propan olarak bilinmektedir. İlk olarak Zincke tarafından iki mol fenolün bir mol aseton ile düşük pH' da ve yüksek sıcaklıkta kondensasyonu (yoğuşma) ile elde edilmiştir. Bisfenol-A'nın saflığı genelde %99-99,8 aralığında olmaktadır. Bu polihidrik fenol epoksi reçinelerinin üretilmesinde kullanılan epiklorohidrinli reçinedir (Dündar, (2014)).



Şekil 2.1. Bisfenol -A' nın fenol ve asetondan elde edilme reaksiyon (Dündar, 2014).

Bisfenol-A, kimyasal maddeler ile birlikte kullanılarak sert plastik yapımında kullanılan bir maddedir. Parlaklık verir, sertlik verir, daha uzun süre dayanmasını sağlar. Bisfenol-A katı, fenolik kokulu, krem-beyaz renkte, kristal yapıdadır. Dünyada, BFA en yüksek kapasiteyle üretilen ikinci kimyasaldır. Bisfenol-A suda iyi çözünen bir madde değildir. Etanol, aseton ve dimetil sülfoksit (DMSO) gibi çözücülerde daha iyi çözünmektedir. (Altuntaş, 2013).

Hemen her alanda kullanılan plastiklerin sağlığınıza ve çevreye olan etkileri merak konusu olmuştur. Plastikten yapılan maddelerde bulunan geri dönüşüm numaraları o plastiğin hangi hammaddeden yapıldığını belirtmektedir.

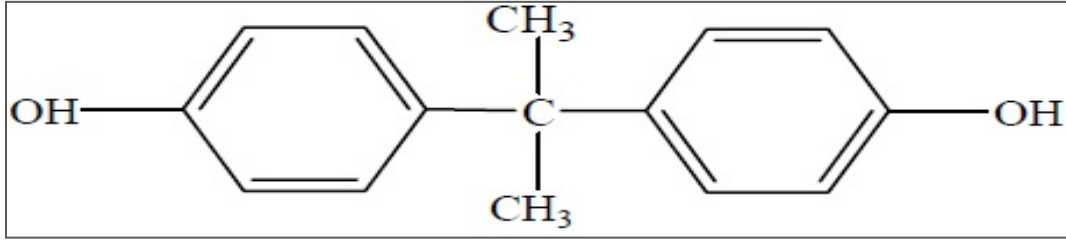
BFA bir monomer'dir ve polikarbonat plastiklerinin daha güçlü, esnek ve dayanıklı olmasını sağlamaktadır. Çizelge 2.1'den de görüldüğü gibi; üçgen döngü sembollerinde bulunan 3 ve 7 numaralı plastiklerde BFA kullanılmaktadır.

Çizelge 2.1. Plastiklerin geri dönüşüm numaraları (Altuntaş, 2013).

	Polietilentereftalatdan yapıldığını belirtir. Bu işaret su, meşrubat, sıvı yağ şişelerinin üzerinde görülür ve geri dönüşümü ile sentetik elyaf ve dolgu malzemesi olarak değerlendirileceğini gösterir.
	Kullanımının güvenli olduğu, BFA içermediği anlamına ifade eder. Bulaşık makinesinde yıkanıp, mikrodalga fırında kullanılabilir.
	Polivinilklorürden yapıldığını gösterir. Sıvı olan deterjanların, kimyasal maddelerin, kozmetik ve sağlık ürünleride kullanılan bu işaret, dönüştürüldüğünde yer karosu ve dolgu malzemesi olarak değerlendirileceğini ifade eder.
	Polietileden yapıldıklarını gösterir. Bu işaret deterjan, şampuan, çamaşır suyu, çöp torbaları, üzerinde bulunur ve geri dönüştürüldüğünde aynı türden ürünlerin yapılabileceğini ifade eder.
	Polipropilenden yapıldığını gösterir. Deterjan kutusu gibi ürünlerin ambalajlarında bulunan bu işaret geri dönüştürüldüğünde sentetik halı tabanı gibi plastik ürünlerin yapımında kullanılabileceğini ifade eder.
	Polistirenden yapıldığını gösterir ve margarin ve yoğurt kaplarının üzerinde bulunur, ambalajın geri dönüştürüldüğünde yalıtım malzemesi yapımında değerlendirilebileceğini ifade eder.
	Polikarbonatdan yapıldığını ve tablodaki plastik türlerinin dışında kalan plastiklerden yapıldığını gösterir. Bu ambalajlar, “bisfenol A”, içerir.

Çizelge 2.2. Bisfenol-A’ nın fiziksel ve kimyasal özellikleri (Staples ve diğerleri, 1998).

Molekül formülü	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Molekül kütlesi	228,29 g/mol
Kanama noktası	220 °C
Erime noktası	158 °C
Yoğunluğu	1,2 g/cm ³
Suda çözünübilirlik	120 -300 mg/L



Şekil 2.2. Bisfenol-A' nın molekül formülü (Kang ve diğerleri, 2006).

2.2. Enzimler ve Özellikleri

Enzimler canlı metabolizmasında gerçekleşen kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve reaksiyona girip hiçbir değişikliğe uğramadan reaksiyondan çıkan genellikle protein yapılı biyokimyasal katalizörlerdir (Keha, 2009).

Enzimler diğer proteinler gibi, birkaç milyon dalton molekül kütlesine sahiptir. Bazı enzimler katalizi protein yapılarıyla yerine getirebilirken, bazıları protein yapısında olmayan ‘‘kofaktör’’ denilen gruplara ihtiyaç duyarlar. Kofaktörler Fe^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} ve Zn^{+2} gibi metal iyonu olabildiği gibi, ‘‘koenzim’’ denilen kompleks organik yada metaloorganik bileşiği olabilir. Eğer bu koenzim ya da metal iyonu çok sıkı hatta kovalent olarak bağlanıyorsa ‘‘prostetik grup’’ adını alır. Bu şekilde metal iyonlarıyla yada koenzimler ile katalitik aktivite gösteren enzim ‘‘holoenzim’’ olarak adlandırılır. Bu enzimlerin protein kısmı ‘‘apoenzim’’ olarak adlandırılır (Nelson, (2005).

Enzimlerin özellikleri;

- Enzimler genellikle protein yapılı maddelerdir.
- Enzimler reaksiyonun hızını 10^6 ile 10^{16} kat arttırabilirler.
- Enzimlerin gerçekleştirdiği tepkimelerde yan ürün oluşmaz.
- Enzimler tek ya da takımlar halinde çalışırlar.
- Enzimler hücre dışında da etkindirler.
- Enzimatik tekimeler optimum pH ve sıcaklıkta daha iyi sonuç verirler.
- Enzimler tekimeden değişmeden çıkıp tekrar kullanılabilirler.
- Enzimatik tekimeler %100 verimle gerçekleşir.
- Enzimler bir maddeye ya da reaksiyona özgü olabilirler

Enzimlerin sınıflandırılması:

Oksidoredüktazlar; Yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

Transferazlar; Hidrojen dışında bir atomun veya atom grubunun bir molekülden başka bir moleküle aktarılmasını sağlayan enzimlerdir.

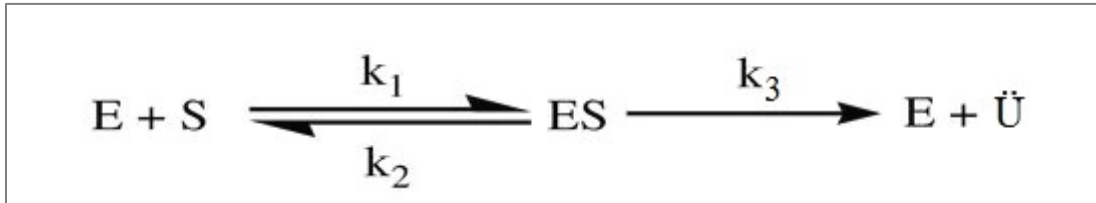
Hidrolazlar; Farklı bağlar bulunduran yapıların hidrolizini sağlayan enzimlerdir. Bu bağlara su ekleyerek koparılmasını sağlar.

Liaazlar; Su molekülü çıkarmadan C-C, C-O, C-N, C-S atomları arasındaki bağları başka bir mekanizma ile kıran enzimlerdir.

İzomerazlar; Bu enzimler ise optik ve geometrik izomerlerin rasemizasyonunu katalizler.

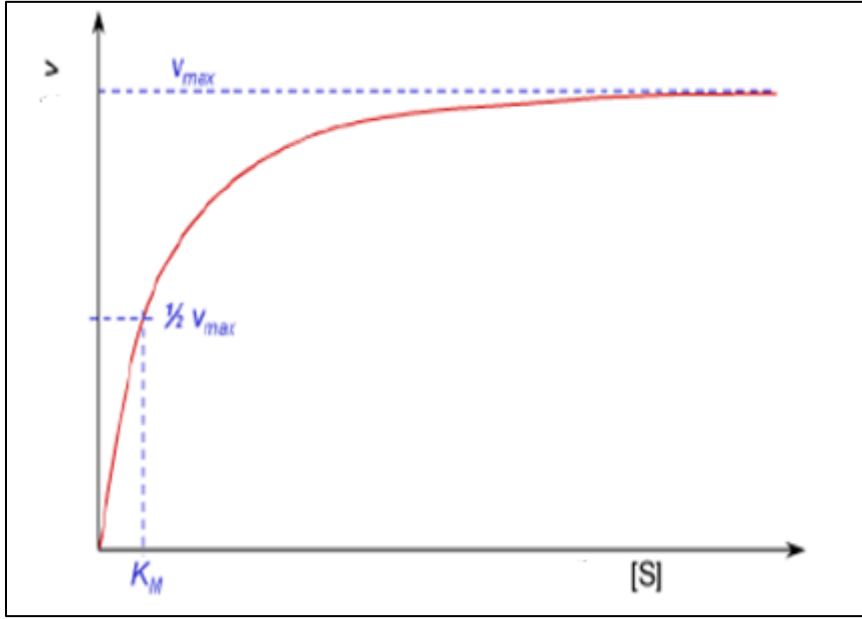
Ligazlar; Yüksek enerjiye sahip fosfatların enerjisini kullanarak substrat moleküllerinin birbirine ağırlanmasını sağlayan enzimlerdir (Türkmen, (2015).

Enzimlerin reaksiyona girdiği maddelere substrat denir. Enzimler substrat ile önce enzim-substrat kompleksi oluşturur, daha sonra oluşan kompleks ürün ve enzime dönüşür.



Şekil 2.3. Enzimatik reaksiyon

Bu ES kompleksi, E ve S' dan k_1 hızı ile oluşur; ES'nin ayrışması ise k_2 hızındaki geri reaksiyonla ve k_3 hızı ile ürün ve enzime ayrışması sonucu olur. Reaksiyon kararlı duruma gelince "Kararlı Durum İlkesi"ne göre ES'nin oluşması ayrışmasına eşitlenir ve derişimi değişmez. Michaelis-Menten 1913 yılında enzim reaksiyonları üzerinde ilk kinetik çalışmaları detaylı bir şekilde yapmıştır. Michaelis-Menten kinetiğine göre reaksiyon hızının substrat derişimine bağıllığı, başlangıç enzim derişimi sabit tutup incelendiğinde, hiperbolik bir fonksiyon ve eğri elde edilir (Şekil 2.3). Bu eğri Michaelis-Menten bağıntısı ile formülize edilir.



Şekil 2.4. Michaelis – Menten grafiği

$$V = V_{max} \cdot [S] / K_M + [S] \text{ (Michaelis-Menten bağıntısı)}$$

V_{max} : hiperbol asimtodunun y eksenini kestiği noktadır ve bu nokta maksimum hızı gösterir. Maksimum hızın yarısına ($V_{max}/2$) karşılık gelen substrat derişimi K_M (Michaelis-Menten sabiti) olarak ifade edilir. V_{max} ve K_M enzimin aktivitesini gösteren enzim sabitleridir. Michaelis-Menten grafiği doğrusal, logaritmik ve sabit olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Birinci kısımda substrat derişimi K_M den çok az olacağından bu bölgede grafik doğrusaldır. Loğaritmik olan ikinci kısımda ise oldukça büyük substrat derişiminde bir ihmal yapılamaz ve reaksiyon karışık mertebeden ilerler. Reaksiyon hızının değişmediği üçüncü kısımda ise; substrat derişimi, K_M 'den çok büyüktür.

$V = V_{max}$ olur, reaksiyon sabit hızla devam eder. Michaelis-Menten grafiği incelendiğinde hiperbolik bir eğri olduğu görülür. Hiperbolik eğriden yapılacak hesaplamalar zordur. Uygulamalarda bu zorluğu kolay halle getirmek amacı ile bu hiperbolik eğrinin bir doğru denklemi haline dönüştürülmesi gerekmektedir. Bu amaçla Michaelis-Menten grafiği aşağıda verilen Lineweaver-Burk denkleminin uygun şekilde değiştirilerek, şekil 2.4 de görülen eğri elde edilir (Lineweaver, 1934).

$$1/V = K_M/V_{max} \cdot 1/[S] + 1/V_{max} \text{ (Lineweaver-Burk denklemi)}$$

Michaelis-Menten grafiği incelendiğinde hiperbolik bir eğri olduğu görülür. Hiperbolik eğriden yapılacak hesaplamaların zorluğu açıktır. Uygulamalarda bu zorluğu kolaylaştırmak amacı ile bu hiperbolik eğrinin bir doğru denklemi haline getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla Michaelis-Menten grafiği aşağıda verilen Lineweaver-Burk denklemine uygun şekilde değiştirilerek, şekil 2.5 de görülen eğri elde edilir (Lineweaver, 1934).

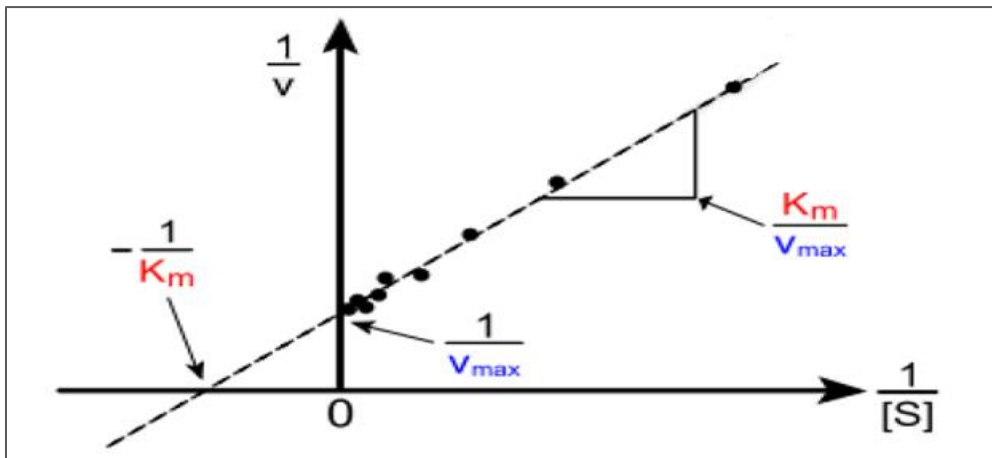
$$1/V = K_m/V_{max} \cdot 1/[S] + 1/V_{max} \text{ (Lineweaver-Burk denklemi)}$$

Bu denklemede Y ekseninde $1/V_{max}$, X ekseninde ise $1/[S]$ değerleri olmak üzere bir doğru elde edilir. Elde edilen doğrunun eğimi ise K_m/V_{max} 'tır (şekil 2.5).

Enzimlerin katalizlediği reaksiyonların hızına bazı faktörler etki etmektedir. Bu faktörler;

- Substrat derişimi
- Enzim derişimi
- pH
- Sıcaklık
- İyon şiddet
- Kofaktör derişimi
- Aktivatör ve İnhibitör derişimidir.

Bu faktörler enzimin çalışmasını farklı oranlarda etkilemektedir.



şekil 2.5. Lineweaver – Burk grafiği

2.3. Tirozinaz Enzimi

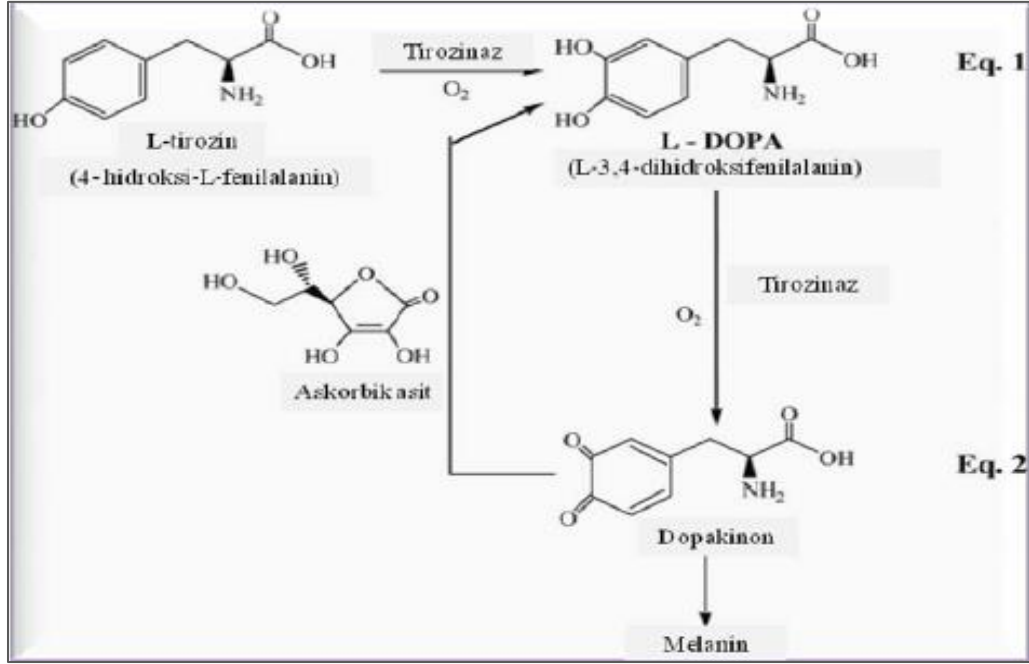
Tirozinaz, polifenol oksidaz enzimi olarak da bilinen (PPO- E.C. 1.14.18.1) bakır içeren bir monofenol monooksijenaz enzimidir. Oksidoredüktazlar sınıfına girer.

Tirozinaz mantarlarda, yüksek bitkilerde ve hayvanlarda bulunan; moleküler oksijeni kullanarak monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonunu o-difenollerinde o-kinonlara oksidasyonunu gerçekleştiren ve bakır içeren bir enzimdir. Tirozinaz bitkiler, bakteriler ve memeliler de olmak üzere çok sayıda canlı grubunda bulunan bir enzimdir (Vamos, 1981). İlk olarak Schoenbein tarafından 1856 yılında mantarlarda olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra birçok meyve ve sebzedede tirozinaz enziminin varlığı tespit edilmiştir (Keleş, 1987).

Tirozinazlar, bitkilerin mikrobiyal ya da viral enfeksiyonlara karşı direnç göstermesinde oldukça önemli role sahiptir. Ayrıca, bitkilerin muhtemel elverişsiz iklim koşullarına karşı dayanıklı olmalarının bir sebebi de tirozinazların varlığıdır. Gıda teknolojisi bakımından tirozinaz önemli bir enzimdir. Tirozinaz enziminin bulunduğu bazı gıdalar; çay, alıç, patlıcan, ananas, çilek, enginar, elma, olarak sayılabilir. Bitkilerdeki tirozinaz miktarı türüne, yaşına ve olgunluğuna bağlıdır. Tirozinaz ve polifenoller bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır. Bunun dışında çeşitli mikroorganizmalarda özellikle mantarlarda ve bazı hayvansal organizmalarda da bulunabilir. Ayrıca tirozinaz enzimi yaklaşık 120 kD moleküler kütlesine sahip bir tetramerdir (Vamos, 1981).

Tirozinazların memeliler ve bitkilerde de çok fazla bulunduğu belirlenmiştir. Bitkide bulunan tirozinazın bazı meyve ve sebzelerde istenmeyen kararar reaksiyonlarını gerçekleştirdiği görülmektedir (Mayer, 1987). Memeli tirozinazları ise deri, saç ve gözlerde yerleşen yüksek derecede özelleşmiş hücrelerde ve pigment üreten melanositlerde bulunmaktadır. Böylece ultraviyole radyasyon yaralanmasına karşı koruyucu bir etkiye sahip olan melaninin oluşmasında da rol alan anahtar enzimlerdir (Prota, 1976).

Tirozinaz enzimi memeli organizmalarında L-tirozinden L-dopa oluşmasını daha sonrada dopakinon oluşumunu katalizler (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Tirozinazın organizmada görevi (Aytan, 2009).

Enzimatik esmerleşme reaksiyonları sebze, meyve ve tahıllarda doğal olarak bulunan genellikle polifenol oksidaz enziminin neden olduğu bir oksidasyon reaksiyonudur. Normal şartlarda enzim hücre içerisinde oksijenle temas etmez. Ancak, meyve veya sebze kesilip, zedelenirse enzim hücre dışına çıkar ve moleküler oksijen varlığında bazı fenolik bileşiklerle reaksiyona girerek renkli bileşikler oluşturur. Enzimatik esmerleşme reaksiyonları gıdalarda renk, tat ve besin kalitesini azaltarak gıdanın ekonomik değerinin düşürmesine sebep olur.

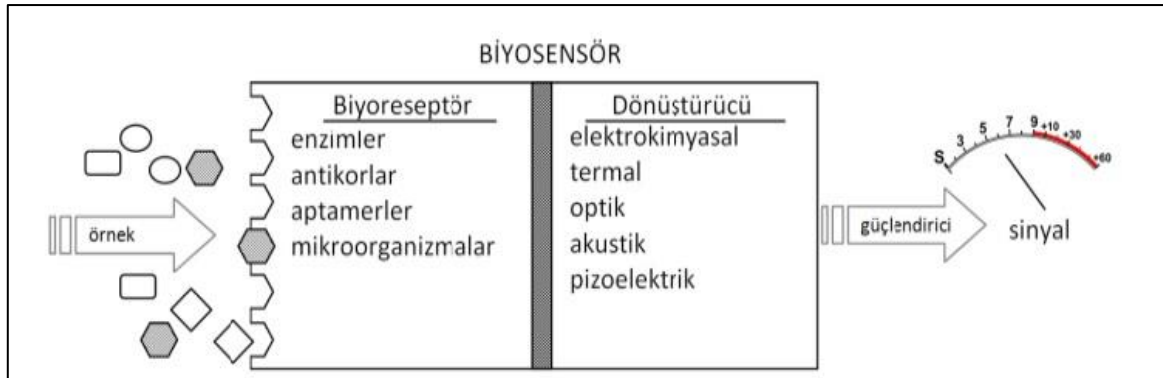
Tiroziyaz enzimi mantar, alıç gibi meyve ve sebzelerden saflaştırılmıştır (Bilgin, 2018; Türkan, 2018)

2.4. Biyosensörler

Biyosensörler algılayıcı ve dönüştürücü olarak biyolojik elemanların bir kombinasyonunu bulunduran cihazlar olarak tanımlanabilir. Biyosensör biyokimyasal bir sinyali yapısında bulunduran dönüştürücü ile ölçümlerini gözlenebilir elektrik sinyaline dönüştürür ve öğrenilmek istenen maddenin belirlenmesinde kullanılır.

Biyosensör tasarlama düşüncesi ilk olarak doğadaki biyolojik canlıların özellikleri düşünülerek tasarlanmıştır (Shimomura, 2009). Örneğin, doğada yaşayan bazı canlıların koku duyusunun çok iyi olması binlerce koku arasında bazı kokuları çok iyi bir şekilde ayırabilmeleri, bazı

hayvanların sesleri çok iyi duyabilmesi gibi yüzlerce örnek verilebilir. Dünyada ilk biyosensör çalışması olarak, 1911 yılında kömür madenlerindeki zehirlenmelere karşı insanlardan daha duyarlı olup daha önce önlem alınmasına sebep olan kanaryaların kullanılması kabul edilebilir (Aykut, 2006). Canlılar da doğal olarak bulunan bu reseptörler bilimle uğraşan kişiler tarafından incelenerek biyosensör için çalışmalar yapılmaya başlamıştır.



Şekil 2.7. Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi (Chambers, 2008).

Biyosensörler ortamdaki değişimlerden yararlanarak fiziksel veriler elde ederler. Biyosensörler analit (analizi yapılan madde ya da materyal), biyolojik algılayıcılar (enzimler, antikorlar, nükleik asitler, mikroorganizmalar, hücreler, dokular gibi algılayıcılardır.) ve dönüştürücüler (elektrodlar, transistörler, termistörler, optik fiberler, piezoelektrik kristaller) olmak üzere üç kısımdan oluşur. Biyosensörlerin çalışma prensibi bu şekildedir (Velasco, 2003).

Günümüzde biyosensörler çalışmaları sürekli gelişmektedir. Bu çalışmaların artmasının yaygınlaşmasının sebebi uygulama alanları çok, boyutları küçük, ucuz olması ve kısa sürede doğru sonuçlar vermesidir (Nice, 1999; Mulchandani, 1995).

2.4.1. Biyosensörlerin çeşitleri

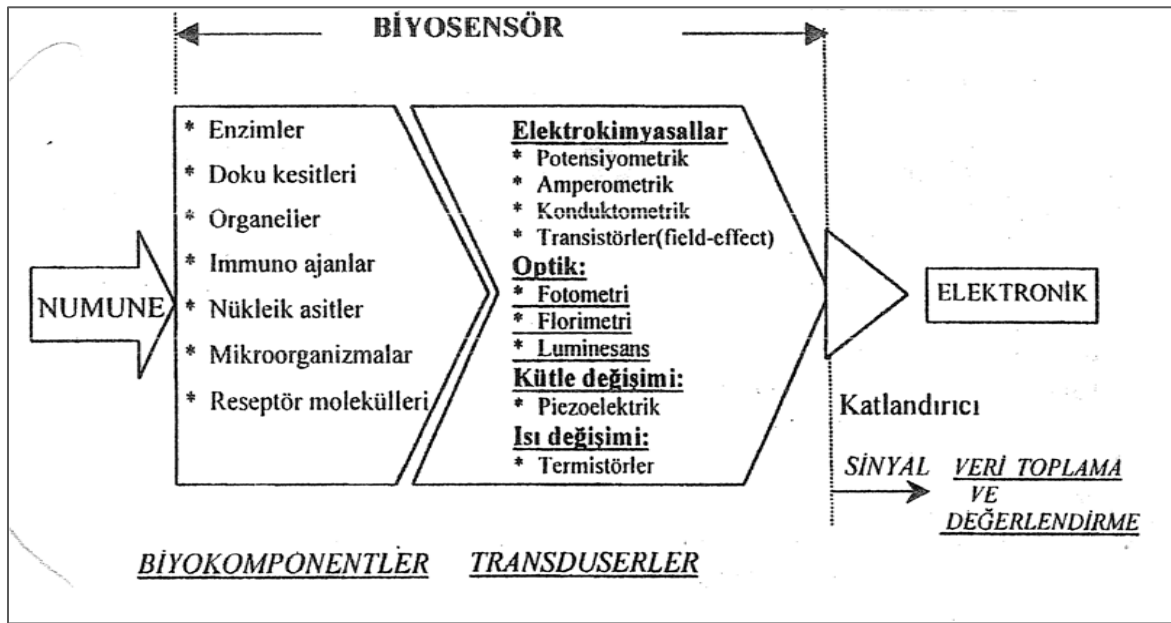
Elektrokimyasal biyosensörler; Potansiyometrik, Konduktometrik, Amperometrik esaslı olmak üzere üç tanedir.

Optik Biyosensörler; fiber optik ve lazer teknolojilerindeki ilerlemeler sonucu yapılan biyosensörlerdir.

Kalorimetrik Esaslı Biyosensörler; Termistörlerdir (Türkmen, 2015).

2.4.2. Biyosensörlerin yapısı

Biyosensörlerin biyobileşen (reseptör), dönüştürücü (transducer) olmak üzere iki tane bileşeni bulunur. Reseptörler, biyolojik yapıya sahip oldukları için biyoreseptör olarak bilinirler, analiti algılayabilirler ve onları seçerek etkileşirler. Dönüştürücü (Transducer) ise; etkileşim sonunda gözlenen sinyalleri cevabını belirlenebilir bir elektriksel sinyale dönüştüren sistemler olarak tanımlanabilir (Scott, 2012). Elektronik cihaz bölümünün görevi ise tayin edilecek madde ve enzimin teması ile oluşan sinyal cevabını elektrik sinyaline çevrildiğinde, gözlenen bu sinyali bizlere göstermektir (Yavuz, 2005).



Şekil 2.8. Biyosensörlerin çalışma prensibi ve bileşenleri (Velasco, 2003).

Biyosensörlerin yapısında bulunan biyoreseptör ve transducer seçimi ve onların uyumu önemlidir. Kullanışlı sağlıklı cevap veren bir biyosensör yapılabilmesi için aşağıdaki verilen maddeler göz önünde bulundurulmalıdır (Stetter, 2002).

- Kullanılan enzimin analite karşı ilgisi çok yüksek olmalıdır, normal saklama koşullarda stabilite göstermeli ve analizler arasındaki değişkenliği az olmalıdır.

- Tepkimenin gerçekleştiği ortamda karıştırma, pH ve sıcaklık gibi fiziksel niceliklerden etkilenmemeli ve bağımsız olmalıdır.
- Biyosensörün verdiği cevap kesin, duyarlı, tekrarlanabilir ve lineer olmalı ve başka etkilere karşı reaksiyon göstermemelidir.
- Analiti tanıyacak biyobileşen kullanılmalıdır.

2.4.3. Biyosensörlerin uygulama alanları

Biyosensörler birçok alanda kullanılmaktadır bunlar başlıca; biyoteknolojik uygulamalarda, klinik analizlerinde, hastalık teşhisinde, genel sağlık taramalarında, veterinerlikte, endüstriyel proseslerin kontrol edilmesinde, çevre kirliliğinin kontrolünde, tarım ve ziraat uygulamalarında, ilaç üretim ve geliştirilmesi, gıda endüstrisinde, askeri alanlarda kullanılmaktadır. Günümüzde en yaygın olarak kullanılan biyosensör enzim sensörleridir. Bu enzim biyosensörlerini şeker hastalarının kullandıkları şeker ölçüm cihazları gibi günlük hayatımızda çok rahat görebiliriz (Lucadou, 1988; Pan, 2010).

2.5. Enzimler ve Enzim Temelli Biyosensörler

Enzimler, optimum şartlar dahilinde biyolojik yapıdaki reaksiyonların gerçekleşmesini sağlayan ve genellikle protein yapılı biyokatalizörlerdir. Enzimler, görevlerini gerekli şartlar sağlandığında doğal ortam harici olarak, gıda sektörü, kimyanın çeşitli dallarında, biyoteknoloji argesinde ve tekstil endüstrisi gibi birçok farklı alanda kullanılmaktadır (Bodur, 2019).

Enzimlerin kullanıldığı biyosensörlerin diğer biyosensörlerden farklı olan özelliği biyobileşen olarak enzimlerin kullanılmasıdır. Elektrokimyasal biyosensörler; amperometrik, potansiyometrik ve yarı iletken esaslı enzim sensörleri olmak üzere üç türdür.

Amperometrik biyosensör; belirli potansiyeldeki akım şiddetinin ölçülmesini esas alan bir yöntemdir. Sistem üç elektrottan medana gelmektedir bunlar; çalışma elektrodu, referans elektrot ve karşıt elektrottur. Ölçülen akım çalışma elektrodunda yükseltgenen veya indirgenen türün derişiminin bir fonksiyonu olarak kaydedilir. Daha sonra kalibrasyondan, akım değeri kullanılarak maddelerin derişimleri belirlenebilir

Potansiyometrik biyosensör; çalışma ile referans elektrodu arasındaki potansiyel farkının ölçümüne dayalı bir yöntemdir. Elektrot potansiyeli doğrudan analitin derişimini belirler.

Yarı iletken esaslı enzim biyosensör; Temel sensör sistemi olarak esas aldığı türler; metal oksit yarı iletken alan etkili transistörler veya iyon duyar alan etkin transistörler olan bu enzim sensörleri, enzimle birlikte alan etkin transistörlerin birleştirilmesini ifade eder biçimde enzim alan etkili transistör olarak isimlendirilir (Dinçkaya, 1999).

2.6. Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemi

Biyobileşen ile iletimi gerçekleştiren unsurun birleştirilmesinde farklı immobilizasyon yöntemleri kullanılabilir. Kullanılacak yöntemler biyoaktif bileşene iletimi sağlayan maddeye göre değişim gösterebilir. Biyoaktif bileşen sensör olarak bildiğimiz kısım üzerine jel içerisinde, fiziksel olarak veya polimer matrikste tutuklanabilir, elektrot yüzeyinde biriktirilebilir, çapraz ya da kovalent bağlanarak immobilize edilebilir (Palüzar, 2013).

Enzimlerin immobilizasyonunda kullanılan başlıca 5 tane yöntem vardır.

Kovalent bağlama: Algılayıcıların taşıyıcı yüzeyine kimyasal reaksiyon sonucu kovalent olarak bağlanmasıdır. Bağlanma çok yumuşak koşullarda yapılmalıdır. Kovalent bağlanma enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar (karboksil, amino, sülfidril, tiyoester imidiazol) üzerinden gerçekleşir (Altıkatoğlu, 2007). Enzimin kovalent olarak bağlanmasında bazı aktivite kayıpları yaşanabilir. Bunların başlıca sebepleri; sterik engel, difüzyonun sınırlandırılması ve yapısal değişikliklerdir (Zhu, 2011).

İyonik bağlama: Bu yöntem iyon değiştirme özelliğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılarla enzimin iyonik bağlanmasını temel alır. İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleşerek enzimin aktif merkezinde değişikliğe sebep olmaz. İyonik bağlanma kovalent bağ kadar kuvvetli olmadığından uygulama sırasında enzimin yüzeyden kaçışı sorun olmaktadır (Altıkatoğlu, 2007).

Çapraz bağlama: Enzimler çapraz bağlayıcı ve ya fonksiyonel gruplar ile çapraz bağlar oluşturarak suda çözünmeyen yapılar oluştururlar. Çapraz bağlayıcı reaktifler ise glutaraldehit, heksametilen, diizo siyanat, diflorodinitro benzendir. En çok kullanılanı ise

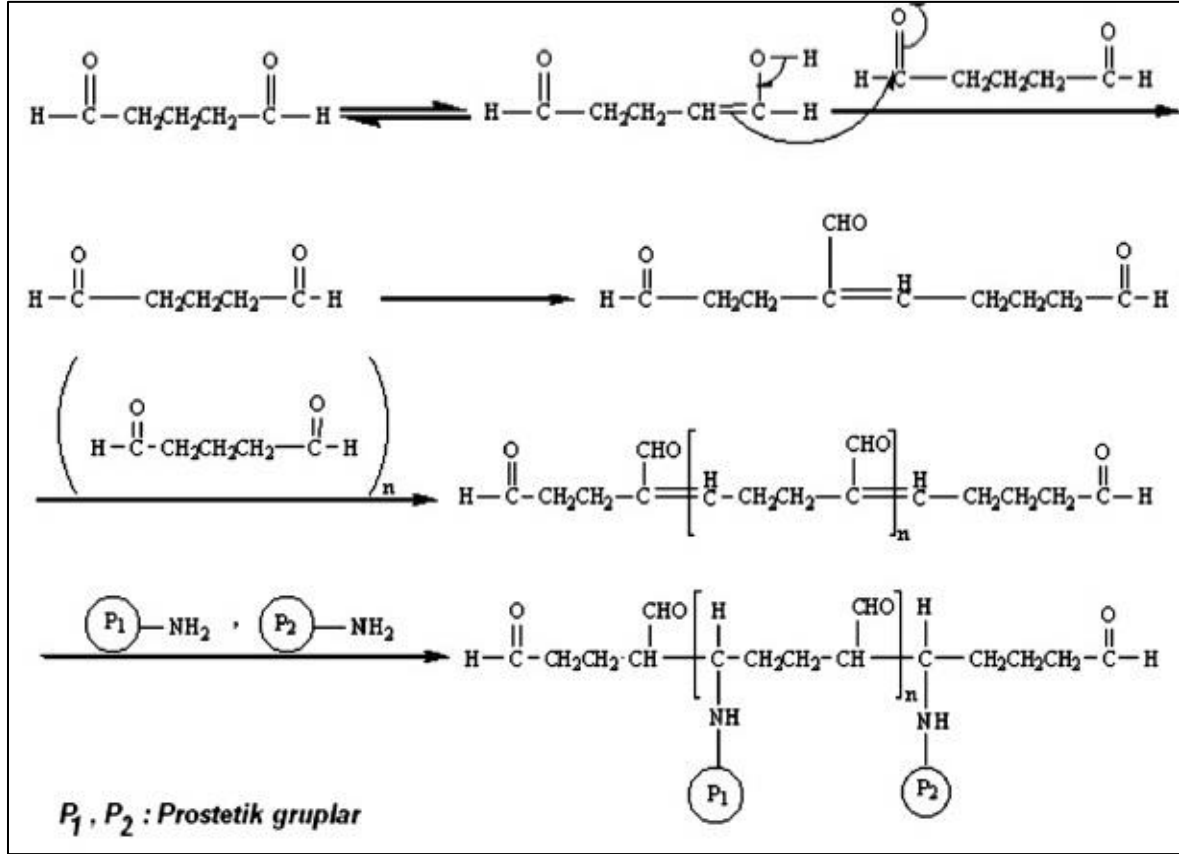
glutaraldehittir. Çapraz bağlama reaksiyonu çok yumuşak koşullarda olmadığı için aktivite kayıpları olabilmektedir (Telefoncu, 2012).

Adsorpsiyon: Bu metot immobilizasyon yöntemleri içerisinde en basit metottur. Enzim yüzey aktif maddenin yüzeyine fiziksel olarak adsorbe edilir. Enzimin adsorbente bağlanmasında etkin olan vander walls kuvvetleridir. Bu yöntemin; immobilizasyonu basit olması, enzim immobilize oluyorken ayrılması ve saflaştırılması mümkün olması, enzimin adsorpsiyon olurken genelde deaktive olmaması, adsorpsiyonun dönüşümlü bir proses olması gibi avantajları bulunmaktadır. Zayıf bağlanmanın olması, çözeltinin pH'sına, sıcaklığına ve iyonik kuvvetine bağımlı olması gibi dezavantajları vardır (Türkmen, 2015).

Tutuklama: Enzim belirli bir yerde durmaya zorlanarak bulunduğu ortamdan dışarıya çıkamaz hale getirilmesidir. Tutuklama polimer matriks içindeki kafeslerde veya yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ile yapılabilir (Altıkatoğlu, 2007).

Bu yöntemlerle enzim kimyasal bir değişime uğramadığından yöntem çok büyük bir avantaja sahiptir. Bu nedenle enzimin kendine özgü özellikleri değişmemektedir. Ancak enzim jel matrikslerde deaktive olabilmektedir. Enzimlerin kaçışı da bir problemdir.

Biyosensör sistemleri içinde en çok kullanılan biyobileşen çeşidi enzimlerdir. Enzimin immobilizasyonu, enzim biyosensörü tasarlama aşamasında en önemli basamaklardandır. Enzim veya protein yapısında olan biyoaktif özellik gösteren bileşenlerin kovalent bağlama ile immobilizasyonu için önemli olan glutaraldehit yardımı ile çapraz bağlama reaksiyonu tabloda gösterildiği gibidir;



Şekil 2.9. Glutaraldehit ile çapraz bağlama reaksiyonu (Palüzar, 2013).

2.7. İmmobilize Enzimlerin Serbest Enzimlere Göre Üstünlükleri

Enzimler immobilize edildikten sonra daha üstün niteliklere sahip olurlar. Enzimler elektrot yüzeyine yüksek aktivite ile ince tabaka içerisine yerleştirilmesi fiziksel olarak ya da kovalent ve kovalent olmayan metotlarla gerçekleştirilir.

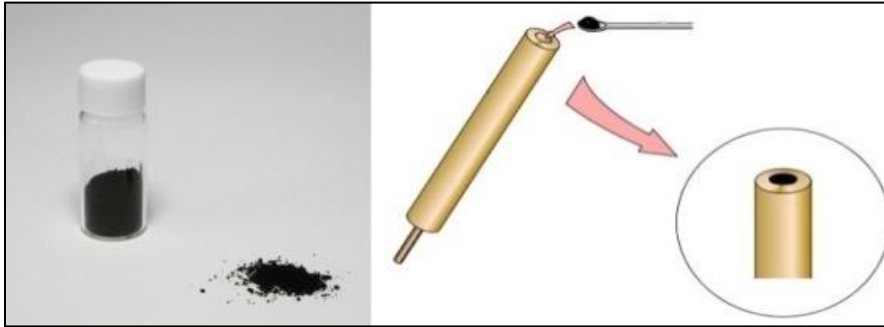
İmmobilize enzimin serbest enzimlere göre üstünlükleri;

- Uzun süre kullanım imkanına sahiptir.
- İmmobilize enzim, pH, sıcaklık gibi çevre koşullarına karşı dayanıklı ve kullanışlıdır.
- Sürekli olarak kullanılabilir.
- İmmobilize enzim ile ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Daha fazla kararlılığa sahiptir.
- Enzimlerin kendini parçalayıp yok etme olasılığını ortadan kaldırır.
- Kademeli bir şekilde ilerleyen reaksiyonlar için daha kullanışlıdır.
- Serbest enzimden daha yüksek aktivite gösterebilirler (Bodur, 2019).

2.8. Karbon Pasta Elektrotlar

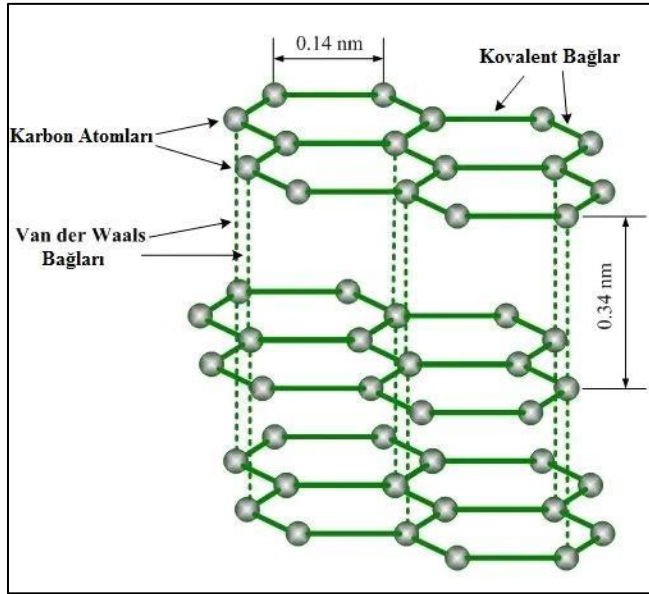
Bu elektrotlar karbon temelli elektrotlar içinde en yaygın kullanım alanına sahip elektrotlardır. Adams ve ekibi tarafından karbon damla elektrot oluşturmak için çalışmalar yapılırken geliştirilen karbon pasta elektrotlar, grafit tozu ile iletkenlik göstermeyen organik bir sıvının belli oranlarda karıştırılması ile elde edilir (Erdem, 2012). Karbon pasta elektrotlar, inorganik ve organik materyaller ile modifiye edilmek suretiyle çeşitli alan ve şekillerde kullanılabilir (Yalvaş, 2014).

Yaygın olarak kullanılan bu elektrot çeşitleri şu şekilde sıralanabilir; camı karbon ve karbon pasta elektrotlar, karbon nanotüpler içeren elektrotlar, platin, altın, gümüş, bizmut gibi metallere oluşan elektrotlar ve kompozit elektrotlardır (Yalvaş, 2014). Bunlar; geniş potansiyel aralığı ile geniş çalışma aralığına sahip olması, düşük direnç, düşük artık akım ve tekrarlanabilir yüzey yapısına sahiptir. Karbon pasta elektrotlar (CPE); grafit tozunun mineral yağı (Nujol) gibi adlandırılan organik sıvı yardımıyla karılması ve pasta haline getirilmesi ile hazırlanır. Daha sonra bu karbon pasta, bir teflon ya da cam tüp içine sıkıştırılarak yerleştirilir. Elektriksel akımı iletmek içinse iletken bir tel kullanılmaktadır.



Şekil 2.10. Grafit tozu ve karbon pasta uygulaması için kullanılan teflon (Bodur, 2019).

Yapılan elektrotlarda en fazla kullanılan karbon türü toz halinde olan grafitir. Bunun sebebi ise grafit tozunun büyük orandaki saflığı, soğurma kapasitesinin düşüklüğü ve mikron boyutlarda olmasıdır (Bodur, 2019).



Şekil 2.11. Grafitin molekül yapısı (Bodur, 2019).

2.9. Kaynak Araştırması

Gerardo R. Marchesini fare ve tavşandan aldıkları antikorları yükselterek çip yüzeyine yerleştirmiş bisfenol-A tayini için bir biyosensör hazırlamışlardır. Hazırladıkları biyosensör ile gerçek su numunelerinde bisfenol-A'yı tespit etmişlerdir. Yapılan biyosensör ile su numunesinde 0,5-50 $\mu\text{g/L}$ gibi düşük miktarda bisfenol-A tespiti gerçekleştirmişlerdir bu da hazırladıkları biyosensörün düşük tayin sınırının olduğunu göstermektedir (Gerardo, 2005).

Ramiz S.J. Alkasir ve arkadaşları, ilk kez manyetik nikel nanoparçacıklarını kullanarak farklı bir enzim-fonksiyonel nanoparçacık elektrokimyasal biyosensör geliştirmişlerdir ve bisfenol-A'nın tespiti için kullanmışlardır. Bu hazırladıkları biyosensörün analitik performansını yine kendi tasarladıkları aşağıdaki örnekleri ile karşılaştırmışlardır. Demir oksit ve altın nanoparçacıkları üzerinde yaptıkları biyosensörün bisfenol-A'ya yanıt süresinin 30 saniyeden az olduğunu gözlemlemişlerdir. Lineer aralık tespiti için yaptıkları denemelerde nikel için $9,1 \times 10^{-8}$ - $4,8 \times 10^{-5}$ M, demir oksit için $2,2 \times 10^{-7}$ - $4,0 \times 10^{-5}$ M ve altın için $4,2 \times 10^{-8}$ - $3,6 \times 10^{-5}$ M olduğunu tespit edilmişlerdir. Sonuçları değerlendirdiklerinde en geniş ve en uygun lineer aralığın ayrıca en yüksek hassasiyesin nikel kullanıldığında olduğu görülmüş ve bu sonuçlar nikel nanoparçacıkların başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir (Ramiz, 2010).

M. Portaccio ve arkadaşları, biyonano kompozit (lakkaz-tiyonin-karbon siyahı) ile modifiye edilmiş bir biyosensör hazırlayıp tiyonin karbon siyahı yüzeyine fiziksel adsorpsiyon ile lakkazın immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve bisfenol-A tayini için biyosensör hazırlamışlardır. Hazırlanan biyosensörün optimum çalışma pH'sını 4,5, potansiyelini -0,2 V, lineer aralığını 0,5-50 μM , hassasiyetini 0,1nA/ μM tayin sınırını 0,2 nM olarak tespit etmişlerdir (Portaccio, 2013).

Pengyu Sun ve Yunhua Wu camı karbon elektrot üzerine hidrojel film kaplayarak biyosensör hazırlamışlardır ve bisfenol-A'nın oksidasyonunu siklik voltametri ile inceleyerek yapılan deneylerde film biyoaktivitesini korumuş, oksijenin azaltılmasını katalize etmiş ve eklenen hava içinde çözünmüş oksijen azalması bisfenol-A substratına etki ettiğini tespit etmişlerdir. Hazırlanan biyosensörün çalışma pH'sını 7,0, potansiyelini -0,427 V, kalibrasyon aralığını 1,25-10,0 M, hassasiyetini 18,21 nM, K_m değerini ise 3,90 μM olarak tespit etmişlerdir (Pengyu, 2013).

Daodong Pan ve arkadaşları araştırmalarında dağılma özelliğine sahip grafene, altın katarak grafen-altın nanoparçacık kompozit malzeme hazırlamışlardır. Bu hazırlanan kompozit malzeme ile tirozinaz enzimi kullanılarak bir biyosensör oluşturmuşlardır ve bisfenol-A tayini yapmışlardır. Yaptıkları enzim biyosensörünün çalışma pH'sını 7,0, potansiyelini -0,47 V, lineer aralığını $2,5 \times 10^{-3} - 3,0 \mu\text{M}$ tayin sınırını 1 nM olarak tespit etmişlerdir. Hazırladıkları biyosensörün ayrıca yüksek tekrar kullanılabilirlik faktörüne (BSS %2,7) sahip olduğunu gözlemlemişlerdir (Daodong, 2015).

Derya Şenaslan tirozinaz enzimi kullanarak hazırladığı biyosensörde yaptığı deneyler ile kinonun indirgenmesini incelemiş ve kinonun en iyi indirgendiği potansiyeli -0,15 V, pH değerini 8,0, sıcaklığı 45 °C, tayin sınırını $1,0 \times 10^{-7}$ M, K_m değerini $1,04 \times 10^{-3}$ mM, tekrarlanabilirlik deneyinde 35 günün sonunda amperometrik cevabının % 47,0'ını koruduğunu, 15 ölçüm sonunda bağıl standart sapmasını % 2,75 olarak tespit etmiştir (Şenaslan, 2017).

Sanju Gupta ve arkadaşları, grafen arasında rezonans enerji transferine dayalı algılama oksit kullanılmış ve florensla etiketlenmiş bisfenol-A ya özgü aptamer tek sarmallı DNA kovalent olmayan montaj ve özel adsorpsiyon, floresan söndürülmesi, DNA emisyonu arasında örtüşmesi ile gerçekleşmiş ve soğurma spektrumuna dayalı verimli bir bisfenol-A

tayini için biyosensör hazırlamışlar. Yaptıkları çalışmada optimum pH'yı 8,2, sıcaklığı 40 °C reaksiyon süresini 25 dk, bisfenol-A konsantrasyonu 50 pg/ml - 100 ng/ml arasında düşük bir saptama aralılığı elde etmişlerdir (Sanju, 2017).

Najib Ben Messaouda ve arkadaşları bisfenol A tayini için camı karbon elektrot üzerine tirozinaz enzimini immobilize ederek basit bir biyosensör geliştirilmişlerdir. Yapılan biyosensörün optimum çalışma pH'sını 7,5, potansiyelini -0,5 V, tayin sınırını 1,0 nM olarak belirlemişlerdir. 18 günlük bir süre boyunca biyosensörün aktivite tayini gerçekleştirilmiş ve biyosensörün bu süreç sonunda aktivitesinin %65'ini koruduğunu tespit edilmişlerdir (Najib, 2018)

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan maddeler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan maddeler

Kimyasal Madde	Temin Edilen Üretici Firma
Grafit tozu	Merck
Mineral yağ	Sigma
Bisfenol-A ($C_{15}H_{16}O_2$)	Sigma
Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	Merck
Monosodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4)	Merck
Glisin ($C_2H_5NO_2$)	Sigma
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck
Fenol (C_6H_5OH)	Merck
Gluteraldehit ($C_5H_8O_2$)	Aldrich
Sığır serum albümin (BSA)	Sigma
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich
Asetik asit (CH_3COOH)	Merck
Tirozinaz enzimi (Mantardan saflaştırılmıştır)	Fluka
Asetik asit (CH_3COOH)	Merck
Potasyum nitrat (KNO_3)	Sigma-Aldrich
Metil alkol (CH_3OH)	Sigma
Etilasetatın ($C_4H_8O_2$)	Sigma-Aldrich
Nitrofenol ($C_6H_5NO_3$)	Merck
Üre (CH_4N_2O)	Sigma

3.2. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler

Bisfeno-A çözeltisi, Bisfenol-A’dan 0,0229 g alınarak pH 7,0 olan fosfat tamponu ile %60’lık metanol çözeltisinde çözülerek 10 ml 0,01 M ‘lık stok çözelti hazırlandı. Günlük kullanılmak üzere stok çözeltiden alınarak istenilen derişimler de seyreltilerek kullanıldı.

Fosfat tamponu: Monosodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) ve disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) hazırlanacak tamponun pH değerine göre hesaplanan miktarlarda tartılarak saf su da çözüldü daha sonra hazırlanan çözeltinin pH’sı istenilen değere gelinceye kadar 0,1 M NaOH ilave edildi. Tampon çözelti +4 °C’de buzdolabında saklandı.

Glisin tamponu: Glisin ve NaOH hesaplanan miktarlarda saf suda çözüldü, hazırlanan tampon çözeltinin pH'sı istenilen değere gelinceye kadar 0,1 M NaOH ilave edildi. Tampon çözelti +4 °C'de buzdolabında saklandı.

Enzim çözeltisi: Aktivitesi 5244 ünite/mg olan tirozinazdan (mantardan saflaştırılmış) 3,0 mg alınıp toplam hacmi 2,0 mL olacak şekilde pH 7,0 fosfat tamponu ile seyreltildi ve her biri 0,5'er mL lik çözeltiler halinde deney tülerine alındı. Deney sırasında kullanılacak olan enzim çözeltileri buzdolabında saklandı, uzun süre kullanılmadığı durumlarda ise derin dondurucuda muhafaza edildi.

Asetik asit- asetat tamponu: Sodyum asetat hesaplanan miktarda tartılarak saf suda çözüldü, hazırlanan çözeltinin pH'sı istenilen değere gelinceye kadar 0,1 M CH₃COOH ilave edildi. Tampon çözelti +4 °C'de buzdolabında saklandı.

Sodyum hidroksit çözeltisi: Sodyum hidroksitten hesaplanan miktar kadar alınıp saf suda çözülerek kullanılmak üzere hazırlandı.

Glutaraldehit çözeltisi: %25'lik glutaraldehit çözeltisi önce %5,0'lik glutaraldehit çözeltisine seyreltildi. Daha sonra %5,0'lik glutaraldehit çözeltisinden %2,5'luk glutaraldehit çözeltisi yine aynı şekilde seyreltilip hazırlandı, buzdolabında muhafaza edildi.

3.3. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

3.3.1. Elektrokimyasal analiz cihazı

Bütün elektrokimyasal deneyler bilgisayar bağlantılı olarak çalışan CHI firmasının 1230-B modeli elektrokimyasal analiz cihazı kullanılarak yapıldı.

3.3.2. Hücre ve elektrotlar

Amperometrik ölçümler, üç elektrodu bulunan hücre sisteminde gerçekleştirildi. Çalışma elektrodu olarak 0,5 cm çapındaki (teflondan özel olarak imal edilmiş) karbon pasta elektrot, referans elektrot olarak BAS RE-5B no'lu Ag/AgCl ve karşıt elektrot olarak MW-1032 no'lu platin tel kullanıldı. Çalışma elektrodu her elektrokimyasal çalışma sonrası çalışmanın

ilerleme basamaklarına bağılı olarak saf su ya da çalışılan tampon çözelti içerisinde +4 °C'de muhafaza edildi.



Şekil 3.1. Özel olarak teflondan yapılan karbon pasta elektrot



Şekil 3.2. Elektrotların yerleşimi

3.3.3. pH metre

Hazırlanan tampon çözeltiler ORİON model ile ölçüldü.

3.3.4. Su banyosu

Isıtma, soğutma ve su sirkülasyonu bulunan termostatlı Grant GD120 marka su banyosu kullanıldı.

3.3.5. Mikro pipet

10,0 µL-1000,0 µL çözeltilerin hücre içerisine ilaveleri ve çözelti hazırlanırken Brand marka $\pm 0,05$ µL hassasiyeti olan mikropipetler kullanıldı.

3.3.6. Saf su cihazı

Bütün deneylerde kullanılan çözeltiler, GFL marka saf su cihazından sağlanan saf su ile hazırlanıp kullanılmıştır.

3.4. BFA Biyosensörünün Hazırlanması ve En İyi Koşulların Belirlenmesi

Hazırlanan biyosensörün en iyi çalışma koşullarını belirlemek için biyosensörün bisfenol-A'ya duyarlılığı, çalışma potansiyeli, pH etkisi, kullanılan polimerin miktarı, sıcaklık etkisi, girişim, gluteralehit miktarı, bisfenol-A derişimin etkisi, tekrar kullanılabilirlik ve raf ömrünün belirlenmesi için deneyler yapılarak biyosensörün en iyi çalışma koşulları belirlendi.

3.4.1. Çalışma elektrodun hazırlanması: Karbon pasta elektrot (CPE), modifiye karbon pasta elektrot (MCPE) hazırlanması

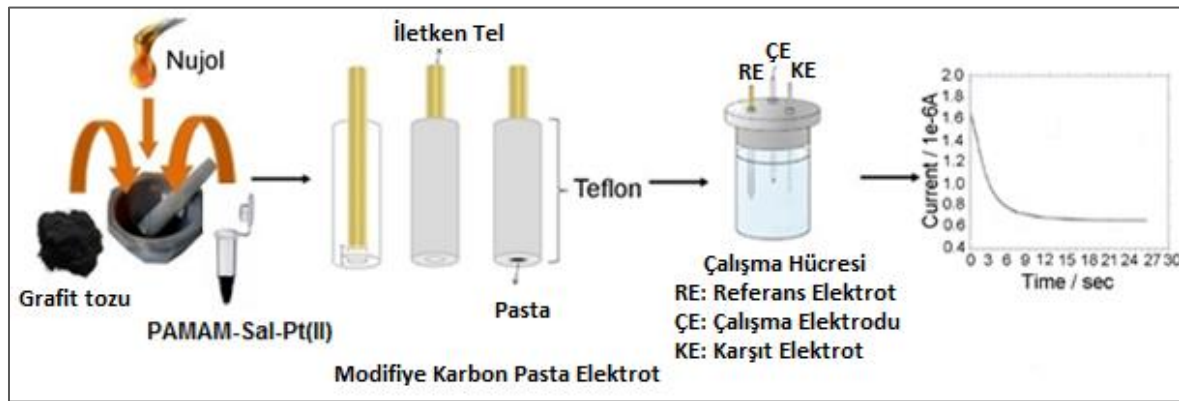
Çalışma yapılacak karbon pasta elektrot ilk olarak saf su ile temizlendi. Çalışma için hazırlanan karbon pasta elektrot içeriğindeki miktar sabit olacak şekilde (0,142 g) hassas terazi kullanılarak grafit tozu tartılıp saat camı üzerine alındı. Üzerine bir arada tutma özelliği olan mineral yağ (nujol) sabit hacimde (95 µl) olacak şekilde mikro pipet ile alınıp grafit tozu üzerine ilave edildi. Grafit tozu ve mineral yağ birbiriyle karılıp uygun bir kıvam alıncaya kadar bu karma işlemine devam edildi. Daha sonra karbon pasta, elektrot içindeki boşluğa madde kaybı olmayacak şekilde cam çubuk yardımı ile dolduruldu. Doldurma işlemi tamamlandıktan sonra karbon pasta elektrot yüzeyinin düz, pürüzsüz olması için özel bir ped

kullanılarak elektrot pürüzsüz hale getirildi.

Pürüzsüz hale gelen karbon pasta elektrot saf su ile tekrar yıkanıp kullanıma hazır hale getirildi.

Karbon pasta elektrodu modifiye etme işlemi ise; yukarıdaki hazırlama şeklinden farklı olarak hazırlanan pastaya (grafit tozu + nujol) 1,0 mg PAMAM-Sal-Pt (II) polimeri ilave edilip karılması ve elektroda doldurulması ile gerçekleştirildi.

Çalışmamızda modifiye işlemi için kullandığımız madde Poli (amidoamin) salisilaldehit platin (II) (PAMAM-Sal-Pt (II))' dir. Bu madde çalışmamız için ilk defa Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya bölümü öğretim üyeleri Prof. Dr. Nurşen SARI ve Dr. Elvan HASANOĞLU ÖZKAN tarafından sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir.



Şekil 3.3. MCPE hazırlanması ve çalışma hücresi şeması (Bodur, 2019).

3.4.2. CPE'nin sabit akıma getirilmesi

Elektrokimyasal hücreye pH'sı 7,0 olan 9 mL' lik fosfat tampon çözeltisi içine 1 mL NaCl (1M) çözeltisi ilave edildi. Çalışma elektrodumuz olan CPE, diğer elektrotlar (karşıt ve referans elektrot) ile birlikte hücre içerisine konuldu. Çalışılacak potansiyelde elektrot akımı sabitleninceye kadar bekletildi ve sabitlenen akım değeri denge akımı olarak kaydedildi. Diğer deneylerde de bu işlem gerçekleştirildi.

3.4.3. CPE ve MCPE' nin bisfenol-A' ya duyarlılığının belirlenmesi

Şekil 3.3'e göre hazırlanan CPE ve MCPE oda koşulunda 1 mL sodyum klorür (1M), 9 mL fosfat tamponu (pH 7,0) ve 100 µL tirozinaz (236,3 ünite/mL) enzimi bulunan hücre içinde -0,15 V'da dengeye gelinceye kadar bekletildi. Daha sonra hücre derişimi $1,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde bisfenol-A çözeltisi ilave edilerek çözelti 20 dk karıştırıldı (literatürlerde tirozinaz enzimi ile çalışmalar 20 dk karıştırılarak yapılmıştır [Şenaslan D. (2017)].) ve 200 s sonunda ölçüm yapıldı. Ölçülen bu akım değeri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değeri hesaplandı. Daha sonra bu işlem artan derişimlerde $5,0 \times 10^{-4}$ M derişime kadar bisfenol-A çözeltisi eklenerek akım farkı (Δi) değeri kaydedildi. Artan derişimlerde yapılan bisfenol-A ilavelerine karşı artan akım farkları grafiğe geçirildi (Şekil 4.1).

3.4.4. MCPE' ye tirozinaz enziminin immobilizasyonu

Biyosensör için 0,142 g aktif grafit tozu, 95 µL nujol ve 1 mg PAMAM-Sal-Pt (II) polimer saat camı içerisinde karıştırılarak pasta haline getirildi. Hazırlanan pasta özel hazırlanmış 1 cm derinliğinde 0,5 cm çapında elektrot içindeki boşluğa koyulup cam çubukla elektrot içine sıkıştırılarak dolduruldu. Hazırlanan elektrot yüzeyi zımpara ile temizlenerek pürüzsüz hale getirildi. Daha sonra elektrot yüzeyine ikinci bir tabaka olarak bir ependof içerisinde 2,0 mg sığır serum albümini (BSA), 50 µL fosfat tamponu (pH 7,0), 30 µL gluteraldehit, 100 µL tirozinaz (236,3 ünite/mL) enzim eklenerek elde edilen karışım iyice karıştırılarak homojen çözelti haline getirilerek mikropipet yardımı ile hazırlanan karbon pasta elektrot yüzeyine kabarcık olamayacak şekilde damla damla ilave edildi. Hazırlanan immobilize elektrot oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Tamamen kuruduktan sonra saf su ile yıkandı ve böylece yüzeye tutunamayan enzim elektrotdan uzaklaştırıldı. Daha sonra hazırlanan biyosensör yapılan deneylerde kullanıldı. Kullanılmadığı zamanlarda fosfat tamponu içerisinde +4 °C de buzdolabında muhafaza edildi.

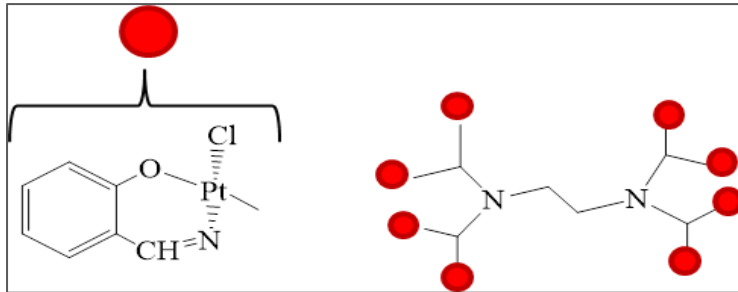
3.4.5. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi

Hazırlanan biyosensör 1 mL sodyum klorür (1M) ve 9 mL fosfat tamponu (pH 7,0) bulunan hücre içinde dengeye gelinceye kadar bekletildi. Daha sonra hücre derişimi $1,0 \times 10^{-6}$ - $5,0 \times 10^{-4}$ olacak şekilde hücreye bisfenol-A çözeltisi ilave edildi. Hücre içinde bulunun çözelti her

ekleme sonunda 20 dakika boyunca karıştırılarak bisfenol-A'nın enzimatik reaksiyonla kinona dönüşümü sağlandı ve 200 s sonra belirlenen potansiyellerde (-0,1 V, -0,15 V, -0,25 V) akımlar ölçüldü. Okunan akım değerlerinden denge akımı çıkarılarak akım farkları (Δi) hesaplandı. Bisfenol-A derişimine karşı akım farkları grafiğe geçirildi (Şekil 4.3). Çizilen grafiğe bakılarak reaksiyon sonunda oluşan kinonun en iyi indirgendiği potansiyel belirlendi.

3.4.7. PAMAM-Sal-Pt (II) Polimer miktarının belirlenmesi

Farklı polimer miktarları ile hazırlanan biyosensörler hazırlanan 1 mL sodyum klorür (1M) ve 9 mL fosfat tamponu (pH 7,0) bulunan hücre içinde dengeye gelinceye kadar bekletildi. Daha sonra hücre derişimi $1,0 \times 10^{-6}$ - $5,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde hücreye bisfenol-A çözeltisi ilave edildi. Hücre içinde bulunun çözelti her ekleme sonunda 20 dk boyunca karıştırılarak bisfenol-A'nın enzimatik reaksiyonla kinona dönüşümü sağlandı ve 200 s sonra -0,15 V 'da akımlar ölçüldü. Okunan akım değerlerinden denge akımı çıkarılarak akım farkları (Δi) hesaplandı. Bisfenol-A derişimine karşı akım farkları grafiğe geçirildi. Çizilen grafiğe (Şekil 4.4) göre en iyi polimer miktarı belirlendi.



Şekil 3.4. PAMAM-Sal-Pt(II)

3.4.6. Gluteraldehit miktarının belirlenmesi

Farklı guluteraldehit miktarları ile hazırlanan biyosennsörler hazırlanan 1 mL sodyum klorür (1M) ve 9 mL fosfat tamponu (pH 7,0) bulunan hücre içinde dengeye gelinceye kadar bekletildi. Daha sonra hücre derişimi $1,0 \times 10^{-6}$ - $5,0 \times 10^{-4}$ olacak şekilde hücreye bisfenol-A çözeltisi ilave edildi. Hücre içinde bulunun çözelti her ekleme sonunda 20 dk karıştırılarak bisfenol-A'nın enzimatik reaksiyonla kinona dönüşümü sağlandı ve 200 s sonra -0,15 V 'da akımlar ölçüldü. Okunan akım değerlerinden denge akımı çıkarılarak akım farkları (Δi)

hesaplandı. Bisfenol-A derişimine karşı akım farkları grafiğe geçirildi (Şekil 4.5). Çizilen grafiğe göre en iyi gluteraldehit miktarı belirlendi.

3.4.8. Enzim elektrodun en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi

pH' nın belirlenmesi

Hazırlanan biyosensör 1 mL sodyum klorür (1M) ve 9 mL fosfat tamponu (pH 7,0) özeltlerinde -0,15 V'da dengeye getirildi. Daha sonra hücre derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde bisfenol-A özeltisi ilave edildi. Çözelti 20 dk karıştırılıp 200 s sonunda akım değeri okunarak kaydedildi. Gözlenen akım değeri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değeri hesaplandı. Bu deney iki defa daha yapılarak Δi_1 , Δi_2 , Δi_3 değerleri hesaplanarak akım farklarının ortalaması alınarak Δi_{ort} değeri hesaplandı.

Yapılan deney aynı şekilde pH 5,0, 6,0 7,0, 8,0, 9,0 tampon özeltiiler içinde yapılarak her bir pH tamponu için akım farkı ortalamaları hesaplandı. Hesaplanan bu akım farkı değerlerine karşı pH değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.6). İmmobilize elektrodun en uygun çalışma pH'sı belirlendi.

- * pH 5,0 için Asetik asit – Asetat Tamponu
- * pH 6,0 için Fosfat Tamponu (Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4)
- * pH 7,0 için Fosfat Tamponu (Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4)
- * pH 8,0 için Fosfat Tamponu (Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4)
- * pH 9,0 için Glisin Tamponu kullanıldı.

Sıcaklık etkisi

Hazırlanan biyosensör 1 mL sodyum klorür (1M) ve 9 mL fosfat tamponu (pH 7,0) özeltiilerinde -0,15 V'da sıcaklığı termostatlı dolaşımlı su banyosu kullanılarak 20°C de sabit tutularak dengeye getirildi. Daha sonra hücre derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde bisfenol-A özeltisi ilave edildi. Çözelti 20 dk karıştırılıp 200 s sonunda akım değeri okunarak kaydedildi. Gözlenen akım değeri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değeri hesaplandı. Bu deney iki defa daha yapılarak Δi_1 , Δi_2 , Δi_3 değerleri hesaplanarak akım farklarının ortalaması alınarak Δi_{ort} değeri hesaplandı.

Yapılan deneyler aynı şekilde 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C sıcaklıkları içinde yapılarak her bir sıcaklık için akım farkı değerlerine karşı sıcaklık değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.7). İmmobilize elektrodun en uygun çalışma sıcaklığı belirlendi.

Bisfenol-A derişiminin etkisi

Hazırlanan biyosensör oda koşulunda 1 mL sodyum klorür (1M) ve 9 mL fosfat tamponu (pH 7,0) çözeltilerinde -0,15 V'da dengeye gelinceye kadar bekletildi. Daha sonra hücre derişimi $1,0 \times 10^{-9}$ M olacak şekilde bisfenol-A çözeltisi ilave edilerek çözelti 20 dakika karıştırıldı ve 200 s sonunda ölçüm yapıldı. Ölçülen bu akım değeri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değeri hesaplandı. Daha sonra bu işlem artan derişimlerde $1,0 \times 10^{-3}$ M derişime kadar bisfenol-A çözeltisi eklenerek akım farkı (Δi) değerleri hesaplandı. Deney tamamlandıktan sonra elde edilen akım farklarına (Δi) karşı bisfenol-A derişimleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.8).

Tekrarlanabilirlik

Hazırlanan biyosensör 1 mL sodyum klorür (1M) ve 9 mL fosfat tamponu (pH 7,0) çözeltilerinde -0,15 V'da dengeye gelinceye kadar bekletildi. Dengeye getirilen biyosensör optimum şartlarda tekrarlanabilirliğinin belirlenebilmesi için hücre derişimi $2,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde bisfenol-A çözeltisi ilavesi edilerek çözelti 20 dakika karıştırılıp 200 s sonunda akım değeri okunup kaydedildi. Gözlenen akım değeri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değeri hesaplandı. Bu yapılan deney 16 defa daha tekrarlanarak elde edilen akım farkı (Δi) değerleri ölçüm sayısına karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.11).

Raf ömrünün belirlenmesi

Hazırlanan biyosensör 1 mL sodyum klorür (1M) ve 9 mL fosfat tamponu (pH 7,0) çözeltilerinde -0,15 V'da elektrot dengeye gelinceye kadar bekletildi. Dengeye getirilen biyosensör optimum şartlarda tekrarlanabilirliğinin belirlenebilmesi için hücre derişimi $2,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde bisfenol-A çözeltisi ilavesi edilerek çözelti 20 dakika karıştırılıp 200 s sonunda akım değeri okunup kaydedildi.

Gözlenen akım değeri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değeri hesaplandı. Bu yapılan işlem iki defa daha yapılarak Δi_1 ortalaması alınarak Δi_{ort} değeri hesaplandı. Yapılan bu deney ve hesaplanan akım farkı ortalaması belirlenen her gün boyunca aynı şekilde tekrar

edildi. Elde edilen ortalama değerlerine karşı deney günleri grafiğe geçirildi (şekil 4.12), Δi_2 , Δi_3 değerleri hesaplanarak akım farklarının

3.4.9. Bisfenol-A tayinine girişim yapan türlerin etkisinin incelenmesi

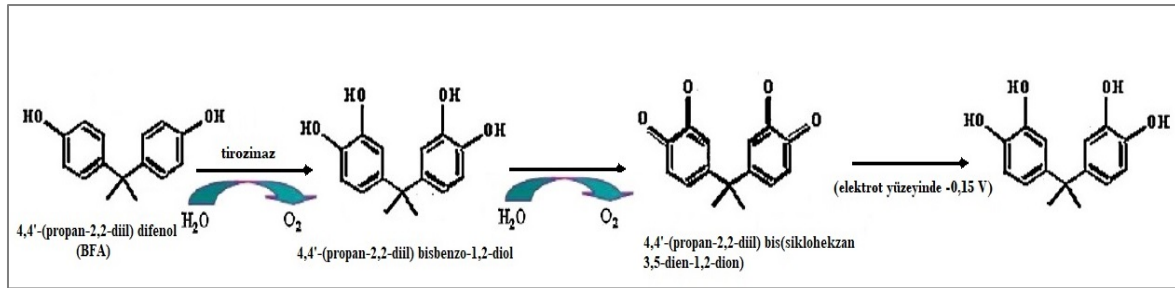
Bu bölümde ise bisfenol-A tayinine gerçek örneklerde girişim yapabilecek maddeler incelendi.  nce biyosensör 1 mL sodyum klorür (1M) ve 9 mL fosfat tamponu (pH 7,0)  zelttilerinde -0,15 V'da elektrot dengeye gelinceye kadar bekletildi. Daha sonra hücre içi derişimi $2,0 \times 10^{-8}$ M olacak şekilde bisfenol-A  zeltisi ilave edildi. Çözelti 20 dakika karıştırılıp 200 s sonunda cevap akımı okunup kaydedildi. Daha sonra girişimi incelenen türün hücre içi derişimi $2,0 \times 10^{-9}$ M olacak şekilde hücreye ilave edilip gözlenen akım değeri kaydedildi. Gözlenen cevap akımı, hücredeki bisfenol-A ve çalışılan derişimdeki girişimi incelenen türün oluşturduğu cevap akımlarının toplamıdır. Çalışılan t re karşılık gelen cevap akımı, toplam cevap akımı değerinden BFA'ya karşılık gelen cevap akımı değerinin çıkarılması ile elde edildi. Hesaplanan ve ayırıştırılan cevap akımları ile girişimi incelenen türlerin yüzde olarak ne kadar girişim yaptığı hesaplandı.

3.4.10. Gerçek örneklere biyosensörün uygulanması

Diş hekimliğinde yapıştırıcı olarak kullanılan ortodontik malzemeden 17,49 mg cam tüp içine konulup üzerine 5 mL saf su ilave edilerek 2 saat bekletildi. Daha sonra t p içinde bulunan su başka bir tüpe alındı. Hazırlanan biyosensör 1 mL sodyum klorür (1M) ve 9 mL fosfat tamponu (pH 7,0)  zelttilerinde -0,15 V'da elektrot dengeye getirilerek denge akımı kaydedildi. Sonra numuneden 100 μ L alınarak hücreye eklendi. Çözelti 20 dk karıştırılıp 200 s sonunda cevap akımı okunup kaydedildi. Gözlenen akım değeri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değeri hesaplandı. Bu akım farkına karşılık gelen derişim değeri kalibrasyon grafiğinden (şekil 4.9) bakılarak yaklaşık değeri belirlendi

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

PAMAM-Sal-Pt (II) kullanılarak hazırlanan MCP elektroda tirozinaz enzimi immobilize edildi. Tirozinaz enzimi oksijenli ortamda BFA'nın kinon bileşiğine (4,4'-(propan-2,2-diil) bis (sikloheksan 3,5-dien-1,2-dion)) yükseltgenmesini sağlar. BFA tayini, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan kinonun -0,15 V'da indirgenmesi esasına dayanarak yapıldı.



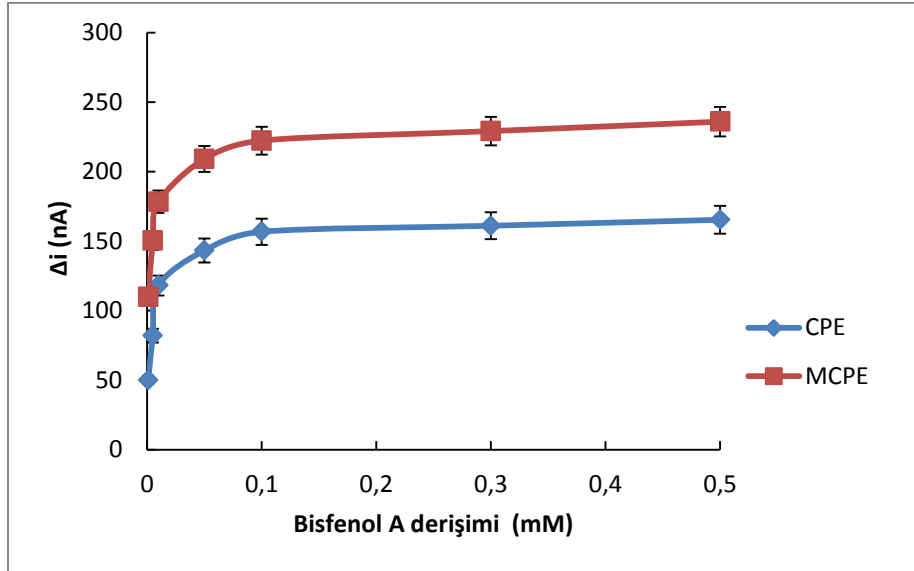
Şekil 4.1. BFA tayini için biyosensörün çalışma şeması

Geliştirilen biyosensörün en iyi çalışma koşulları, performansa etki eden faktörleri incelendi. Optimum çalışma koşulları belirlenerek gerçek ortamda olabilecek madde girişimleri yapılan deneyler sonucu incelendi ve hazırlanan immobilize elektrot dış hekimliğinde yapıştırıcı olarak kullanılan ortodontik malzemede bisfenol-A maddesinin tayininde kullanıldı.

4.1. Biyosensörün İn İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

4.1.1. CP ve MCP Elektrotların BFA'ya duyarlılığı

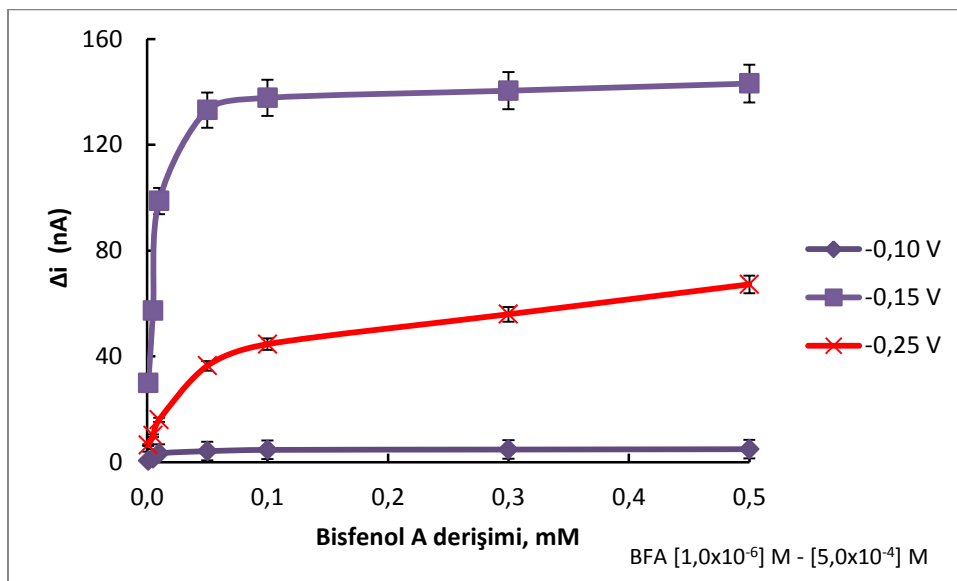
Karbon pasta elektrodun ve modifiye karbon pasta elektrodun duyarlılık karşılaştırılması bisfenol-A'nın hücrede enzimatik reaksiyon ile kinona yükseltgenmesi ve kinonun oluşturduğu anodik akımların kaydedilmesi sayesinde gerçekleştirildi. CPE ve MCPE -0,15 V'da sabit akıma getirildikten sonra denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresi içindeki bisfenol-A'nın derişimi $1,0 \times 10^{-6}$ - $5,0 \times 10^{-4}$ M aralığında ilaveler yapılarak bisfenol-A derişimne karşı elde edilen cevap akımları grafiğe geçirildi (Şekil 4.1). Şekil 4.1 incelendiğinde MCPE'da akımlarının CPE'dakinden yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu görüldü. MCPE'daki PAMAM-Sal-Pt (II)'in iletkenliği artırarak akımları yükselttiği düşünüldü.



Şekil 4.2. CPE-MCPE bisfenol A'ya duyarlılığı

4.1.2. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi

Hazırlanan biyosensör ile bisfenol-A tayini için en iyi potansiyel değerini belirlemek için -0,10 V, -0,15 V, -0,25 V potansiyellerde bisfenol-A derişimine karşı okunan akımlar grafiğe geçirildi. Elde edilen grafikler (Şekil 4.3) incelendiğinde enzimatik reaksiyon sonucu oluşan kinonun -0,15 V'da en yüksek indirgenme akımının olduğu tespit edildi. Elde edilen verilere dayanarak çalışma potansiyeli -0,15 V olarak belirlendi.

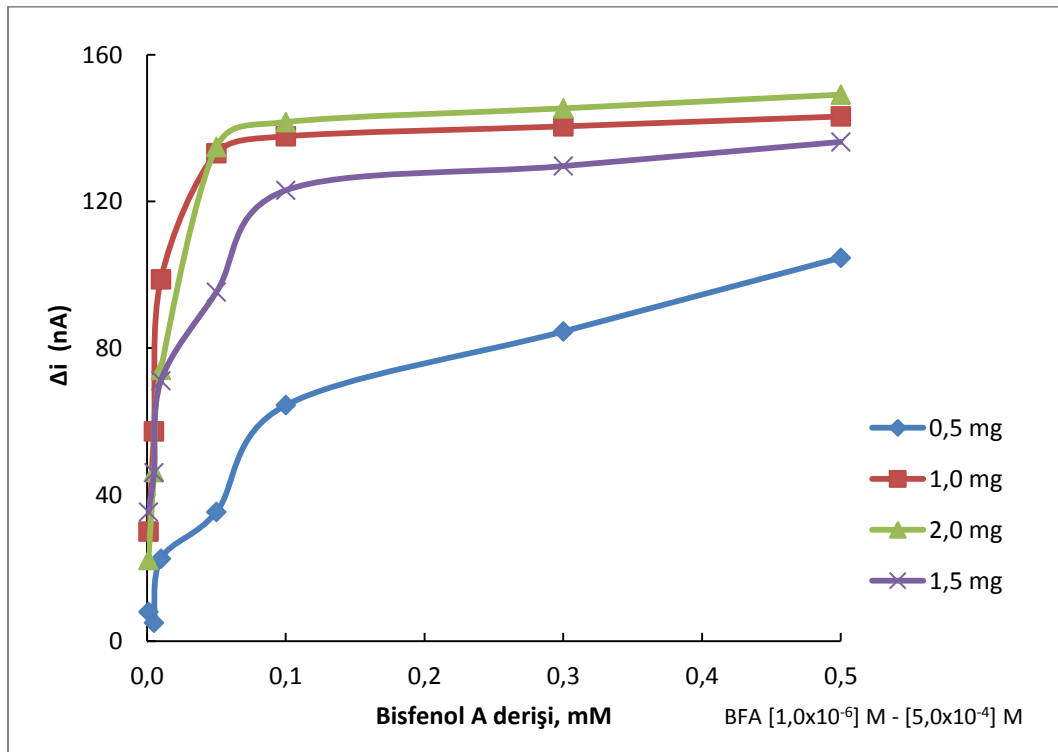


Şekil 4.3. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi (0,1 M pH'sı 7,0 olan fosfat tamponu, 25 C)

4.1.3. PAMAM-Sal-Pt (II) Polimer miktarının belirlenmesi

Pollimerler çok sayıda molekülün kimyasal bağlarla düzenli bir şekilde bağlanarak oluşturdukları yüksek molekül kütleli bileşiklerdir. Polimer bileşikler birçok sektörde özelliklerine göre kullanılmaktadır. Özellikle de iletken polimerler, bu polimerler elektriği iyi ileten organik polimerlerdir.

Hazırlanan biyosensörde polimer kullanıldığında elde edilen akım değerlerinin daha yüksek olduğu yapılan deneyler sonucunda gözlemlendi. Polimer miktarları sırası ile 0,5 mg, 1,0 mg, 1,5 mg, 2,0 mg kullanıldı. Daha sonra hücre derişimi $1,0 \times 10^{-6}$ - 5×10^{-4} olacak şekilde hücreye bisfenol-A çözeltisi ilave edilerek -0,15 V 'da akımlar ölçüldü. Okunan akım değerlerinden denge akımı çıkarılarak akım farkları (Δi) hesaplandı. Bisfenol-A derişimine karşı akım farkları grafiğe geçirildi. Şekil 4.4 incelendiğinde polimer miktarı arttıkça akım farklarının da arttığı görülmektedir. Ancak 2,0 mg da hazırlanan biyosensör yüksek akım versede deney sonunda elektrot içinde bulunan karbon pasta şişerek dağıldı. En kullanışlı ve en yüksek akım 1,0 mg polimer kullanılarak hazırlanan elektrot olduğu gözlemlendi. Bu çalışma sonunda polimer miktarı 1,0 mg olarak belirlendi.



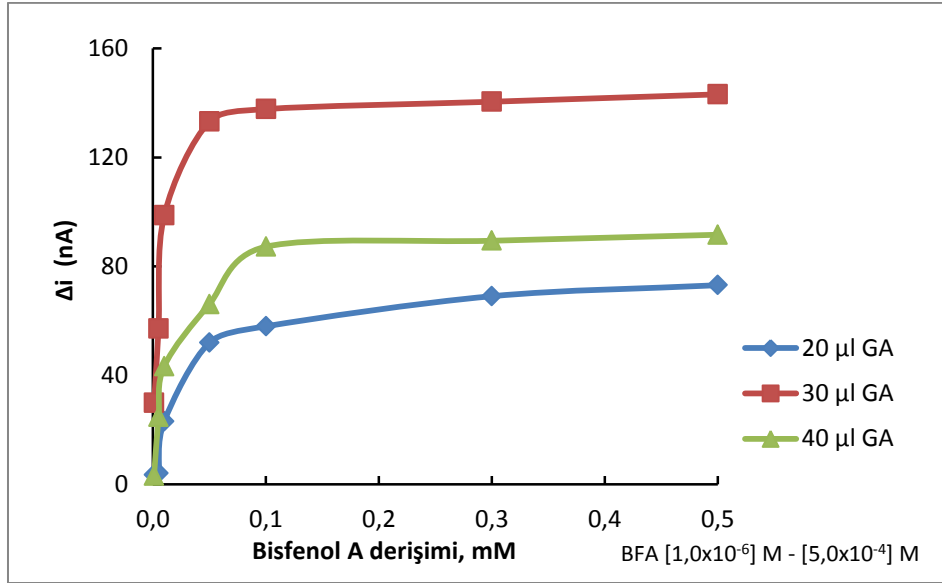
Şekil 4.4. Biyosensörün bisfenol-A ya duyarlılığına kullanılan polimer miktarının etkisi

4.1.4. Gluteraldehit miktarının belirlenmesi

Gluteraldehit ($\text{CHO-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-CHO}$), yapılan çalışmalarda çok fazla tercih edilen çapraz bağlama reaktiflerindendir. Enzimlerin yapısında bulunan amin grupları ile etkileşime girerek bağlanmayı sağlar. Gluteraldehit sadece enzim yüzeyinde bulunan amin grupları ile etkileşime girmez, küçük bir molekül olduğu için enzimin iç kısımlarına kadar difüze olup iç kısımda bulunan amin grupları ile de etkileşime girebilir. Bu durum ise enzimin üç boyutlu yapısını ve dolayısıyla enzimin aktivitesini etkilemektedir, çünkü enzimin aktif bölgesi fazla çapraz bağlanma ile bloke olabilir (Xin, 1997). Bu nedenlerden dolayı kullanılacak gluteraldehit miktarının enzimin aktivitesine etkisinin araştırılması faydalı olacaktır.

Hazırlanan biyosensör elektrot içerisinde kullanılan gluteraldehit miktarını belirlemek için 20,0 μL , 30,0 μL , 40,0 μL gluteraldehit (% 2,5'luk) ile hazırlanan biyosensörler bisfenol-A tayini için kullanıldı. Bisfenol-A derişimlerine karşı okunan akımlar grafiğe geçirildi (Şekil 4.5). Gluteraldehit miktarının 20,0 μL 'den 30,0 μL 'ye çıkarıldığında cevap akımlarının arttığı; ancak miktarın 40,0 μL 'e çıkarıldığında ise aktivite kaybının olduğu akımların düştüğü görüldü. Alınan sonuçlar bu şekilde yorumlandı; 20,0 μL miktarındaki gluteraldehitin enzim immobilize etmek için yeterli olmadığı yapıyı bir arada tutamadığı, 40,0 μL miktarındaki gluteraldehitin ise çok fazla gelerek aşırı bağlanma sonucu enzimin aktivite kaybına sebep olmasıdır. Elde edilen grafik (Şekil 4.5) incelendiğinde en yüksek akım değerinin 30 μL gluteraldehit kullanılan elektrotta olduğu tesit edildi.

Literatürler incelendiğinde kullanılan gluteraldehit miktarları 30 μL (Şenaslan, 2017), 20 μL (Bodur, 2019) dir. Buda kullanılan enzimin aynı ya da farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

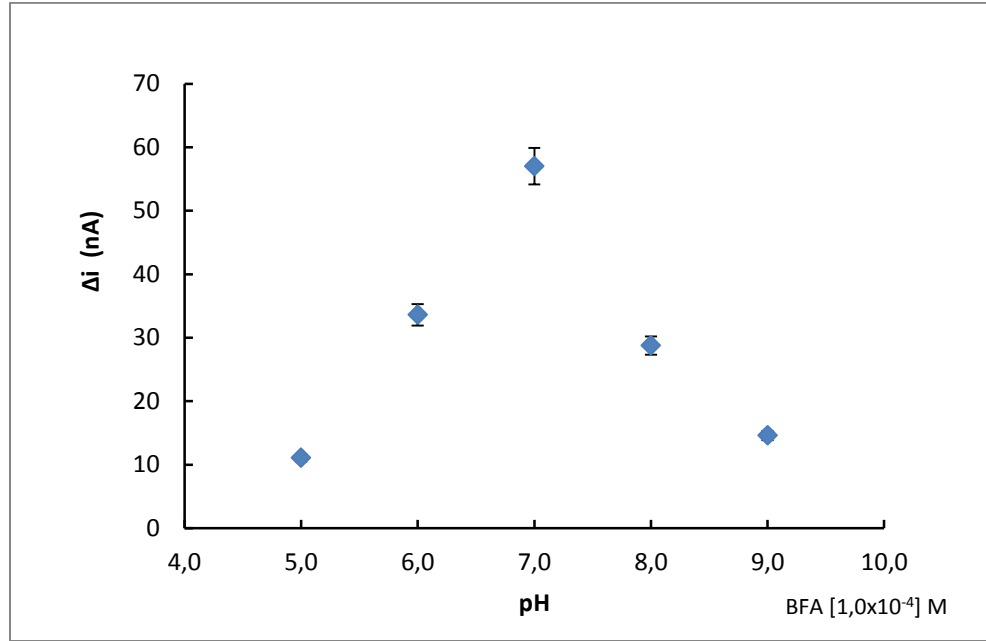


Şekil 4.5. Biyosensörün bisfenol-A ya duyarlılığına kullanılan gluteraldehit miktarının etkisi

4.1.5 pH 'nın belirlenmesi

pH enzimlerin aktivitesini etkileyen önemli faktörlerden biridir. Hazırlanan biyosensör pH 5,0, 6,0 7,0, 8,0, 9,0 tampon çözeltilerinde -0,15 V'da hücrede dengeye getirildi. Daha sonra hücre derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde bisfenol-A çözeltisi ilave edildi. Gözlenen akım değerlerinden denge akımı çıkarılarak akım farkları (Δi) hesaplandı. Bisfenol-A derişimine karşı akım farkları grafiğe (Şekil 4.6) geçirildi. Bu deney iki defa daha yapılarak Δi_1 , Δi_2 , Δi_3 değerleri hesaplanarak akım farklarının ortalaması alınarak Δi_{ort} değeri hesaplandı. Şekil 4.6 incelendiğinde en yüksek akımın pH 7,0'de olduğu görüldü. Bundan sonraki çalışmalarda pH 7,0 olan tampon çözelti kullanıldı.

Literatürde farklı materyallerle yapılmış olan tirozinaz enzimi ile hazırlanan biyosensör çalışmalarında bizim çalışmamızla uyumlu olan optimum pH değeri de olamakla birlikte farklı pH değerleride bulunmaktadır. Örneğin; 7,0 (Cemeroğlu, 2001) pH değerlerindeki bu değişim immobilize edilen materyalin ve immobilizasyon türünün farklı olmasından kaynaklanabilmektedir. Örneğin; 7,4 (Stetter, 2002), 8,5 (Joseph, 2003), 8,0 (Kalcher, (1997)



Şekil 4.6. Biyosensörün bisfenol-A ya duyarlılığına pH etkisi

4.1.6 Sıcaklık etkisi

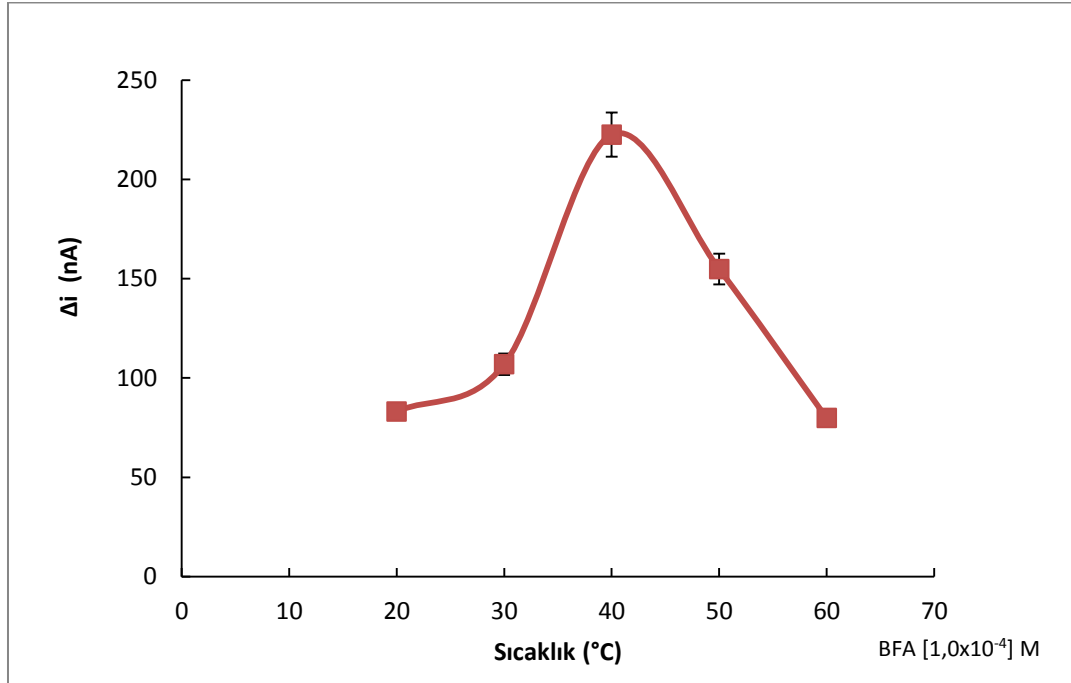
Enzimler protein yapılı oldukları için sıcaklık değişiminden etkilenir. Düşük sıcaklıkta enzimlerin aktivitesi düşer, yüksek sıcaklıkta ise enzimin protein yapısı denatüre olur ve yine aktivitesinde düşüş görülür. Enzimlerin kendine özgü maksimum aktivite gösterdiği optimum sıcaklık değerleri vardır.

Hazırlanan biyosensör fosfat tamponu (pH 7,0) çözeltilerinde -0,15 V'da sıcaklığı termostatlı dolaşım su banyosu kullanılarak 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C de sabit tutularak dengeye getirildi. Daha sonra hücre derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde bisfenol-A çözeltisi ilave edildi.

Gözlenen akım değeri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değeri hesaplandı. Bu deney iki defa daha yapılarak Δi_1 Δi_2 Δi_3 değerleri hesaplanarak akım farklarının ortalaması alınarak Δi_{ort} değeri hesaplandı. BPA derişimlerine karşı akım farkları grafiğe geçirildi (Şekil 4.7). Şekil 4.7 incelendiğinde en yüksek akımın 40 °C de olduğu görüldü. Ancak bundan sonraki çalışmalarda ölçümlerin daha pratik ve kolay yapılabilmesi için oda sıcaklığı kullanıldı.

Literatürde farklı materyallerle yapılmış olan tirozinaz enzimi ile hazırlanan biyosensör çalışmaları incelendiğinde bizim çalışmamızla uyumlu olan optimum sıcaklık değeri görülmektedir. Örneğin; 40 °C (Sanju, 2017). Yapılan çalışmalar sonucu farklı sıcaklık

değerleride bulunmaktadır bunun sebebi ise immobilize edilen materyalin ve immobilizasyon türünün farklı olmasıdır. Örneğin; 20 °C (Marcoux, 1965), 37 °C (Mcdonald, 2001)



Şekil 4.7. Biyosensörün bisfenol-A'ya duyarlılığına pH'nın etkisi (25 °C, $1,0 \times 10^{-4}$ M bisfenol-A derişimi)

4.1.7 Bisfenol-A derişiminin etkisi

Biyosensörün bisfenol-A'ya duyarlılığına substrat derişiminin etkisi araştırıldı. Bu amaçla – 0,15 V'da artan bisfenol-A derişimlerine ($1,0 \times 10^{-9}$ – $1,0 \times 10^{-3}$ M) karşı immobilize elektrodun amperometrik akımı kaydedildi. Elde edilen akımlar ile bisfenol-A derişimine karşı akım farkları grafiğe geçirildi (Şekil 4.8). Şekil 4.8 biyokimyasal kinetik de Michaelis–Menten eğrisi olarak bilinir. Şekil 4.8 incelendiğinde bisfenol-A derişimi arttıkça akım farklarının önce doğrusal sonra da doğrusallıktan saparak hiperbolik bir şekilde arttığı gözleniyor.

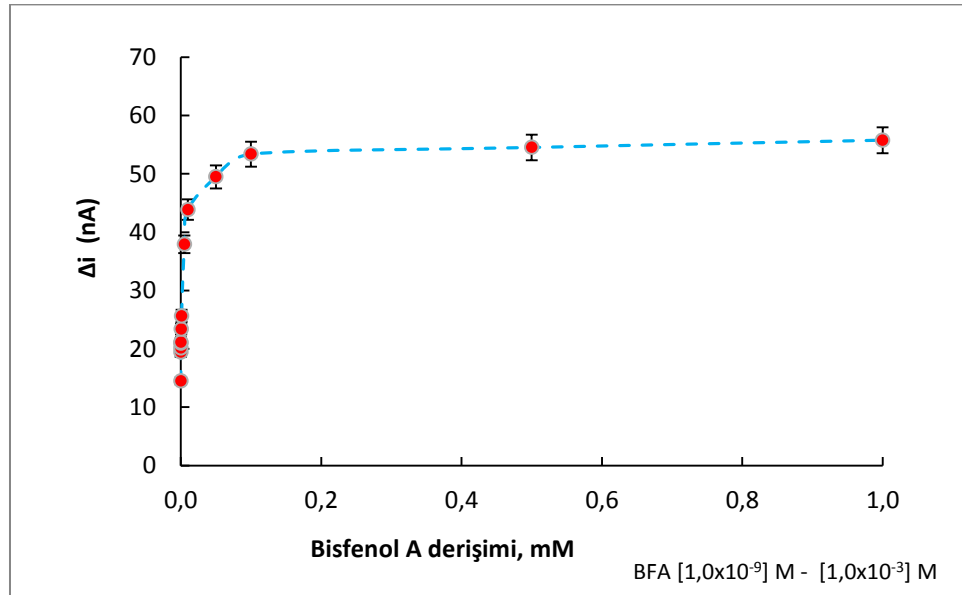
Bisfenol-A derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M'dan itibaren akım farklarında artış çok küçük olduğu görülmektedir. Belirtilen derşimden itibaren tirozinaz enzimi bisfenol-A ya doymuş ve bundan dolayı da akım farklarında değişme çok küçük olmuştur.

Şekil 4.8'in doğrusal olduğu bölgesindeki veriler grafiğe geçirilerek BFA tayini için kullanılacak olan kalibrasyon grafiği (Şekil 4.9) elde edildi.

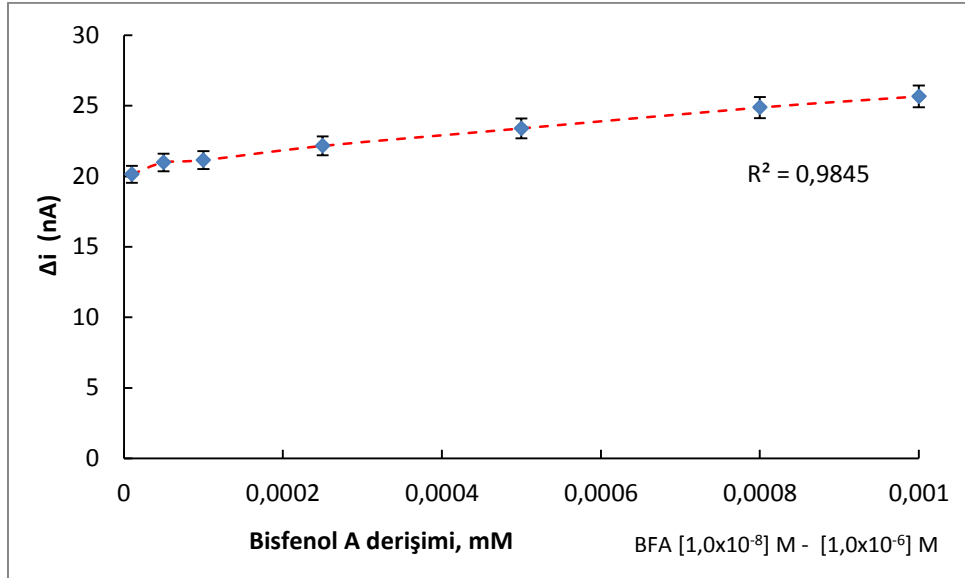
Şekil 4.9 incelendiğinde ($1,0 \times 10^{-9} - 1,0 \times 10^{-3}$ M) derişimleri arasında doğrusal bölge çalışma aralığının $0,01 \mu\text{M} - 1,0 \mu\text{M}$ arasında, (R^2 0,9845) (şekil 4.9), alt tayin sınırının ise 1 nM olduğu belirlendi.

Literatürler incelendiğinde (doğrusal aralığı $2,5 \times 10^{-3} - 3,0 \mu\text{M}$, tayin sınırı 1 nM (Daodong, 2015), doğrusal aralığı $1,25-10,0 \mu\text{M}$, tayin sınırı $18,21 \text{ nM}$ (Pengyu, 2013), doğrusal aralığı $1,0 \times 10^{-5} - 5,0 \times 10^{-7} \text{ M}$ tayin sınırı $1,0 \times 10^{-7} \text{ M}$ (Şenaslan, 2017)) hazırladığımız biyosensörün doğrusal aralığının oldukça geniş ve tayin sınırında düşük olduğunu söyleyebiliriz.

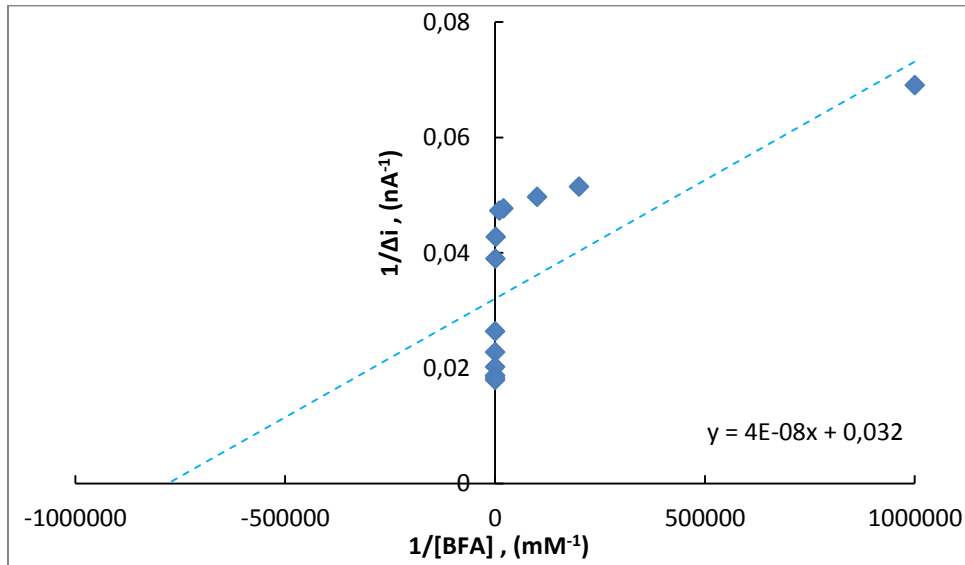
Michaelis – Menten eğrisi hiperbolik bir eğri olduğundan dolayı enzimler için spesifik veriler olan V_{max} ve K_m değerleri bu grafikten doğru bir şekilde bulunamaz. Bu sebeple Michaelis – Menten eşitliğinin her iki tarafının da tersi alınarak yeni bir eşitlik ve doğrusal olan bir grafik (Lineweaver Burk grafiği) elde edilir (Şekil 4.10). Şekil 4.10 incelendiğinde $K_m(\text{göz})$ değerinin $0,00125 \mu\text{M}$, $I_{\text{max}}(\text{göz})$ değerinin ise $0,00312 \mu\text{A}$ olduğu belirlendi. Hazırlanan biyosensörün BPA'ya ilgisini gösteren $K_m(\text{göz})$ değeri literatürde verilen $K_m(\text{göz})$ değerlerinden ($8,15 \text{ nM}$ (Najib, 2018), $3,90 \mu\text{M}$ (Pengyu, 2013), $1,04 \times 10^{-3} \text{ mM}$ (Şenaslan, 2017)) daha düşüktür. Düşük olması da kullanılan polimerin enzimin substratına olan ilgisini artırır.



Şekil 4.8. Biyosensörün bisfenol-A'ya duyarlılığına substrat miktarının etkisi (25°C , $1,0 \times 10^{-9} - 1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ bisfenol-A derişimi)



Şekil 4.9. Bisfenol-A biyosensörü için kalibrasyon grafiği (25 °C, 0,1M pH 7,0 fosfat tamponu)

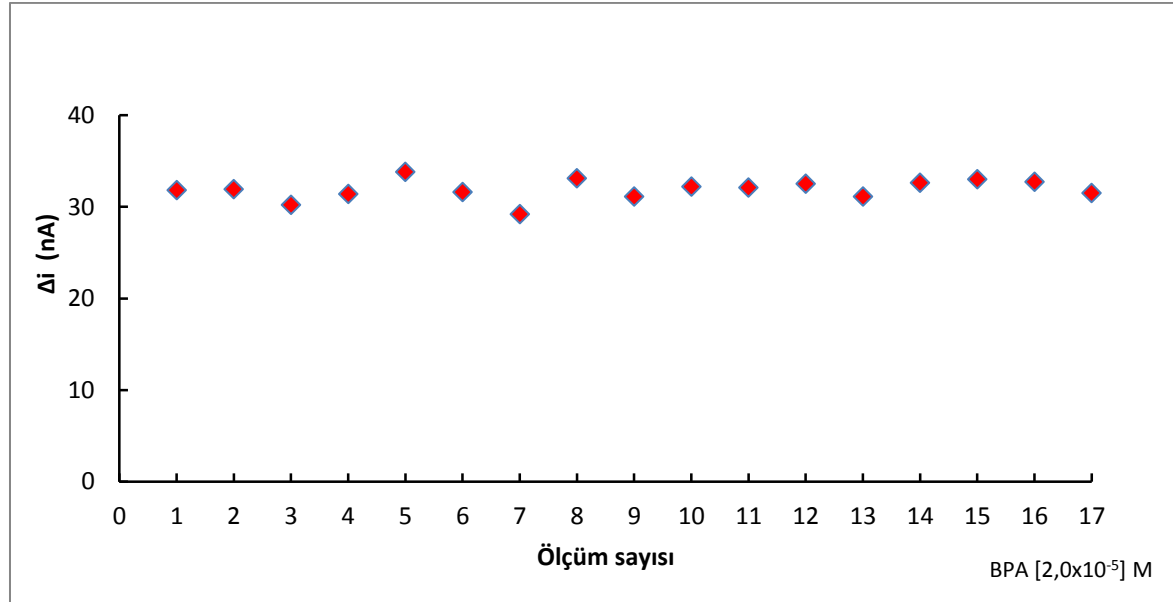


Şekil 4.10. Tirozinaz enzimi için Lineweaver – Burk grafiği, 25°C de (0,1M pH 7,0 fosfat tamponu)

4.1.8. Tekrarlanabilirlik

Hazırlanan biyosensör 1 mL sodyum klorür (1M) ve 9 mL fosfat tamponu (pH 7,0) çözeltilerinde -0,15 V'da hücrede dengeye gelinceye kadar bekletildi. Dengeye getirilen biyosensör optimum şartlarda tekrarlanabilirliğinin belirlenebilmesi için hücre derişimi $2,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde bisfenol-A çözeltilisi ilavesi edilerek ölçümler alındı. Gözlenen akım değeri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değeri hesaplandı ve bu yapılan çalışma

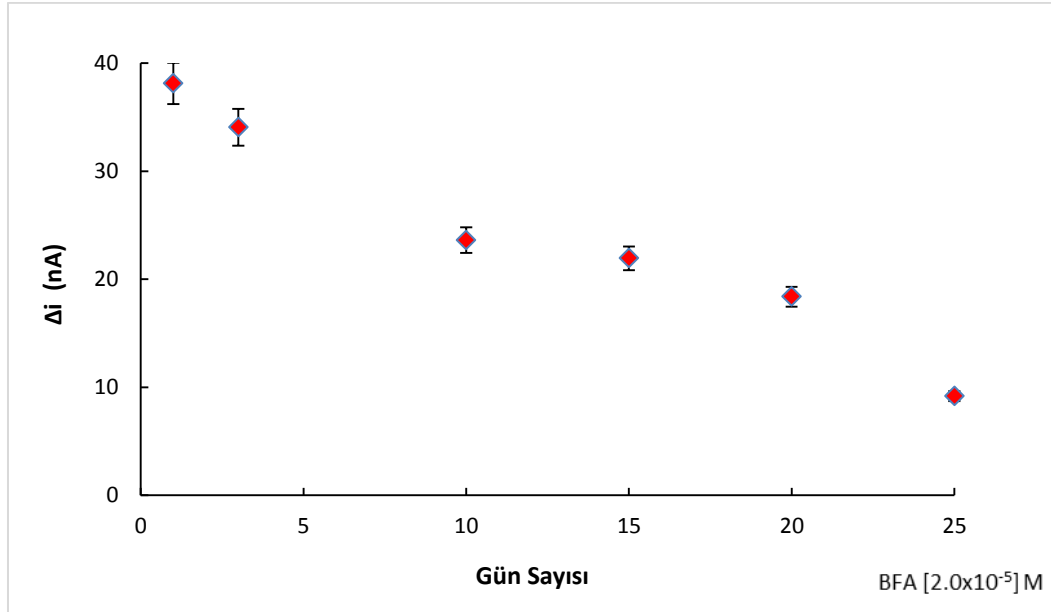
16 kez daha tekrar edilerek grafiğe geçirildi (Şekil 4.11). Yapılan 17 ölçüm sonucunda elde edilen akım değişimlerinden hesaplanan bağıl standart sapma % 3,49 olarak bulundu. 17 ölçüm sonunda biyosensörün başlangıç aktivitesinin % 0,94' ini kaybettiği gözlemlendi. Bu sonuçlardan hazırlanan biyosensörün tekrarlanabilirliğinin iyi olduğunu söyleyebiliriz.



Şekil 4.11. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi (pH 7,0 fosfat tamponu, 25 °C)

3.1.9. Raf ömrünün belirlenmesi

Hazırlanan biyosensör 25 gün boyunca belirli aralıklarla 1 mL sodyum klorür (1M) ve 9 mL fosfat tamponu (pH 7,0) çözeltilerinde -0,15 V potansiyelde hücre dengeye gelinceye kadar bekletildi. Dengeye getirilen biyosensör optimum şartlarda hücre içi derişimi $2,0 \times 10^{-5} \text{M}$ olacak şekilde bisfenol-A çözeltilisi ilave edilerek ölçümler alındı. Gözlenen akım değeri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değeri hesaplandı. Bu yapılan işlem iki defa daha yapılarak Δi_1 , Δi_2 , Δi_3 değerleri hesaplanarak akım farklarının ortalaması alınarak Δi_{ort} değeri hesaplanarak gün sayısına karşı akım farkı grafiğe geçirildi. (Şekil 4.12). Şekil 4.15 incelendiğinde, ilk 3 gün boyunca gözlenen değişimin az olduğu tespit edilip, 3-10 günler arasında akım düşüşünün biraz fazla olduğu, 10. günden sonra ise düşüşün yavaş devam ettiği kaydedilmiştir. Biyosensörün 25 gün sonunda başlangıç aktivitesinin %24,05'ini koruduğu görüldü.



Şekil 4.12. Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi (0,1M pH 7,0 fosfat tamponu, 25 °C, $2,0 \times 10^{-5}$ M bisfenol-A)

4.1.10. Bisfenol-A tayinine girişim yapan türlerin etkisinin incelenmesi

Bu aşamada bisfenol-A tayini yaparken girişim etkisi gösterebilecek maddeler fenol, nitrofenol, üre, potasyum nitrat, hegzan, asetonitril, etilasetat, fenol, nitrofenol, üre, potasyum nitrat, hegzan, asetonitril, etilasetat incelendi. Bu maddeler incelenirken hücre içinde bisfenol-A derişimi $2,0 \times 10^{-8}$ M, girişim yapan maddelerin derişimi ise $2,0 \times 10^{-9}$ M olarak hücreye ilaveler yapıldı. Girişimin yok edilmesi veya olabilecek en az yüzdeye indirilmesi gerçek numune analizlerinin tespiti ve doğruluğu açısından çok önemli bir faktördür. Bu maddelerden fenol (C_6H_5OH), nitrofenol ($C_6H_5NO_3$), üre (CH_4N_2O), potasyum nitrat (KNO_3), hegzan (C_6H_{14}), asetonitril (C_2H_3N), etilasetatın ($C_4H_8O_2$) bisfenol-A tayinine girişim yapmadıkları tespit edildi.

4.1.11. Gerçek örneklere biyosensörün uygulanması

Bu kısımda hazırlanan biyosensör 1 mL sodyum klorür (1M) ve 9 mL fosfat tamponu (pH 7,0) çözeltilerinde -0,15 V'da elektrot dengeye getirilerek denge akımı kaydedi. Sonra numuneden 100 µL alınarak hücreye eklendi. Gözlenen akım değeri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değeri farkına karşılık gelen derişim değeri kalibrasyon grafiğinden (Şekil 4.9) bakılarak 100 µL suda 0,167 ppm BFA olduğu bellirlendi. Kompozitin 5 mL suda bekletildiği göz önüne alınarak $0,167 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$ hesabı ile 5 mL suda 8,35 ppm BFA olduğu hesaplandı. mL başına düşen BFA miktarı 8,35 ppm 5'e bölünmesiyle 1,67 ppm/ mL olarak bellirlendi.

Sonuç olarak 17,49 mg kompozitten mg başına salınan BFA miktarı $1,67 \text{ ppm} / 17,49 = 0,095 \text{ ppm/mg}$ olarak hesaplanıp, 1 mg kompozitten 1 mL suya 0,095 ppm BFA salındığı tespit edildi.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan tez çalışmasında PAMAM-Sal-Pt (II) polimer kullanılarak elde edilen bisfenol-A ya duyarlı biyosensörünün;

- Hazırlanan biyosensörün tayin sınırı 1,0 nM, doğrusal aralığı 0,01 μ M – 1,0 μ M, (R^2 0,9845) olarak belirlendi. Hazırlanan biyosensörün tayin sınırı düşüktür. Tayin sınırının düşüklüğü, küçük derişimlerdeki madde miktarı tayinine dahi olanak tanınması açısından çok önemlidir. Doğrusal aralığının oldukça geniş olması da biyosensör için bir avantajdır.
- Optimum sıcaklık değeri 40°C olarak tespit edildi
- Biyosensörün cevap süresinin 200 s olduğu gözlemlendi.
- Tekrarlanabilirliği oldukça iyidir. 17 ölçüm sonunda bağıl standart sapmanın %3,49 ve başlangıçtaki amperometrik cevabında %0,94 oranında çok küçük bir kayıp olduğu görüldü. Elde edilen veriler immobilize elektrodumuzun yüksek bir tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu göstermektedir.
- Raf ömrü incelendiğinde, 25 gün sonra başlangıç amperometrik cevabının %24,05' inin korunduğu tespit edildi.
- Biyosensörün hazırlanması pratik ve maliyeti düşüktür.
- Hazırlanan biyosensörde kullanılan enzim için optimum pH 7,0 olarak tespit edildi.
- Biyosensörün K_m (göz) değeri, 0,00125 μ M olarak bulundu. Literatürdeki diğer BFA biyosensörlerine ait K_m değerleri ile kıyaslandığında biyosensörümüze ait değerin daha düşük olduğu görüldü, K_m değerinin küçük olması sayesinde, enzimlerin immobilize edildiği MCPE yüzeyinde substrata karşı olan ilgilerinin artırdığı görülebilir. K_m değerinin küçük olması düşük derişimleri tayin edebilme olanağı sağlar ve PAMAM-Sal-Pt (II) polimerinin, enzimin substrata olan ilgisini arttırdığını göstermektedir.

- Sonuç olarak hazırlanan bisfenol-A ya duyarlı biyosensör, geniş çalışma aralığına düşük tayin sınırına, düşük cevap süresine, iyi bir tekrarlanabilirliğe ve uzun bir raf ömrüne sahiptir.

Bu çalışmada hazırlanan BFA biyosensörünün bu hali ile uygulama alanı bulabileceği, kullanım imkanının olabileceği, aynı zamanda geliştirilmeye açık olduğu söylenebilir.

KAYNAKLAR

- Altıkatoğlu, M. (2007). *Enzim-Dekstran Konjugatları*. Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 5-37.
- Altuntaş, M. (2013). *Bisfenol-A'nın elektrokimyasal tayini için modifiye elektrot geliştirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon, 1-35.
- Aykut, U., Temiz, H. (2006). Biyosensörler ve Gıdalarda Kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3, 51-59.
- Aytan, E. (2009). *Vitreoscilla Hemoglobin Geninin Erwinia herbicola'ya Klonlanması ve LDOPA Üretimi Üzerine Etkisi*. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 3-18.
- Bilgin, B., Yılmazğlu B. (2018). Tirozinaz enziminin Giresun yöresinde yetişen kanlıca mantarından saflaştırılması ve karakterizasyonu. *Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 8,10-23.
- Bodur, O. C. (2019). *Alzheimer hastalığının teşhisi için asetilkolin biyosensörünün hazırlanması*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 3-20.
- Braz, J. (2014). Electrocatalytic Detection of Glutathione - the Search for New Mediators. *Chemical Society*, 25, (9), 1614-1620.
- Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A. ve Özkan, M. (2001). Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi, 1. Meyve ve Sebzelerin Bileşimi, Soğukta Depolanmaları. *Gıda Teknolojisi Dergisi Yayınları*, 24, 328.
- Chambers, J. P., Arulanandam B. P. and Matta L. (2008). Biosensor Recognition Elements. *Current Issues in Molecular Biology*, 10(1-2), 1-12.
- Daodong, P. (2015). Functional graphene-gold nano-composite fabricated electrochemical biosensor for direct and rapid detection of bisphenol A. *Analytica Chimica Acta*, 853, 297-302.
- Dinçkaya, E. (1999). *Enzim Sensörleri: Biyosensörler*. Ege Üniversitesi yayınları. İzmir, 81- 142.
- Dündar, B. S. (2014). *İçme sularında bisfenol-A araştırması*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-40.
- Erdem, C. (2012). *Glukoz Tayini için Nikel Oksit Modifiye Karbon Pasta Elektrotların Hazırlanması*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 17-42.

- Gerardo, R. M. (2005). Biosensor immunoassays for the dedection of bisphenol-A. *Analytica Chimica Acta*, 558, 37-45.
- Gümüşderelioğlu, M. ve Karakeçili G. A. (2013). Nanotıp ve Nano Robotlar, *Bilim ve Teknik Dergisi*, 5, 20-21.
- Joseph, R., Stetter, Z., William, R., Penrose, and Sheng, Y. (2003).Sensors, Chemical Sensors, Electrochemical Sensors, and ECS. *Journal of The Electrochemical Society*, 150 (2), 11-16.
- Kalcher, K., Schachl, K., Svancara, I., Vytras, K. and Alemu, H. (1997). Testing of inmodified carbbon paste electrodes. *Scientific Papers of the University of Pardubice Serie A*, 3, 57.
- Kang, J.H., Kondo, F. and Katayama, Y. (2006). Human exposure to bisphenol A. *Toxicolog*, 79–89.
- Keha, E., ve Küfrevioğlu, İ. (2009). *Biyokimya*, (6. Baskı). İstanbul: Aktif Yayınevi, 93-95, 116-123.
- Keleş, F. (1987). Gıdalarda Enzimatik Esmerleşme ve Kontrolü, *Doğa Dergisi*, 11,105-121.
- Le, H.H., Carlson, E.M., Chua, J.P. and Belcher, S.M. (2008). Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicology Letters*, 149-156.
- Lineweaver, H. and Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constant. *Journal of the American Chemical Society*, 56(3), 658-666.
- Lucadou V. I., Luft, G., Preidel, W. and Richter, G.J. (1988). The electrocatalytic glucose sensor. *Hormone and metabolic research supplement series*, 20, 41-3.
- Marchesini, G.R. (2005). Biosensor immunoassays for the detection of bisphenol A. *Science direct Analytica Chimica Acta*, 528, 37–45.
- Marcoux, L.S., Prater, K.G., Prater, B.G. and Adams, R.N. (1965). A Nonaqueous Carbon Paste Electrode. *Analytical Chemistry*, 37(11), 1446-1447.
- Mayer, A.M. (1987). Polyphenol oxidases in plants recent progress. *Phytochemistry*, 26 11–20.
- Mcdonald, S., Prenzler, P.D., Antalovich, M. and Robards, K. (2001). Phenolic Content and Antioxidant Activity of Olive Extracts. *Food Chemistry*, 73(2), 73-84.
- Michalowicz, J., Duda, W. and Stufka, O. J. (2007). Transformation of phenol, catechol, guaiacol and syringol exposed to sodium to hypochlorite. *Chemosphere*, 66, 657-663.

- Mulchandani, A. and Bassi A.S. (1995). Principles and applications of biosensors for bioprocess monitoring and control. *Crit Rev Biotechnology*, 15, 105-24.
- Najib, B. M., Ghicad M.E., Dridia, C., Alia, B. M., and Christopher M..A. (2018). A novel amperometric enzyme inhibition biosensor based on xanthine oxidase immobilised onto glassy carbon electrodes for bisphenol A determination. *Science Direct Talanta*, 184, 388-393.
- Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2005). *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri* (Üçüncü Baskıdan çeviri, Çeviri Editörü: Kılıç, N.), Türkiye: Palme Yayıncılık, 444.
- Nice, E.C., Catimel, B. (1999). Instrumental biosensors: new perspectives for the analysis of biomolecular interactions. *Bioessays*, 21, 339-52.
- Özdemir, M., Arslan, F., and Arslan, H., (2012). An amperometric biosensor for choline determination prepared from choline oxidase immobilized in polypyrrole-polyvinylsulfonate film. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 40, 280-284.
- Palüzar, H. (2013). *Pestisitlerin Vücut Savunma Sistemi Enzimleri Üzerine Etkilerinin In Vitro İncelenmesi*. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 40-42.
- Pan, Y., Sonn, G.A., Sin, M.L., Mach, K.E., Shih, M.C., Gau, V., Wong, P.K., and Liao, J.C. (2010). Electrochemical immunosensor detection of urinary lactoferrin in clinical samples for urinary tract infection diagnosis. *Biosens Bioelectron*, 26, 649-54.
- Pengyu S. and Yunhua, W. (2013). An amperometric biosensor based on human cytochrome polyacrylamide hydrogel films for bisphenol A determination. *Sensors and Actators*, 178,113-118.
- Portaccio, M. (2013). Laccase biosensor based on screen-printed electrode modified withthionine-carbon black nanocomposite, for Bisphenol A. *Detection Elektrochemica Acta*, 340-347.
- Prota, G. and Thomson, R.H. (1976). Melanin pigmentation in mammals. *Endeavour*, 35, 32-38.
- Ramiz S.J. (2010). Enzyme functionalized nanoparticles for electrochemical biosensors: A comparative study with applications for the detection of bisphenol-A. *Biosensors and Bioelektronics*, 26, 43-49.
- Sanju, G. (2017), Development of FRET biosensor based on aptamer/functionalized graphene for ultrasensitive detection of bisphenol A and discrimination from analogs. *Nano-Structres*, 10, 131-140.
- Scott A.M., Jedd D., Wolchok J.D. and Old L.J. (2012). Antibody Therapy of Cancer, *Nature Reviews*, 12, 278-287.

- Shimomura, T., Itoh, T., and Mizukami, M. (2009). Amperometric biosensor based on enzymes immobilized in hybrid mesoporous membranes for the determination of acetylcholine, *Enzyme and Microbial Technology*, 45(6–7), 443-448.
- Staples, C.A., Dorn, P.B., Klecka, G.M., O'Block, S.T. and Harris, L.R. (1998). A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*, 36, 2149-2173.
- Stetter, J. and Penrose, W. (2002). Understanding Chemical Sensors and Chemical Sensors Arrays; Past, Present and Future. *Sensors Update*, 10, 189-229.
- Sur, Ü., Oral, D., Erkekoğlu, P. ve Koçergümüşel B. (2017). Bisfenol Türevleri Daha Güvenli mi? -Bisfenol F ve Bisfenol S'in Toksik Etkileri. *Fabad journal farm.* 42, 225-237.
- Şenaslan, D. (2017). *Fenol tayini için biyosensör hazırlanması*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 3-47.
- Telefoncu, A. (1986). *İmmobilize Enzimler ve İmmobilizasyon Yöntemleri*, Temel ve Uygulamalı Enzimoloji Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu, İzmir, 1-16, 193-249.
- Türkan, A. (2018). Alıç mevesinden polifenol oksidaz enziminin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 22(3), 1048-1054
- Türkmen, E. (2015). *Glikoz tayini için biyosensör geliştirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 3-35.
- Vamos V.L. (1981). Polyphenol Oxidase and Peroxidase in Fruits and Vegetables, *CRC Critical Reviews Food Science and Nutrition*, 15, 49-127.
- Velasco, G.M.N. and Mottram, T. (2003). Biosensor technology addressing agricultural problems. *Biosystems Engineering*, 84 (1), 1-12.
- Xin, Q., and Wightman, R.M., (1997). Enzyme modified amperometric sensors for choline and acetylcholine with tetrathiafulvalene tetracyanoquinodimethane as the electron-transfer mediator. *Analytica Chimica Acta*, 341, 43-51.
- Yalvaş, A. (2014). *Karbon Pasta Elektrotların Bitki Dokuları ile Modifikasyonu ve Elektrokataliz Özelliklerinin İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, 12-35.
- Yavuz, A.G. (2005). *Polivinil ferrosen modifiye elektrodunu temel alan glukoz biyosensörünün geliştirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 5-41.
- Zhu, X., Zhou, T., Wu, X., Cai, Y., Yao, D., Xie, C. and Liu, D., (2011). Covalent immobilization of enzymes within micro-aqueous organic media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 72, 145-149.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : KOÇAK , Hasan
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 07.02.1987, Köprübaşı
Medeni hali : Evli
e-mail : 45hsnk@gmail.com.



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi / Kimya Bölümü	Devam ediyor
Lisans	Yüzüncü Yıl Üniversitesi/ Kimya Öğrt.	2011
Lise	Manisa Lisesi	2004

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2012-Halen	Özel Öğretim Kurumu	Öğretmen

Yayınlar

-

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Kitap okuma



GAZİ GELECEKTİR..