



**MODİFİYE KARBON PASTA ELEKTROT İLE YENİ BİR BİSFENOL A
BİYOSENSÖRÜ HAZIRLANMASI**

Eylem Ezgi ERGEZER

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ŞUBAT 2022

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.

Eylem Ezgi ERGEZER

01/02/2022

MODİFİYE KARBON PASTA ELEKTROT İLE YENİ BİR BİSFENOL A BİYOSENSÖRÜ HAZIRLANMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Eylem Ezgi ERGEZER

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2022

ÖZET

Bisfenol-A oksijen varlığında tirozinaz enzimi katalizörlüğünde enzimatik tepkime sonucunda kinon bileşiğine yükseltgenir. Bisfenol-A'nın tayini bu enzimatik tepkime sonucunda oluşan p-bisbenzokininin -0,10V'da elektrokimyasal olarak ölçülmesine dayanarak yapıldı. Bu çalışmada bisfenol-A tayini için yeni bir biyosensör tasarlandı. İlk olarak Poli (amidoamin) salisilidenimin paladyum (II) (PAMAM-Sal-Pd (II)) katkılı karbon pasta elektrot hazırlandı. Daha sonra modifiye edilmiş karbon pasta elektrot yüzeyine tirozinaz enzimi gluteraldehit varlığında çapraz bağlama yöntemi ile immobilize edildi. Hazırlanan bisfenol-A biyosensörünün en iyi çalışma koşullarını belirlemek amacıyla biyosensörün doğrusal çalışma aralığı, polimer miktarı, gluteraldehit miktarı, pH, sıcaklık, bisfenol-A derişim etkisi, tekrarlanabilirliğin belirlenmesi, raf ömrü süresi ve gerçek örnekler üzerinde bisfenol-A tayinine girişim yapabilecek türlerin etkisi incelendi. Doğrusal çalışma aralığı 0,001µM-0,05µM, polimer miktarı 1mg, gluteraldehit miktarı 30 µl, pH 7,0 ve çalışma potansiyeli -0,10V olarak belirlendi. Hazırlanan biyosensör plastik yiyecek saklama kapları ve plastik su şişelerinde bulunan bisfenol-A tayini için kullanıldı. Yapılan deneyler sonucunda plastik su şişesinde bisfenol-A'ya rastlanılmadı. Plastik saklama kabında bulunan bisfenol-A miktarıda tolere edilebilir günlük alım sınırları içinde kaldı.

Bilim Kodu : 20104

Anahtar Kelimeler : Biyosensörler, karbon pasta elektrot, tirozinaz, bisfenol-A

Sayfa Adedi : 59

Danışman : Prof. Dr. Fatma ARSLAN

PREPARATION OF A NEW BISPHENOL A BIOSENSOR WITH MODIFIED
CARBON PASTE ELECTRODE

(M. Sc. Thesis)

Eylem Ezgi ERGEZER

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

February 2022

ABSTRACT

Bisphenol-A is oxidized to quinone as a result of enzymatic reaction catalyzed by tyrosinase enzyme in the presence of oxygen. The determination of bisphenol-A was based on the electrochemical measurement of p-bisbenzoquinone formed as a result of this enzymatic reaction at -0.10V. In this study, a new biosensor was designed for bisphenol-A determination. Firstly, poly (amidoamine) salicylideneimine palladium (II) (PAMAM-Sal-Pd (II)) doped carbon paste electrode was prepared. Then, the tyrosinase enzyme was immobilized on the modified carbon paste electrode surface by cross-linking method in the presence of glutaraldehyde. In order to determine the best working conditions of the prepared bisphenol-A biosensor, the linear operating range of the biosensor, the amount of polymer, the amount of glutaraldehyde, pH, temperature, the effect of bisphenol-A concentration, the determination of reproducibility, the shelf life period and the effect of the species that can interfere with the determination of bisphenol-A on real samples were examined. The linear working range was determined as 0.001 μ M-0.05 μ M, the amount of polymer 1 mg, the amount of glutaraldehyde 30 μ l, pH 7.0 and the working potential -0.10V. The prepared biosensor was used for the determination of bisphenol-A in plastic food storage containers and plastic water bottles. As a result of the experiments, bisphenol-A was not found in the plastic water bottle. The amount of bisphenol-A in the plastic storage container remained within the tolerable daily intake limits.

Science Code : 20104

Key Words : Biosensors, carbon paste electrode, Tyrosinase, bisphenol-A

Page Number : 59

Supervisor : Prof. Dr. Fatma ARSLAN

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitim süresinde bilgi ve birikimleri ile bana her zaman destek olan ve öğrencisi olmaktan şeref duyduğum danışman hocam Prof. Dr. Fatma ARSLAN 'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım süresinde her türlü konuda yardımını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Halit ARSLAN 'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım süresince her zaman destek ve yardımcı olan Arş. Gör. Onur Can BODUR 'a teşekkür ederim.

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'nın Tanımı	5
2.2. Enzimlerin Tanımı.....	7
2.2.1. Tirozinaz (polifenoloksidaz) enzimi	11
2.3. Biyosensörler	13
2.3.1. Biyosensörlerin sınıflandırılması	15
2.3.2. Biyosensörlerin tanımı ve içerikleri	15
2.3.3. Biyosensörlerin kullanım alanları	17
2.4. Enzim Temelli Biyosensörler	17
2.5. Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemleri	18
2.6. Karbon Pasta Elektrotlar	22
2.7. Kaynak Araştırması	23
3. DENEYSEL KISIM	27
3.1. Deneyde Kullanılan Maddeler ve Üretici Firmalar	27
3.2. Deneyde Kullanılan Çözeltiler	28

	Sayfa
3.3. Deneyde Kullanılan Cihazlar.....	28
3.3.1. Elektrokimyasal analiz cihazları	28
3.3.2. Elektrotlar ve hücre.....	28
3.3.3. pH metre	29
3.3.4. Su banyosu	29
3.3.5. Mikro pipet	30
3.3.6. Saf su üretim cihazı	30
3.4. Bisfenol-A Biyosensörü Hazırlanması ve Optimum Koşullarının Belirlenmesi.....	30
3.4.1. Çalışma elektrodunun hazırlaması: Modifiye karbon pasta elektrot ve karbon pasta elektrot oluşturulması.....	30
3.4.2. CPE'nin sabit akıma getirilmesinin sağlanması	32
3.4.3. CPE ve MCPE' nin bisfenol-A'ya olan duyarlılığının incelenmesi	32
3.4.4. MCPE'ye tirozinaz enziminin immobilize edilmesi.....	32
3.4.5. Çalışma potansiyelinin incelenmesi	33
3.4.6. PAMAM-Sal-Pd (II) miktarının incelenmesi.....	33
3.4.7. Gluteraldehit miktarının incelenmesi	33
3.4.8. Enzim elektrodunun optimum koşullarının incelenmesi	34
3.4.9. BFA tayinine girişim yapabilecek türlerin belirlenmesi	36
3.4.10. Biyosensörün gerçek örnekler üzerinde çalışmasının incelenmesi	36
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	37
4.1. Biyosensörün Optimum Çalışma Aralığının Belirlenmesi	37
4.1.1. CPE ve MCPE elektrotlarının bisfenol-A'ya olan duyarlılığının etkisinin incelenmesi.....	37
4.1.2. Çalışma potansiyelinin etkisinin incelenmesi	38
4.1.3. PAMAM-Sal-Pd (II) polimer miktarının etkisinin incelenmesi	39

	Sayfa
4.1.4. Gluteraldehit miktarının etkisinin incelenmesi	40
4.1.5. pH 'nın etkisinin incelenmesi.....	41
4.1.6. Sıcaklığın etkisinin incelenmesi	42
4.1.7. Bisfenol-A'ya kullanılan substratın derişiminin etkisi.....	44
4.1.8. Tekrarlanabilirliğin belirlenmesi	47
4.1.9. Raf ömrü süresinin bulunması	47
4.1.10. Bisfenol-A tayininde girişim oluşturabilecek türlerin etkisinin belirlenmesi.....	48
4.1.11. Biyosensörün gerçek örnekler üzerinde çalışmasının incelenmesi	49
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	59

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. BFA' nın fiziksel ve kimyasal özellikleri	5
Çizelge 2.2. Geri dönüşüm işaretleri	6
Çizelge 2.3. Biyosensör bileşen içerikleri	16
Çizelge 3.1. Deneyde kullanılan maddeler ve üretici firmalar	27
Çizelge 4.1. Gerçek örneklere biyosensörün uygulanması	50

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. BFA'nın aseton ve fenolden sentezlenme tepkimesi.....	5
Şekil 2.2. Enzimatik tepkime	8
Şekil 2.3. Doğrusal enzim grafiği	9
Şekil 2.4. Michaelis-Menten grafiği	9
Şekil 2.5. Michaelis-Menten denklemi	10
Şekil 2.6. Lineweaver-Burk denklem ve grafiği.....	11
Şekil 2.7. Tirozinaz enziminin aktif bölgesi	11
Şekil 2.8. Tirozinaz enzimi ile monofenollerin hidroksilasyonu ve difenollerin yükseltgenme mekanizması	12
Şekil 2.9. Tirozinaz enziminin organizmadaki görevi	13
Şekil 2.10. Biyosensörlerin şematik gösterimi	14
Şekil 2.11. Biyosensörleri oluşturan bileşenler.....	16
Şekil 2.12. Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	19
Şekil 2.13. Gluteraldehit ile çapraz bağlama tepkimesi.....	21
Şekil 2.14. Grafit tozunun karbon pasta elektroda uygulanması	22
Şekil 2.15. Grafitin molekül yapısı	23
Şekil 3.1. Elektrotların hücreye yerleşimi.....	29
Şekil 3.2. Teflondan yapılmış karbon pasta elektrot.....	29
Şekil 3.3. Modifiye karbon pasta elektrot hazırlanması ve çalışma hücresi şeması	31
Şekil 3.4. Poli (amidodamin) salisilidenimin palladyum	31
Şekil 4.1. BFA tayini için biyosensörün çalışma şeması	37
Şekil 4.2. MCPE-CPE'nin bisfenol-A'ya olan duyarlılığının belirlenmesi.....	38
Şekil 4.3. Çalışma potansiyelinin bulunması	39

Şekil	Sayfa
Şekil 4.4. Polimer miktarının bisfenol-A biyosensörüne karşı olan etkisi.....	40
Şekil 4.5. Gluteraldehit miktarının bisfenol-A biyosensörüne karşı etkisi.....	41
Şekil 4.6. pH'nın bisfenol-A biyosensörüne amperometrik olarak etkisi.....	42
Şekil 4.7. Sıcaklığın bisfenol-A biyosensörüne karşı etkisi	43
Şekil 4.8. Substart miktarının bisfenol-A biyosensörüne karşı etkisi.....	45
Şekil 4.9. Bisfenol-A biyosensörü için oluşturulan kalibrasyon grafiği 1.....	45
Şekil 4.10. Bisfenol-A biyosensörü için oluşturulan kalibrasyon grafiği 2.....	46
Şekil 4.11. Tirozinaz enzimi varlığında oluşan Lineweaver – Burk grafiği.....	46
Şekil 4.12. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi	47
Şekil 4.13. Biyosensörün raf ömrü süresinin bulunması	48

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
°C	Derece Celcius
dk	Dakika
g	Gram
M	Molar derişim
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar derişim
mV	Milivolt
nA	Nanoamper
R ²	Lineer regresyon katsayısı
s	Saniye
V	Volt
Δi	Akım farkı
μA	Mikroamper
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar derişim
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

Kısaltmalar**Açıklamalar****K_m**

Michealis-Menten sabiti

LC

Sıvı kromatografisi

MCPE

Modifiye karbon pasta elektrot

MS

Kütle spektroskopisi

RDS

Bağıl standart sapma

S

Substrat

SPE

Katı faz ekstraksiyonu

UV

Ultraviyole

V_{max}

Maksimum hız

1. GİRİŞ

BFA polimer olmayan plastiklerde ve epoksi reçine yapımında katkı maddesi olarak endüstride sıklıkla kullanılan endokrin sistemlerde bozukluklara yol açan bir kimyasaldır (Ayazgök, 2017). Çevre Koruma Ajansı (U.S EPA), endokrin sistemin işleyişini olumsuz yönde etkileyen maddeleri, hedef reseptör veya dokudaki hormonların etkisini durduran, taklit eden ya da direkt olarak üretimini inhibe eden kimyasallar olarak tanımlamıştır. BFA yapılan çalışmalarda östrojenik özellik göstererek endokrin sistemini olumsuz etkileyen bir kimyasal olarak da tanımlanmıştır (Jalal, 2018).

Bisfenol-A (BFA) ilk kez 1891 yılında Dianin tarafından keşfedilmiştir. 1905 yılında ise Zincke tarafından aseton ve fenolden sentezlenmiştir (Huang, 2012). 1930 yılından itibaren ticari alanlarda kullanılmaktadır (Jalal, 2018).

BFA polikarbonat plastiklerin endüstrilerinde, konserve yapımı, su şişeleri, yiyecek saklama kapları, bebek oyuncakları, biberonları ve emzikleri, CD, DVD, kasa fişleri, diş dolgu macunları, PVC plastik pencerelerde, otomotiv parçaları, toz boya, birçok elektrik ve elektronik parça yapımında vb. alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır (Churchwell, 2014).

BFA insan vücuduna esas olarak yiyeceklerle ve içme suları ile girmektedir. Ayrıca, ev eşyaları, kozmetik ürünleri, medikal ürünler ile vücuda alınımı söz konusudur (Manfo, 2014).

Gıdaların muhafaza edilmesinde kullanılan BFA katkılı konserve ve saklama kaplarının ısıtılması sonucu BFA'nın gıda ürünlerine sızması artmaktadır. Bilimsel sonuçlar düşük BFA derişimlerinin özellikle hamile kadınlarda, embriyo ve çocuklarda hasara yol açtığını bildirmektedir (Doerge, 2010).

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) önceki yıllarda BFA'nın hamileler ve çocuklar için güvenilir olduğunu iddia etmesine rağmen 2010 yılında yeni doğan bebeklerin, fetüslerin ve de küçük çocukların; beyin, davranış ve prostat bezi üzerinde etkileri olduğunu ifade etmiştir. Kanada 2010 Eylül ayında BFA'nın toksik olduğunu açıklayan ilk ülkedir. Kanada Hükümeti BFA'nın bebek biberonlarında kullanımını yasaklamıştır (FDA, 2010). Yapılan hem in vitro hem in vivo çalışmalarda BFA'nın membran östrojen reseptörlerine, G

proteinlerine bağı reseptörlere, 30 farklı tiroid reseptörlerine, östrojenle ilişkili reseptör gamaya bağlanabildiği belirlenmiştir (Cimmino, 2020). BFA artan kısırlık, adet döngüsü bozulması, erken menopoz, meme ve yumurtalık tümörü oluşumu vb. kadın hastalıklarının oluşmasında önemli bir etkidir. BFA androjen reseptör yolu, testiküler atrofi, sperm sayısında ve kalitesinde azalmalara neden olur (Rochester, 2013).

BFA dünyada en yaygın olarak üretilen ve kullanılan kimyasalların başında yer almaktadır. 2002 yılında dünya üzerinde toplam 2,8 milyon ton üretilmiştir. 2011 yılında ise dünyada üretilen miktar 5,5 milyon ton olmuştur. Yıllık %13 artış ile en fazla BFA üretimi gerçekleştiren ülke Asya ülkeleri olmuştur. Hindistan da ise polikarbonatların talebinde %19'luk bir artış söz konusudur (Wang, 2017).

BFA'nın çevresel dağılımı hakkında yapılan çalışmalarda, yüzey sularındaki oranlarının farklı ülkelerin sınırlarından geçen aynı nehirde bile farklı olduğu belirtilmiştir. Çevre koruma ajansı her yıl yaklaşık 450 ton BFA'nın çevreye sızdığını belirlemiştir (Wenzel, 2003).

BFA'nın zararlarından dolayı kullanılan miktarlarda sınırlamalar yapılmıştır. Avrupa gıda güvenliği kurumunun bildirgesinde 50 µg/kg/vücut kütlesi/gün tolere edilebilir günlük doz değeri olarak belirlemiştir (Rahman, 2017). U.S EPA tarafından yan etki göstermeyen doz ve en düşük gözlemlenen etki seviyesi 5 ve 50 mg/kg/vücut kütlesi olarak tanımlanmıştır (Bolt, 2011).

Avrupa Komisyonu 2003, 2008 ve 2010 yıllarında BFA üzerinde detaylı bir risk analizi yapmıştır. Yapılan analizlerde BFA'ya belirli derecelerde maruz kalmanın insanlar ve çevre için bir sorun teşkil etmediği belirtilmiştir. Buna rağmen Fransa BFA içeren bebek biberonu satışını engellemiştir (Özdağ, 2014).

BFA'nın vücuda alındığı zaman oluşturabildiği hasarlar ve çevreye verdiği zararların analizinin yapılabilmesi için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bunlar BFA'nın analizini mümkün kılan amperometrik voltametri, UV, diferansiyel puls, ve elektrokimyasal analiz yöntemleridir (Dündar, 2014).

Ancak BFA'nın tayini için kullanılan bu cihazlar oldukça pahalı ve ulaşımı güçtür. Bu sebeplerden dolayı BFA'nın tayini için daha ucuz, basit, kolay ulaşılabilir, çabuk ve doğru cevaplar verebilen biyosensörler geliştirmek önem teşkil etmektedir.

BFA tayini yapabilmek için birçok biyosensör geliştirilmiştir.

- Pan ve arkadaşları, grafen–altın nano parçacıklı ve tirozinaz bazlı BFA'nın tespiti için hazırlanan yeni bir biyosensör oluşturmışlardır. Hazırladıkları yeni biyosensörü BFA'nın tayininde diferansiyel puls yöntemini kullanarak uygulamaya geçirmişlerdir (Pan, 2015).
- Koçak ve arkadaşları, PAMAM-Sal-Pt (II) katkılı yeni bir karbon pasta elektrot hazırlamışlardır. Hazırladıkları yeni biyosensörü BFA'nın tayininde amperometrik voltametri yöntemini kullanarak tayin etmişlerdir (Koçak, H.2020).
- Wu ve arkadaşları, tirozinaz enzimini tampon çözeltisine doğrudan ekleme yapmak yerine tek bir tirozinaz molekülünün ince bir ağ polimer kabuğuna kapsüllenmesi ile tirozinaz nanokapsülleri (nTyr) hazırlamışlardır. Nanokapsülün başarılı olup olmadığını ise kare dalga voltametrisi yöntemini kullanarak belirlemişlerdir (Wu. L, 2020).
- Messaound ve arkadaşları, BFA'nın belirlenebilmesi için ksantin oksidaz (XOD) enzimatik inhibisyonuna dayalı yeni ve basit bir biyosensör geliştirmişlerdir. Hazırladıkları biyosensörü BFA'nın tayininde UV yöntemini kullanarak tayin etmişlerdir (Messaound, 2018).

Biyosensör tasarımında kullanılan elektrot yüzeyi önemlidir. Bu çalışmada diğer çalışmalardan farklı olarak ilk kez sentezlenen ve karakterize edilen PAMAM-Sal-Pd(II) bileşiği kullanılmıştır. Elektrot yüzeyine tirozinaz enzimi çapraz bağlama yöntemi kullanılarak immobilize edilmiştir. Hazırlanan modifiye karbon pasta elektrot ile bisfenol-A'nın amperometrik olarak ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Modifiye edilen biyosensörle yapılan deneyler sonucunda iletkenliğinin karbon pasta elektroda göre yaklaşık iki kat daha fazla olduğu, doğrusal çalışma aralığının oldukça geniş ve alt tayin sınırının düşük olduğu belirlenmiştir.

Geliştirilen biyosensörün avantajları,

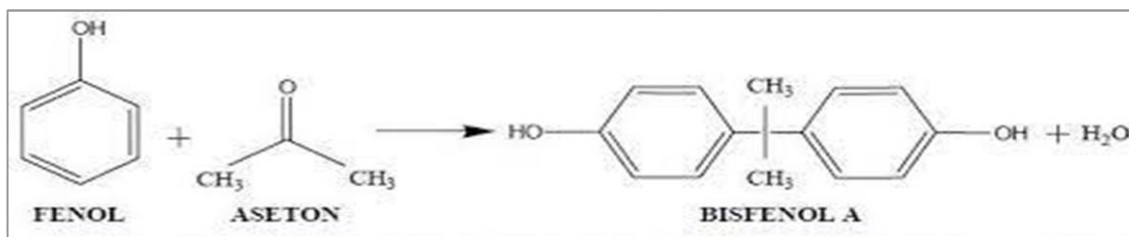
- Kolay ve hızlı hazırlanabilmesi,

- Cevap süresinin kısa olması,
- Oldukça geniş bir doğrusal bölge çalışma aralığının olması,
- Alt tayin sınırının düşük olması küçük derişimlerde madde miktarlarının tayinini mümkün kılması,
- Tekrarlabilirliğinin iyi olması,
- Raf ömrünün uzun olmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bisfenol-A'nın Tanımı

Kimyasal adı 2,2- bi (4-hidroksifenil) propan olarak bilinen bisfenol-A (BFA) ilk olarak 1891 yılında Dianin tarafından 1905 yılında ise Zincke tarafından aseton ve fenolden sentezlenmiştir (Şekil 2.1). 1930 yılından itibaren ticari alanlarda kullanılmaktadır. BFA genelde %99,8-99 saflıkta kullanılmaktadır (Jalal, 2018).



Şekil 2.1. BFA'nın aseton ve fenolden sentezlenme tepkimesi (Dündar, 2014).

BFA dünya üzerinde geniş üretim alanı olan bir kimyasaldır. Renksiz bir katı olan BFA sudaki çözünürlüğü düşük olmasına karşın organik çözücülerde iyi çözünen bir kimyasal maddedir. BFA genel olarak bağlanma, plastiğin sertleştirilmesi, plastikleştirme ve dolgu materyali olarak kullanılmaktadır (Fernandez, 2007).

BFA yüksek saflıkta polikarbonat imalatında ve daha düşük saflıkta epoksi reçine imalatında kullanılmak üzere iki farklı kalitede üretilmektedir (Bahadır, 2011). Yaşamın her alanında sıklıkla kullanılan plastiklerin canlılara ve çevresine vermiş olduğu zararları daha iyi kavrayabilmek için kimyasal yapı içeriği (Çizelge 2.1) ve geri dönüşüm bilgilerine (Çizelge 2.2) bakmak fayda sağlayacaktır. (Dündar, 2014).

Çizelge 2.1. Bisfenol-A'nın kimyasal ve fiziksel özellikleri

Molekül Formülü	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Molekül Kütlesi	228,29 g/mol
IUPAC Numarası	4,4'-(propane-2,2-diyl)diphenol
Erime Noktası	158°C
Kaynama Noktası	360°C
Yoğunluk	1,2 g/cm ³
Suda Çözünebilirlik	120-300 mg/L

Çizelge 2.2. Geri dönüşüm işaretleri

AMBALAJLARIN ÜZERİNDE GÖRDÜĞÜNÜZ İŞARETLERİN ANLAMLARI			
	Üzerinde bulunan ambalajın geri dönüştürülebilir malzemeden olduğunu gösterir.		Yeşil Nokta Ürünün ambalajı üzerinde bulunan "Yeşil Nokta" amblemi, o ambalaj piyasaya süren marka sahibinin, Ambalaj Atıklarının Kontrolü Yönetmeliği uyarınca geri kazanım sorumluluğunu ÇEVKO'ya devrettiğini gösterir. ÇEVKO ülkemizde faaliyet gösteren bir yetkilendirilmiş kuruluş olarak yeşil nokta işaretinin tek temsilcisidir. Bu işaretin boyutu ve rengi ambalaja uygun olarak farklılık gösterebilir.
	Çevre ve Orman Bakanlığından piyasaya süren kod numarası alan işletmeler koduyla birlikte işareti gösterildiği şekli ile kullanabilir.		Patlayıcı ürün içermektedir.
	Ürünün geri dönüştürülmüş maddeden elde edildiğini gösterir.		Oksitleyici ürün içermektedir.
	Polietilen tereftalat malzemesinden imal edildiğini gösteren kod 1'dir.		Alevlenebilir ürün içermektedir.
	Yüksek yoğunluklu polietilen malzemesinden imal edildiğini gösteren kod 2'dir.		Toksik ürün içermektedir.
	Polivinil Klorür malzemesinden imal edildiğini gösteren kod 3'tür.		İçerisindeki ürün deriyle teması halinde tahriş edebilir.
	Düşük yoğunluklu polietilen malzemesinden imal edildiğini gösteren kod 4'tür.		Solunum yolu enfeksiyonuna neden olabilecek ürün içermektedir.
	Polipropilen malzemesinden imal edildiğini gösteren kod 5'tir.		Kullanımı sonrasında doğaya bırakılmamalıdır. Çevreye zararlı ürün içermektedir.
	Polistiren malzemesinden imal edildiğini gösteren kod 6'dır.		Sağlığa zararlı ürün içermektedir.
	Yukarıda saydığımız plastik malzemelerinin dışında bir malzemeden imal edildiğini gösteren kod 7'dir.		Sıkıştırılmış gaz içermektedir.
	Kağıt/karton malzemesinden imal edildiğini gösteren kod numaraları 20,21,22...39'dur.		Toksik madde içeren ambalajlar üzerinde görme engelli kişiler için bu sembol kabartma efekti verilerek dokunsal işaret olarak yer alır.
	Metal bir malzemeden imal edildiğini gösteren geri dönüşüm kod numaraları 40,41...49'dur.		Ürünün Rus ulusal standartlarında göre uygun kalitede olduğunu gösteren simgedir.
	Kağıt/karton malzemeden imal edildiğini gösteren geri dönüşüm kod numaraları 70,71,72...79'dur.		EN 13432'ye göre kompostlanabilir üründür.

2.2. Enzimlerin Tanımı

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki tepkimeleri hızlandıran biyokimyasal katalizörlerdir. Enzimler biyokimyasal olayların canlı vücudunda hayatla uyumlu bir şekilde süre gelmesini sağlayan kimyasal ajanlardır.

Enzimler aracılığıyla katalize edilen tepkimelere katılan kimyasal moleküllere substrat denir. Enzimler spesifik kimyasal tepkimelerin hızlanmasını sağlarlar. Substratları için yüksek oranda spesifikliğe sahiptirler. Sulu çözeltilerde uygun sıcaklık ve pH'da optimum fonksiyon gösterirler.

Biyolojik kataliz 1800'lü yıllarda mide salgılarıyla etin sindirilmesi, tükürük ve çeşitli bitki özleri ile nişastanın şekere dönüştürülmesinin incelenmesi ile tanınmıştır (Dündar, 2014).

Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç bütün enzimler proteindir. Bu nedenle enzimler, proteinlere ait tüm yapısal özellikleri gösterir. Enzimler, diğer proteinler gibi 12 000'den 1 000 000 kilodalton (kDa) ve üzerine kadar değişen molekül kütesine sahiptir.

Bazı enzimler aktivite gösterebilmek için, protein yapılarını oluşturan amino asit kalıntılarından başka kimyasal maddeye ihtiyaç duymazlar. Bazı enzimler ise kofaktör olarak bilinen ek bir kimyasal maddeye gereksinim duyarlar. Kofaktörler, Fe^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} ve Zn^{+2} gibi bir veya daha fazla inorganik iyon ya da koenzim (FAD^+ , NAD, KoenzimA gibi) denen organik veya metalloorganik kompleks bir moleküldür.

Kofaktörü ile birlikte katalitik olarak aktif olan bir enzim holoenzim olarak adlandırılır. Holoenzimin bir protein birde kofaktör kısmı vardır. Protein kısmına apoenzim adı verilir. Enzime çok sıkı bir şekilde bağlı olan koenzimlere prostetik grup denir [Altınışık, 2009].

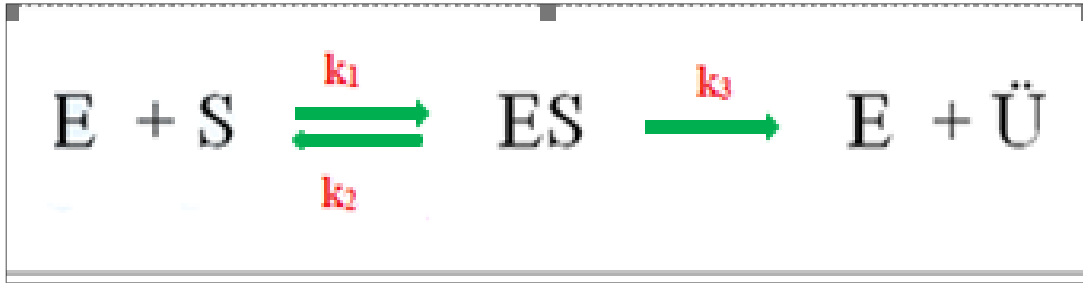
Enzimlerin sınıflandırılması;

- Oksidoredüktazlar: İndirgenme ve yükseltgenme tepkimelerini katalize eden enzimlerdir.
- Transferazlar: Fonksiyonel grupların bir molekülden diğerine transferini katalize ederler.
- Hidrolazlar: Su katılması suretiyle bağların parçalandığı hidroliz tepkimelerini katalize ederler.

- Liyazlar: Oksidasyon veya hidrolizden başka yollarla bağları yıkar veya oluştururlar.
- İzomerazlar: Bir molekül içindeki rasemizasyon veya epimerizasyon, cis-trans izomerizasyon olaylarını katalize ederler.
- Ligazlar: Enerji bakımından zengin bağın hidrolizi ile iki molekülün birbirine bağlanmasını katalize ederler.

Enzimatik tepkimelerin hızlarının deneysel parametrelerdeki değişmelerle nasıl değiştiklerinin incelenmesi, enzim kinetikleri olarak bilinir.

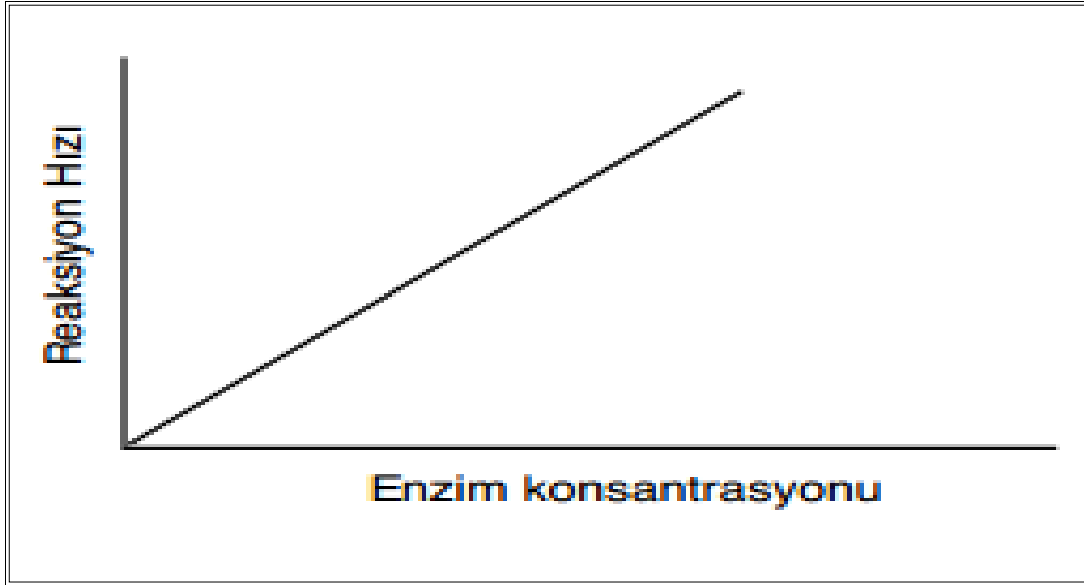
Enzimatik bir tepkime,



Şekil 2.2 Enzimatik tepkime.

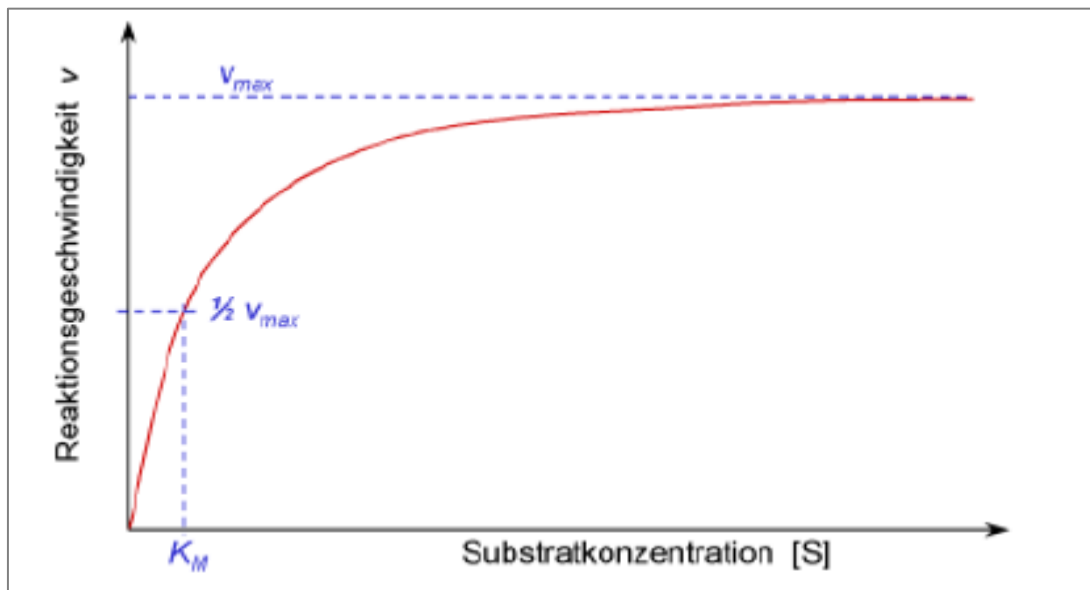
Bu şekilde gösterilen, E ve S'den k_1 hızı ile ES kompleksi oluşurken; ES'nin ayrışması ise k_2 hızındaki geri tepkimeleri ve k_3 hızı ile enzim ve ürünün ayrışması oluşur (Şekil 2.2).

Tepkime kararlı duruma geldiği zaman ‘‘Kararlı Durum İlkesi ‘’ne göre ES'nin oluşması ayrışmasına eşit olur ve derişimi değişmez (Lineweaver, 1934). Substratın çok bol olduğu bir ortamda optimum şartlarda enzimatik bir tepkimenin ölçülen ilk hızı (V_0), enzim derişimi $[E]$ ile doğru orantılıdır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Doğrusal enzim grafiği

Enzim derişimi ve diğer tüm şartların sabit kaldığı çok küçük substrat derişimlerinde bile enzim molekülünün birçoğu serbest hale geçer. ES kompleksi az miktarda oluşur ve ürüne dönüşen substrat miktarı azdır veya tepkime hızı küçüktür. Substrat derişiminin belirli oranlarda artması ile enzim molekülünün yarısının serbest kalıp yarısının ES kompleksi oluşturduğu yarı maksimum hız ($1/2 V_{max}$) noktasına ulaşılır. Substrat derişiminin belirli artışlarının devamında enzim molekülünün hepsinin ES kompleksi oluşturduğu bir noktada tepkime hızı maksimumdur (V_{max}) ve bu noktadan sonra substrat derişiminin artışı ile tepkime hızı artmaz (Şekil 2.4) (Spille, 1997).



Şekil 2.4. Michaelis-Menten grafiği

Enzim derişimi ve diğer bütün şartların sabit olduğu bir ortamda enzimatik tepkimenin hızı, substrat derişiminin artırılmasıyla başlangığta doğrusal bir artış gösterir; fakat substrat ilave edildikęe hız lineerlikten saparak belirli bir V_{max} düzeyinde sabit kalır.

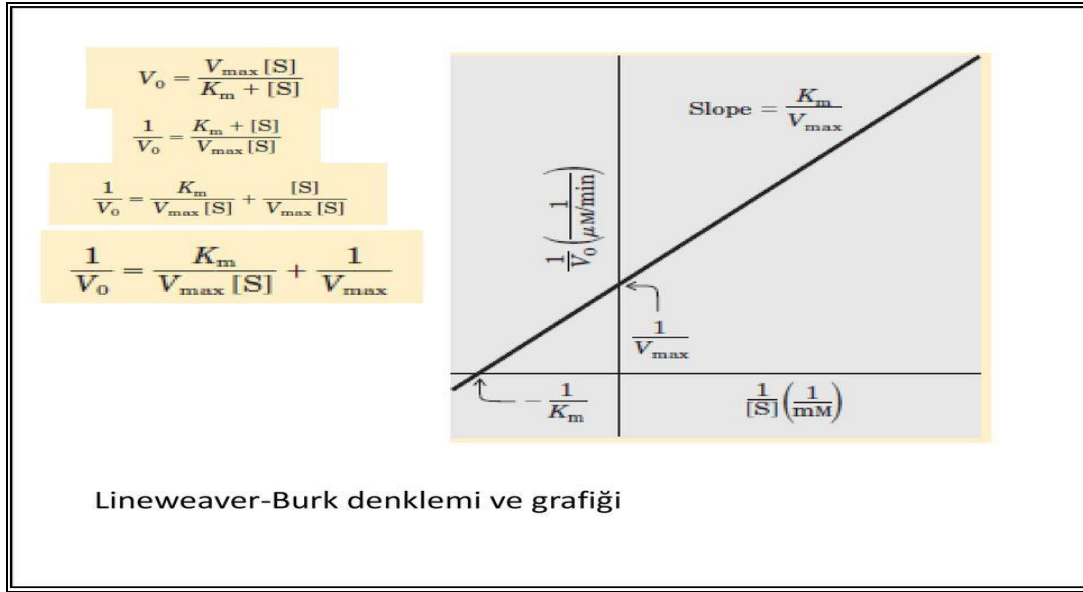
V_{max} noktasındaki substrat derişimlerinde enzimin doygunluk noktasında olan ve bunun üzerinde değerler olabileceğinden ölçülmesi pratik olarak zordur. Buna karşılık enzimatik bir tepkimede enzim moleküllerinin yarısının substrata doyduğu ve böylece yarı maksimum hızın ($1/2 V_{max}$) gözleendiği noktadaki substrat derişimi ölçülebilir. Bir enzimatik tepkimede enzim moleküllerinin yarısının substrata doyduğu ve böylece yarı maksimum hızın gözleendiği noktadaki substrat derişimine “Michaelis-Menten sabiti” denir ve K_m ile gösterilir.

Enzimatik bir tepkime için V_o , V_{max} , K_m ve $[S]$ arasındaki ilişki, “Michaelis-Menten denklemi” ile ifade edilir (şekil 2.5).

$V = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]}$ Michaelis-Menten denklemi	V : Reaksiyon hızı V_m : Maksimum hız K_m : Michaelis-Menten sabiti $[S]$: Substrat konsantrasyonu
--	---

şekil 2.5. Michaelis-Menten denklemi

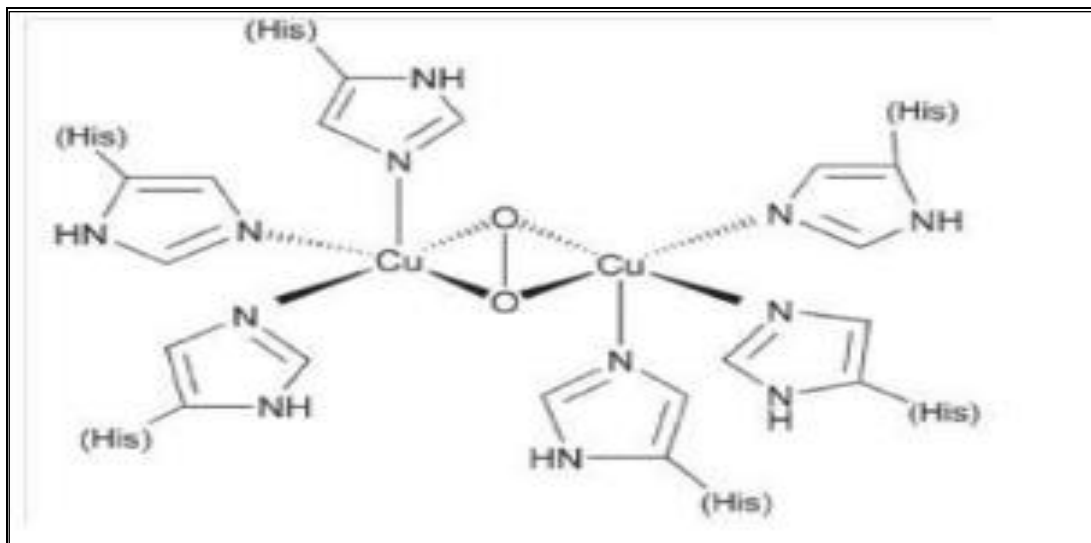
Michaelis-Menten denklemi bir hiperbolik eğrinin denklemi olduğu için ve hiperbolik eğrinin karakteristik noktalarını belirlemek zor olduğundan bir enzime ait V_{max} ve K_m 'yi deneysel olarak incelemeyi kolaylaştırmak için grafiği doğrusal olan başka denklemler önerilmiştir. Önerilen bu denklem Michaelis-Menten denklemini tersine çevirip çarpanlarına ayırmakla elde edilen Lineweaver-Burk denklemidir (şekil 2.6) (Altınışık, 2009).



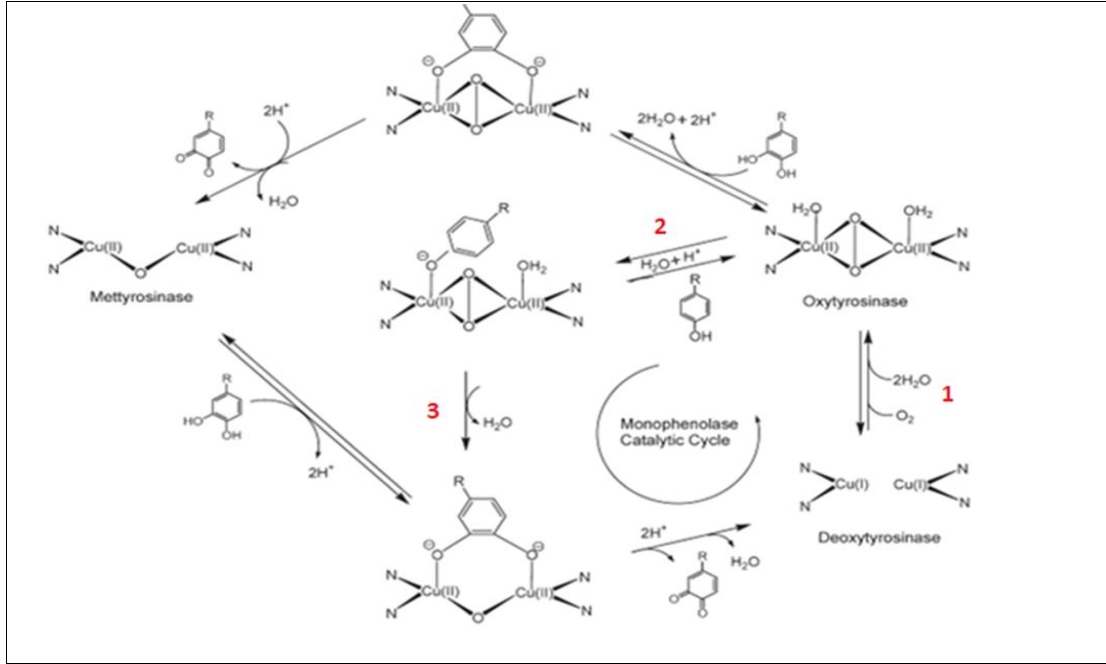
Şekil 2.6. Lineweaver-Burk denklem ve grafiği

2.2.1. Tirozinaz (polifenoloksidaz) enzimi

Tirozinaz (polifenoloksidaz) (EC.1.14.18.1) olarak bilinen oksidoredüktaz sınıfında olan bir enzimdir. Gelişmiş bitkilerde, mantarlarda ve hayvanlarda olan moleküler oksijeni kullanarak, monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonu, o-difenollerinde o-kinonlara oksidasyonunu katalizleyen bir enzimdir. Enzimin aktif bölgesinde histidin aminoasidi içeren altı adet azot atomu ile çevrelenmiş bir çift bakır atomu moleküler oksijen ile etkileşim halindedir (Şekil 2.7) (Garcia-Molina,2007).



Şekil 2.7. Tirozinaz enziminin aktif bölgesi (Garcia-Molina, 2007).



Şekil 2.8. Tirozinaz enzimi ile monofenollerin hidroksilasyonu ve difenollerin yükseltgenme mekanizması (Kim, Y. J. & Uyama, H, 2005).

Tirozinaz katekolaz ve krezolaz olmak üzere iki farklı aktivite gösterir. Tirozinaz enzimi ilk kez Schoenbein tarafından 1856 yılında yenilebilir mantarlarda bulunduğu keşfedilmiştir (Laemmli, 1970).

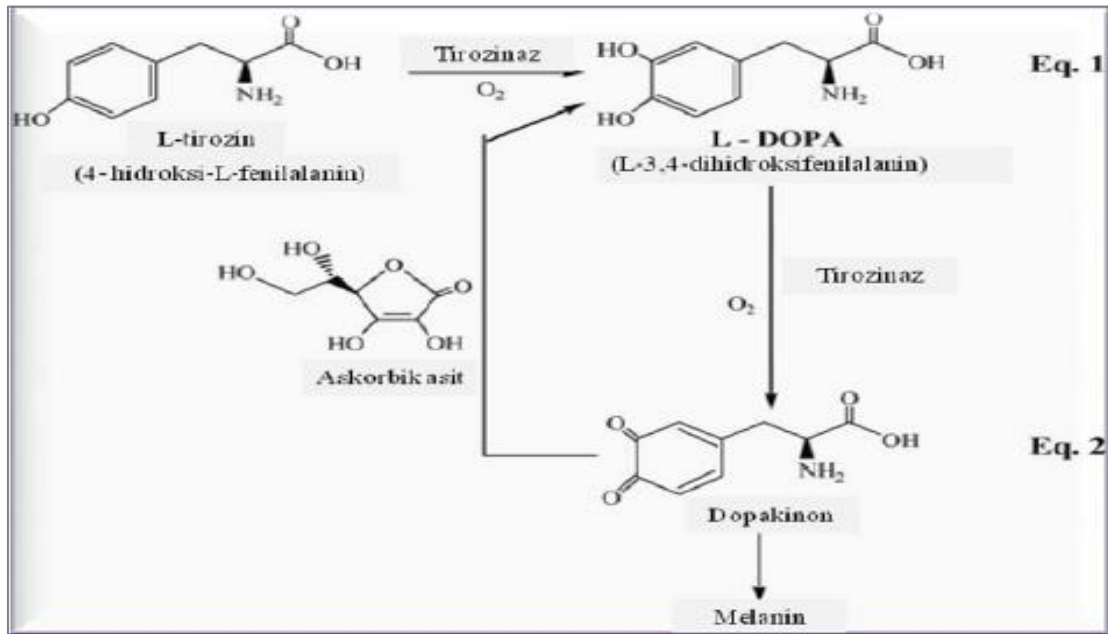
Tirozinaz ve polifenoller bitkilerde sıklıkla bulunmaktadır. Bitkilerin viral ve mikrobiyal enfeksiyonlara ve olumsuz iklim şartlarına karşı dirençli olmasını sağlar. Gıda teknolojisinde tirozinaz enzimi önemli bir role sahiptir. Tirozinaz içeren bazı gıda maddeleri patlıcan, ananas, çay, enginar, muz, çilek ve elma olarak sayılabilir (Spille, 1997).

Tirozinaz enzimi bitkilerin yanı sıra çeşitli mikroorganizmalarda, özellikle mantarlarda ve bazı hayvansal organizmalarda bulunabilmektedir (Vámos-Vigyázó, 1981).

Tirozinaz, kağıt sanayi ve kağıt hamuru, tekstil sanayi, ilaç sanayi ve çevre teknolojileri uygulamaları için çok kullanışlı bir enzimdir. Tirozinaz enziminin esmerleşme etkileri çeşitli faydalı amaçlar için kullanılmaktadır. Antioksidan ve besin renklendirici biyosentezi gıda sektöründe renk oluşumu, kakao, çay ve kahve gibi lezzetlerin geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca şeker pancarı, askorbik asit tayini, pektin jelleşme ve biyosensör olarak uygulanmaktadır (Şimşek, 2007).

Enzimatik esmerleşme genellikle bitkilerde ve meyvelerde doğal olarak bulunan polifenol oksidaz enziminin varlığından kaynaklanır. Meyve ve sebzeler normal formlarında oksijen ile temas halinde olmadığı için bir kararına söz konusu olmaz. Ancak meyve ve sebzeler zedelendiği ya da kesildiği zaman, enzimler oksijen varlığında fenolik bileşiklerle temasa geçerek renkli bileşikler oluşturur.

Tirozinaz o-hidroksilasyonu DOPA'ya (3-4 dihidroksifenilalanin) katalize eder ayrıca DOPA'yı dopakinona oksitler. Bu süreç melanin pigmentleri üretmek için bir dizi enzimatik tepkimeyle devam eder (Şekil 2.8) (Lerner, 1950).



Şekil 2.9. Tirozinaz enziminin organizmadaki görevi (Aytan, 2009).

2.3. Biyosensörler

Biyosensörler biyokimyasal moleküllerin kullanılmasıyla ölçülecek maddeye karşı seçici özellik gösteren, numunelerin yapı ve yoğunluk bilgilerini ölçülebilir ve işlenebilir elektrik sinyaline dönüştüren biyoanalitik cihazlardır. Sıcaklık, pH gibi fiziksel sınırlandırmalardan etkilenmemeleri, geri dönüştürülebilir olmaları ve ileri düzeyde spesifik olma gibi özelliklere sahip olmaları oldukça önemlidir (Tang, 2006).

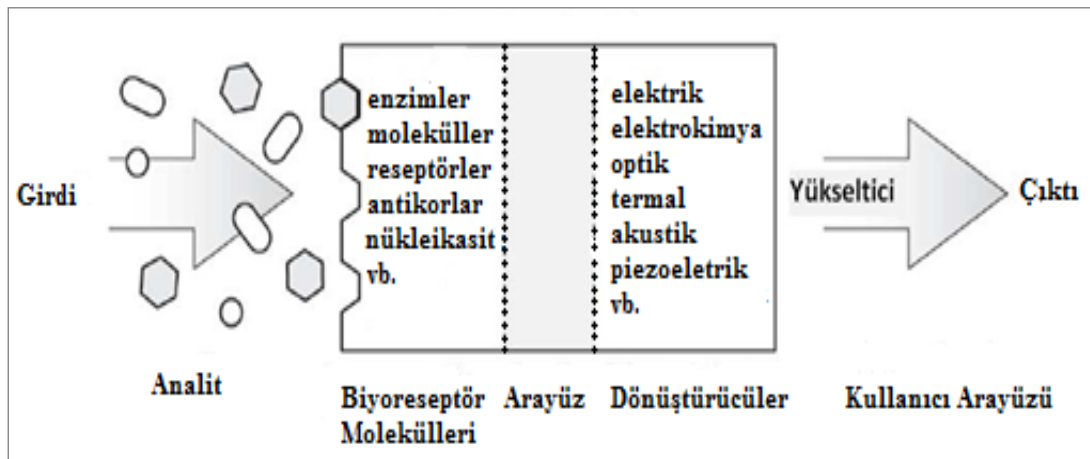
Günlük hayatta farkında olmadan yüzlerce sensör kullanılmaktadır. Kameralar, MR görüntüleme cihazları, glukozetreler, yakıt miktarını bildiren sensörler, mikrofonlar,

sıcaklık ve nem bildiren saatler, sensörlü lambalar, hız sensörleri en yaygın olarak kullanılan sensör çeşitleridir (Rittersma, 2002).

Bütün canlılar vücudunda bulunan kimyasal ve fiziksel biyosensörler ile çevresiyle iletişim halindedir. Canlı vücudunun kendisi bir biyosensördür. Canlı bünyesinde bulunan organik ve inorganik maddelerin dengesi bozulduğunda ya da yabancı bir madde vücuda girdiğinde çeşitli hastalıklara yol açmaktadır. Vücutta bulunan maddelerin miktarlarında değişiklik olduğunda canlı vücudu bir sensör gibi tepki vermektedir (Klonoff, 2005).

Canlılar yaşamlarını sürdürebilmek için yaşadıkları ortamda meydana gelen değişiklikleri algılayıp en kısa sürede adapte olmak zorundadır. Bu davranışları sayesinde dışarıdan gelebilecek tehlikelere karşı koruyucu bir kalkan oluşturmak için saf enzim, doku ve mikroorganizma özelliğine sahip doğal sensörleri kullanırlar. Canlılarda doğal olarak var olan algılama mekanizması bilim insanları tarafından örnek alınarak biyosensörler elde edilmiştir (Tüylek, 2017).

Biyosensörler analit (analizi yapılmak istenen madde veya materyal), biyolojik algılayıcılar (antikorlar, nükleik asitler, mikroorganizmalar, enzimler, dokular ve hücreler gibi algılayıcılardır.) ve dönüştürücüler (optik fiberler, elektrotlar, transistörler, termistörler) olmak üzere üç kısımdan oluşur (Şekil 2.9) (Velasco-Garcia, 2003).



Şekil 2.10. Biyosensörlerin şematik gösterimi (Nice,1999).

Biyosensör çalışmaları her geçen gün hızla artmakta ve gelişmektedir. Çalışmaların hızla artmasının sebebi ise boyutlarının küçük, uygulama alanlarının fazla, kısa sürede doğru sonuçlar vermesi ve ucuz olmasıdır (Nice,1999).

2.3.1. Biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörler tayin yöntemine göre ve biyokimyasal moleküle göre iki alt sınıfta incelenebilir.

Biyokimyasal moleküllere göre,

- Enzim sensörleri,
- Nükleik asit biyosensörleri,
- İmmün sensörler,
- Mikrobiyal sensörler olmak üzere dört sınıfa ayrılır (Koçak. H, 2020).

Tayin yöntemine göre,

- Elektrokimyasal Biyosensörler: Amperimetrik, Potansiyometrik, Empedans ve Voltmetrik olarak dört farklı sınıfa ayrılır.
- Kalorimetrik Biyosensörler: Termistörlerdir.
- Optiksel Biyosensörler: Fotometri, Florometri ve Biyoluminesans olarak üç farklı sınıfa ayrılır.
- Piroelektrik Biyosensörler: Kuartz Kristalmikrobalans ve Mikrokantileverlar olmak üzere iki sınıfa ayrılır.

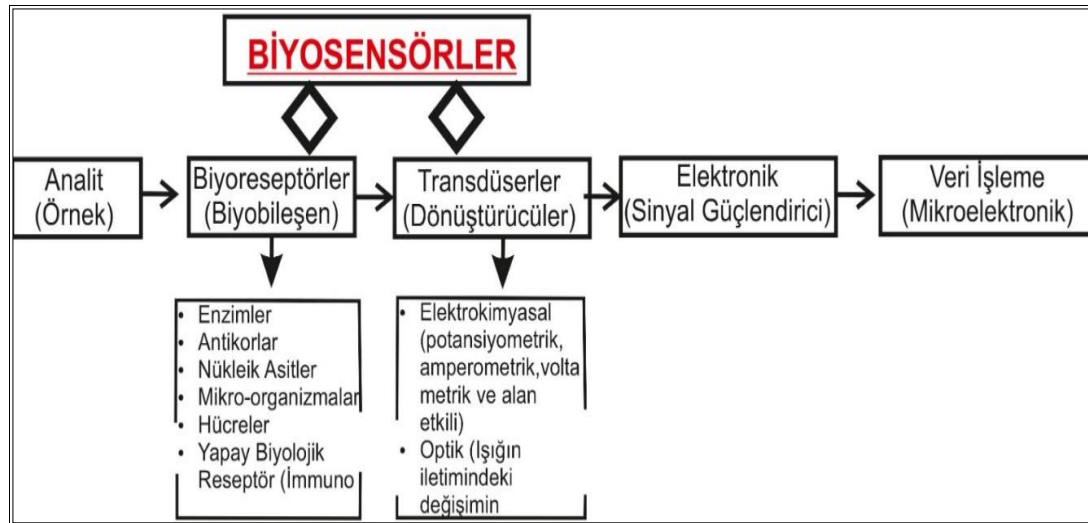
2.3.2. Biyosensör tanımı ve içerikleri

Biyosensörler, biyobileşenlerin (reseptör) ve fiziksel bileşenlerin (transducer) bir araya gelmesi ile oluşur. Reseptörler, biyomoleküler yapıya sahip olduklarından biyoreseptör olarak tanımlanırlar. Biyoreseptörler analizi yapılacak madde ile seçici olarak etkileşime girebilen oldukça duyarlı biyolojik yapıya sahiptir. Biyoreseptör yapılarda, canlı biyolojik sistemleri (mikroorganizma, doku ve hücre gibi) veya biyolojik moleküller (enzim, protein, antikor, nükleik asitler gibi) sistemleri kullanılır (Çizelge 2.3) (Scott, 2012).

Çizelge 2.3. Biyosensör bileşen içerikleri

Analit (Örnek)	Biyobileşen (Reseptör)	Sinyali İleten Sistem
Metaller		Elektrokimyasal Esaslı
Hormonlar	Enzimler	Elektrokimyasal Esaslı
Enzim	Antikorlar	Yan İletken Esaslı
Koenzimler	Hücre	Optik Esaslı
Substrat	Doku kesitleri	Fotometri Esaslı
Aktivatör	Reseptörler	Flüorometri Esaslı
Inhibitör	Mikroorganizmalar	Flüorometri Esaslı
Antikor -Antijen	Nükleik asitler	Piezoelektrik Esaslı
Nükleik Asit	Lipitler	Kuartz Kristal Mikrobalsans
Mikroorganizmalar	Hücre organelleri	Mikrokantileverler
Glukoz	Glukoz oksidaz	Amperometrik
L-aminoasitler	Hors erodis , peroksidad	Potansiyometrik
Herbist	Antibadiler	Piezoelektrik quartz kristal

Biyosensörler, analizi yapılmak istenen maddeler ile isteğe bağlı olarak biyoaktif bileşenlerin etkileşmesi sonucunda elde edilen sinyalleri ileten iletici bir düzenek ile bağlantılı olup ölçüm düzenekleri ile beraber kullanılmasıyla oluşur. Oluşturulan sistemde mikroişlemci, yükseltici, dijital görüntüleyici gibi cihazlara gereksinim olduğunda sonradan ilave edilebilmektedir. Sonradan ilave edilebilen bu cihazlar, biyobileşenlerin biyolojik fonksiyonlarını ölçebilme özelliklerine bağlı olarak fiziksel sinyale dönüştürür. Oluşan biyokimyasal tepkimeye uygun fiziksel büyüklük seçilir. Fiziksel büyüklük (transduser) olarak sistemde kullanılan elektrotlar potansiyometrik ve amperometrik gibi ölçme işlemlerinde kullanılır (Şekil 2.10) (Zhou, 2006).



Şekil 2.11. Biyosensörleri oluşturan bileşenler

Kullanışlı ve doğru cevap verebilen bir biyosensör yapılabilmesi için aşağıda verilen maddeler dikkate alınmalıdır (Stetter, 2002).

- Kullanılacak olan enzimin, analite karşı ilgisinin yüksek ve normal saklama koşullarında stabil olması gerekmektedir.
- Tepkimenin gerçekleştiği ortamda fiziksel olaylardan (pH, karıştırma, sıcaklık gibi) etkilenmemeli ve fiziksel olaylardan bağımsız olmalıdır.
- Analiti tanıyan biyobileşenler kullanılmalıdır.
- Biyosensörün verdiği cevap duyarlı, kesin, tekrarlanabilir ve lineer olmalıdır.

2.3.3. Biyosensörlerin kullanım alanları

Günümüz teknolojiyle birlikte sürekli gelişen ve kullanım alanları oldukça fazla olan biyosensörlerin birçok uygulama alanı bulmaktadır. Tıp, tarım, hayvancılık, gıda endüstrisi, çevre koruma, atık kontrolü, askeri uygulamalar gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır.

Biyosensörlerin kullanım alanları çoğunlukla insan sağlığını doğrudan ilgilendiren konularda teşhis amaçlıdır. Hayati önem taşıyan kullanım alanlarından bazıları;

- İlacın kanda uzun süreli ve belirli miktarlarda bulunması gereken durumlarda ilacın kandaki yoğunluğunun periyodik takibi,
- Belirli bir bölgede yayılan bulaşıcı hastalıkların erken teşhisi,
- Kapalı ortamlarda zehirli gazların anlık olarak ölçülmesi,
- Vücutta bulunan uyuşturucu maddelerin ya da yüksek dozdaki ilaçların teşhis edilmesi,
- Kritik ameliyatlarda veya yoğun bakım ünitelerinde ilaçların miktarlarını ayarlayabilmek için ilacın kandaki yoğunluğunun anlık olarak tespit edilebilmesidir (Lobo, 1997).

2.4. Enzim Temelli Biyosensörler

Biyosensörler analiz edilecek madde-biyoaktif bileşen ilişkisine göre incelendiğinde biyokatalitik esaslı ve biyoafinite esaslı olmak üzere ikiye ayrılır (Akyılmaz, 2008).

- Biyokatalitik esaslı biyosensörler: Mikroorganizma ve Enzimlerin kullanıldığı,

- Biyoafinite esaslı biyosensörler: Reseptör-Ligand ve Antikor-Antijen, Enzim-Substart gibi etkileşimlerin kullanıldığı biyosensörlerdir.

Biyosensörlerin tarihsel geçmişine bakıldığı zaman bu alandaki ilk çalışmaların enzim sensörleriyle başladığı görülmektedir. 1962 yılında Clark ve Lyons, 1967 yılında ise Updike ve Hick tarafından bildirilen glukoz tayinine yönelik kullanılan glukoz oksidaz enzim elektrotları bu konudaki yapılan çalışmaların ilk örnekleridir (Akyılmaz ve Yorganci, 2008).

Biyosensör teknolojisindeki ilk örnekler potansiyometrik ve amperometrik temelli enzim elektrotları şeklinde ortaya çıkmıştır. Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyolojik materyaller basitten karmaşığa doğru sıralandığında; iyonoforlar, antikorlar, enzimler, lipozomlar, biyomembran parçaları (reseptör), hücre organelleri (mitokondri), doku veya tüm hücreler ve organlar şeklindedir.

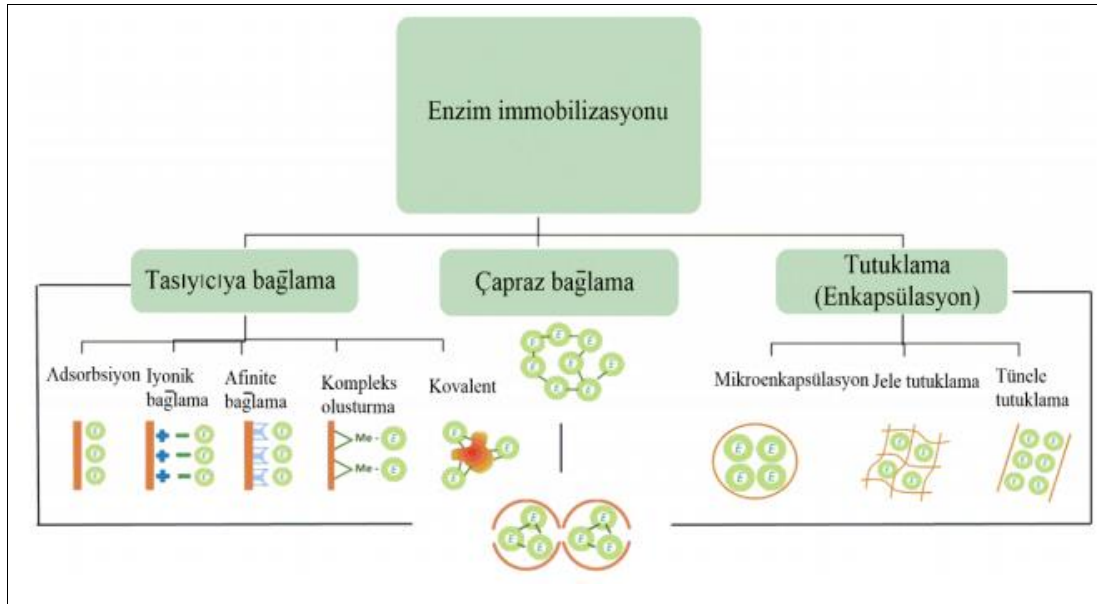
Diğer tüm biyosensörlerdeki gibi enzim sensörleri de biyoaktif tabaka, iletici ve ölçüm sistemlerinden oluşur. Diğer biyosensörlerden tek farkı biyoaktif tabakada biyomolekül olarak enzimlerin yer almasıdır. Enzim biyosensörleri biyoaktif tabakanın iç ve dış yüzeyinde membranlar, iletici ile ölçüm düzeneği arasında sinyal yükselticiler, mikro işlemciler, ölçüm düzeneği ile bağlantılı kaydedici veya bilgisayar sistemleri gerekliliklerine göre eklenebilmektedir (Dzyadevych, 2008).

2.5. Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemleri

Gelişen teknoloji ile immobilizasyon işlemleri sırasında karşılaşılabilecek sorunlara etkili ve çabuk çözümler getirilmiştir. Fakat her enzim için farklı metotlar geliştirilmemiştir. Uygulanacak immobilizasyon yöntemi belirlenirken, kullanılan enzimin kimyasal yapısı, substrat ve ürün özellikleri, oluşan ürünün kullanım alanları dikkate alınmalıdır (Şekil 2.11). İmmobilizasyon işlemi yapılırken enzimin aktif bölgesinde bulunan grupların kimyasal yapısıyla etkileşime girmeyecek ve enzimde aktivite kaybına neden olmayacak yöntemler seçilmelidir. İmmobilizasyon işlemi yapılırken enzimin aktif bölgesi koruyucu gruplar tarafından korunur. Bağlanma sonunda koruyucu gruplar enzime zarar vermeden ortamdan uzaklaştırılır (Uhlrig, 1998).

Enzim immobilizasyonunun avantajları aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- pH, sıcaklık gibi çevre koşullarına daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılır.
- Tepkime sonunda ortamdan kolaylıkla uzaklaştırılabilir böylece ürünler enzim tarafından kirletilmez.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
- Birbirini takip eden çok adımlı tepkimeler için uygundur.
- Enzimin kendi kendini parçalama olasılığı düşüktür.
- Bazı durumlarda serbest enzimlerden daha yüksek aktivite gösterir.



Şekil 2.12. Enzim immobilizasyon yöntemleri (Vaghari, H, 2016).

İmmobilizasyon yöntemleri taşıyıcıya bağlama, çapraz bağlama ve tutuklama olarak üç ana başlıktan oluşur (Telefoncu, 1997).

1-Taşıyıcıya bağlama: En eski immobilizasyon yöntemidir. Enzimlerin suda çözünmeyen bir taşıyıcıya bağlanması ile oluşturulur. Bağlanan enzim miktarı ve immobilizasyon sonrası enzim aktivitesi taşıyıcının yapısına bağlıdır.

Hidrofilik guruplardaki ve bağlanan enzim derişimindeki artış immobilize enzimin aktivitesini arttırmaktadır. Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar dekstran,

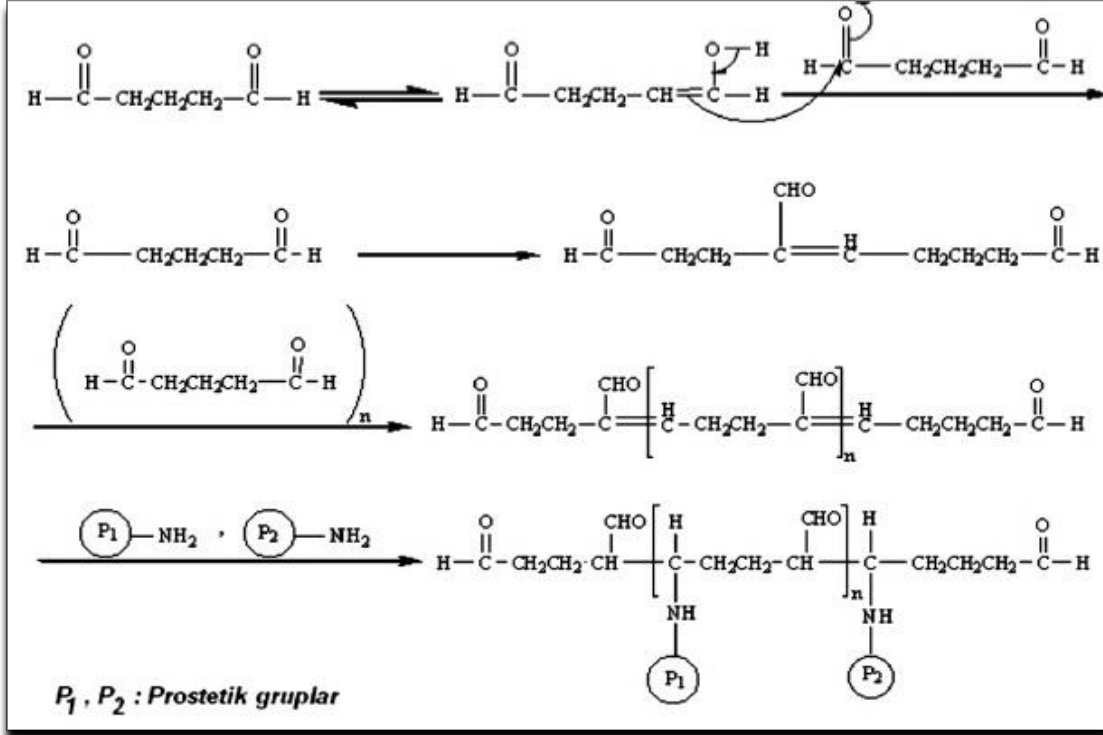
agaroz, seluloz, gibi doğal polisakkaritler olabildiği gibi poliakrilamit jel, polivinilalkol, naylon, iyon değiştirici reçineler gibi polimerlerde olabilir (Immobilized Enzymes, 2004).

Taşıyıcıya bağlama yöntemi: Fiziksel adsorbsiyon, kovalent bağlanma ve iyonik bağlanma olarak üç alt sınıfta incelenir.

- Fiziksel adsorbsiyon yöntemi: Enzimlerin suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel olarak adsorbe olması olayıdır. Bu yöntem sonucu hidrofobik bağlanma gerçekleşmektedir. Ayrıca van der Waals kuvvetleri, iyonik ve hidrojen bağ etkileşimleri gibi elektrostatik kuvvetlerde etkili olur. Fiziksel adsorbsiyon yönteminde enzimin aktif merkezinde ve enzimde konformasyonel değişiklik çok az veya hiç olmamaktadır. Bu yöntemde adsorbsiyon işleminde bağlanma hidrojen bağları ve van der Waals kuvvetleri ile birlikte olduğundan enzim üzerindeki bozucu etkiler kimyasal bağlanmalara göre oldukça düşüktür. Uygulama sırasında enzimin aktivite kaybına uğramaması ve optimum adsorbsiyon koşullarının sağlanabilmesi için adsorbant, enzim, iyon derişimleri ve pH ile sıcaklığa dikkat edilmelidir (Bickerstaff, 1997).
- Kovalent bağlanma yöntemi: Enzimlerin suda çözünmeyen bir taşıyıcıya kovalent olarak bağlanma olayıdır. Genel olarak bu bağlanma taşıyıcının fonksiyonel grubuyla, enzimin nükleofilik grubu arasında gerçekleşir. Bağlanmadaki fonksiyonel gruplar; karbaoksil, amino, sülfhidril, hidroksil, tiyol, imidazol ve treonin gruplarıdır. Kovalent bağlanmada taşıyıcı ve enzim arasındaki bağlar başka immobilizasyon yöntemlerinden daha kuvvetlidir. Enzim taşıyıcıya tutturulmuş olduğundan immobilize enzim serbest enzime göre substratla daha kolay bağlantı halinde olabilir (Immobilized Enzymes, 2004).
- İyonik bağlanma yöntemi: Enzimin suda çözünmeyen ve iyon değiştirici içeren bir taşıyıcıya iyonik olarak bağlanması esasına dayanır. Kolay uygulanabilmesi, enzimin modifiye olmaması, taşıyıcının yenilenebilir olması yöntemin kullanılabilirliğini arttıran özelliklerindendir. Taşıyıcı ile enzim arasındaki bağlanma, fiziksel adsorbsiyondan daha kuvvetli fakat kovalent bağlanmadakinden daha zayıftır (Aehle, 2004).

2-Çapraz bağlama yöntemi: Enzimlerin, protein moleküllerine ya da çözünmeyen taşıyıcı üzerindeki fonksiyonel gruplara, proteinin moleküller arası çaprazlanmasıyla sağlanır (Şekil 2.12). Enzimin kendi üzerine çapraz bağlanması oldukça pahalı ve yetersiz bir yöntemdir. Bu durumda proteinlerin bir kısmı taşıyıcı gibi davranır buda enzim aktivitesini düşürür. Enzimin kovalent bağlanmayla immobilizasyonu sağlanırken çapraz bağlama yöntemi de

kullanıldığında desorpsiyon çok az olmaktadır. Çapraz bağlanma yöntemi için en sık kullanılan maddeler toluen diizosiyonat veya gluteraldehitir (Immobilized Enzymes, 2004).



Şekil 2.13. Gluteraldehit ile çapraz bağlama tepkimesi (Palüzar, 2013).

3-Tutuklama yöntemi: Bu metotla enzim kafes görevi gören polimer matriks ya da membran içerisinde tutulmaktadır. Bu yöntemde substratın içeri girilmesine izin verilirken, proteininde dışarı çıkması engellenmiştir. Bu yöntemin çapraz ve kovalent bağlanmadan farkı enzimin çözelti içinde serbest olması fakat membran veya jel matriks içinde tutularak hareketinin kısıtlanmasıdır. Bu özelliğinden dolayı geniş kullanım alanlarına sahiptir. Bu metodun avantajı enzimlerin dışında hücre ve organellerin de immobilize edilebilir olmasıdır (Bickerstaff, 1997).

Tutuklama yöntemi: Jel tutuklama, fiber tutuklama ve mikro kapsülleme yöntemleri olarak üç alt sınıfta incelenir.

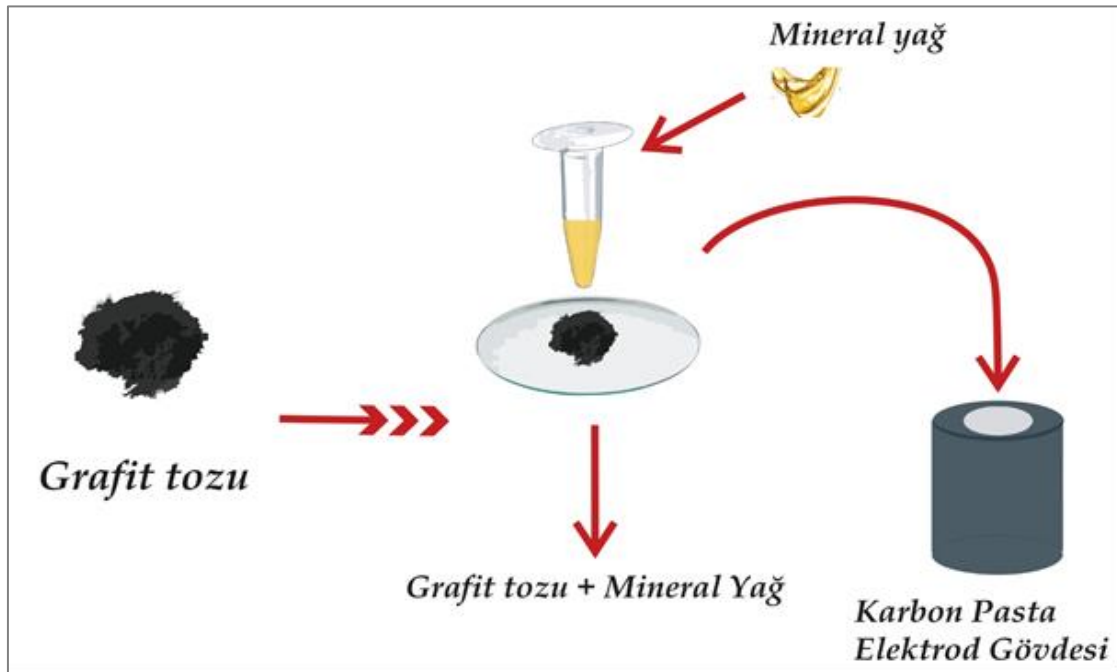
- Jel tutuklama yöntemi: Monomer, oligomerik ve polimerik maddelerden elde edilmiş olan ve suda çözünmeyen polimer jellerde oluşur.
- Fiber tutuklama yöntemi: Enzimin triasetat, selüloz gibi fiber formdaki bir polimere tutuklanması ile gerçekleşir.
- Mikro kapsülleme yöntemi: Enzim yarı geçirgen polimer membran içerisinde tutuklanır.

2.6. Karbon Pasta Elektrotlar

Karbon pasta elektrotlar; organik bir sıvı (nujol gibi) ile grafit tozunun karılıp pasta haline getirilmesi ve elektrot gövdesine yerleştirilip sıkıştırılması ile hazırlanır. İletken bir tel kullanılarak elektriksel bağlantı sağlanır (Şekil 2.13).

Karbon pasta elektrotların avantajları;

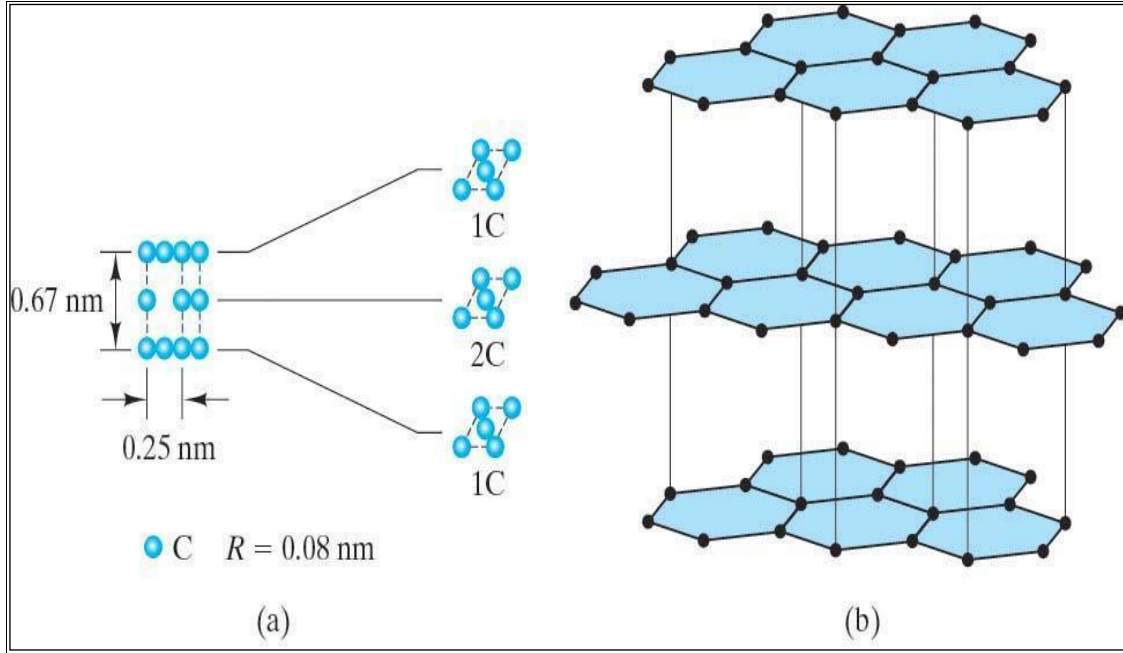
- Kolay ve hızlı hazırlanması,
- Düşük maliyetli olması,
- Yapım ve yüzeylerinin yenilenmelerinin kolay ve zaman alıcı olmaması,
- Birçok biyosensör materyalini aynı anda içerebilmesi,
- Katalizörler veya enzimler ile kolayca modifiye edilebilir olması,
- Geniş bir potansiyel aralığına sahip olması ve zemin akımlarının oldukça düşük olması gibi avantajları sayesinde kullanımları son yıllarda önemli ölçüde artmıştır (Kökbaş, 2013).



Şekil 2.14. Grafit tozunun karbon pasta elektroda uygulanması

En çok kullanılan elektrot türleri; tek kristalli grafit, lif ve gömme karbon, yüksek düzenlilikte pirolitik grafit (HOPG), karbon siyahı, camsı veya seramik karbon ve toz grafitir.

Grafitlerin petek şeklinde altıgen karbon dizilimi içeren levhaya benzeyen bir yapısı vardır (Şekil 2.14). Bu yapısı sayesinde farklı türler karbon levhalar arasına değişik şekilde konumlanabilirler (Erdem, 2012).



Şekil 2.15. Grafitin molekül yapısı

2.7. Kaynak Araştırması

Churchwell ve arkadaşları, hamile sıçanlarda, yeni doğan ve yetişkin sıçanlarda 2,5-300,000 $\mu\text{g/kg}$ vücut kütlesi (v)/gün BFA uyguladı. Etilin estradiol, endojen hormonlar ve testosteron hormonlarındaki değişimleri inceledi. Bu incelemeleri serumda sıvı kromatografisi ve kütle spektrometrisi yöntemleri ile gerçekleştirdi. Yapılan araştırmalar sonucunda sıçanlarda 2.5 $\mu\text{g/kg}$ vücut kütlesi (v)/gün BFA' ya rastladılar. (Churchwell, 2014).

Cimmino ve arkadaşları, BFA yiyecek, içecek, tıbbi cihazlar ve ambalaj ürünleri gibi vb. ürünlerin içerisinde polikarbonat plastik madde üretmek için sıklıkla kullanılan senterik bir maddedir. BFA yiyecek, içecek, hava ve toprağı kirlitebilir. Çeşitli insan doku ve organlarında birikebilir ve farklı moleküler mekanizmalar sonucunda insan sağlığına potansiyel olarak zarar verebilir. Hormon benzeri özelliğinden dolayı östrojen reseptörlerine bağlanarak tümör oluşumunu tetikleyebilir. BFA ayrıca GPR30 ile etkileşerek kanser ilerlemesine ve androjen reseptörlerine bağlanarak erkek üreme fonksiyonlarını bozabilir. (Cimmino, 2020).

Deorge ve arkadaşları, 6 ile 60 yaş aralığında Amerika' da yaşayan insanların %90'ının idrarında BFA varlığına rastladığını ifade etmişlerdir. Bu olay sonucunda insanların her yerde sıklıkla BFA' ya maruz kaldığının düşünülmesine neden olmaktadır. Sprague-Dawley sıçanlarında aktif ve inaktif BFA' nın serum farmakokinetiğini ölçmek için sıvı kromatografisi ve kütle spektroskopisi yöntemlerini kullanmıştır. 0-200 µg/kg vücut kütlesi aralığında oral olarak tedavi edilen yetişkin sıçanlarda lineer farmakokinetik gözlenmiştir (Deorge, 2010).

Dündar, çalışmasında BFA' nın üretimi, fiziksel ve kimyasal özellikleri, üretimi sonunda atıkların çevreye geçişi ve farklı yollarla bütün canlıların vücuduna geçişi, gıdalara geçişi ve oradan insan vücuduna geçişi, vücuttaki genel toksikolojik etkileri ve bu zararlı madde yerine kullanılacak alternatif materyalleri incelemiştir (Dündar, 2014).

Koçak ve arkadaşları bisfenol-A'nın tayinini yapabilmek için yeni bir biyosensör geliştirmişlerdir. Bu amaç doğrultusunda PAPAM-Sal-Pt (II) katkılı karbon pasta elektrot hazırlamışlardır. Hazırladıkları bu elektroda tirozinaz enzimini glutraldehit varlığında çapraz bağlama yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Ve bisfenol-A tayinini enzimatik tepkimeler sonucu oluşan p-bisbenzokinin bileşiğinin -0,15V'da elektrokimyasal olarak indirgenmesine dayalı tayin etmişlerdir. Doğrusal çalışma aralığını 0,01 µM-1,0 µM arasında (R^2 0,9845) ve alt tayin sınırını ise 1 nM olarak belirlemişlerdir (Koçak. H, 2020).

Messaound ve arkadaşları, BFA'nın belirlenebilmesi için ksantin oksidaz (XOD) enzimatik inhibisyonuna dayalı yeni ve basit bir biyosensör geliştirmişlerdir. Biyosensörü, ksantin oksidazın glutraldehit varlığında çapraz bağlama yöntemi kullanılarak immobilize edilmesiyle hazırlamışlardır. Sabit potansiyelde BFA'nın belirlenmesinde başarı ile kullanmışlardır (Messaoud, 2018).

Pan ve arkadaşları, bireysel tabakaları ayırmak için altın nano parçacıkları eklenerek mükemmel dağılıma sahip biyosensörü başarı ile hazırlamışlardır. Grafen–altın nano parçacıklı ve tirozinaz bazlı BFA'nın tespiti için hazırlanan yeni bir biyosensör oluşturmuşlardır. Hazırladıkları yeni biyosensörü BFA'nın tayininde diferansiyel puls yöntemini kullanarak uygulamaya geçirmişlerdir. Biyosensör $2,5 \times 10^{-3}$ - $3,0 \times 10^{-3}$ µM bir

lineer aralığa, yüksek oranda tekrarlanabilirliğe (RSD %2,7) ve uzun vadeli stabiliteye sahip BFA tayini için kullanışlı bir biyosensör hazırlamışlardır (Pan,2015).

Wang H. ve arkadaşları, androjen reseptörü sinyalinin BPA' nın androjen reseptörü antagonizmasına dahil olup olmadığını araştırmışlardır. Fare sertoli hücresi TM4 proliferasyonunu analiz etmek için hücre sayma kiti-8 tahlili ve gerçek zamanlı hücre analizi ile uygulamalar yapmışlardır. BPA' nın androjen reseptörünün amino ve karboksil terminal bölgeleri ile etkileşimini ve androjen reseptörünün steroid, tiroid hormonu üzerindeki baskılayıcı etkisini incelemişlerdir (Wang, 2017).

Wu L. ve arkadaşları, BFA'ya aşırı duyarlı ve hızlı tespiti için elektrokimyasal enzim biyosensörü geliştirmişlerdir. Enzimin stabilitesini arttırmak için tirozinaz enzimi kullanmışlardır. Ve tampon çözeltisine doğrudan ekleme yapmak yerine tek bir tirozinaz molekülünün ince bir ağ polimer kabuğuna kapsüllenmesi ile tirozinaz nanokapsülleri (nTyr) hazırlamışlardır. Nanokapsülün başarılı olup olmasını ise kare dalga voltametrisi yöntemini kullanarak belirlemişlerdir. Elde etmiş oldukları nTyr, 12 nmol L⁻¹ 'lik düşük bir sapma limiti ve 5x10⁻⁸ ile 2x10⁻⁶ mol L⁻¹ arasında geniş bir doğrusal aralık sergileyen BFA tespiti için elektrokimyasal bir biyosensör elde etmişlerdir (Wu L, 2020).

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Deneyde Kullanılan Maddeler ve Üretici Firmalar

Çizelge 3.1 Deneyde kullanılan maddeler ve üretici firmalar

Kimyasal Madde	Temin Edilen Üretici Firma
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck
Grafit Tozu	Merck
Mineral Yağ	Sigma
Üre ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$)	Sigma
Bisfenol-A	Sigma
Fenol ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$)	Merck
Sığır serum albümin (BSA)	Sigma
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich
Asetik asit (CH_3COOH)	Merck
Tirozinaz enzimi (Mantardan saflaştırılmıştır)	Fluka
Etilasetatin	Sigma-Aldrich
Nitrofenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_3$)	Merck
Gluteraldehit ($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$)	Aldrich
Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	Merck
Monosodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4)	Merck
Glisin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)	Sigma
Potasyum nitrat (KNO_3)	Sigma-Aldrich
Metil Alkol (CH_3OH)	Sigma

3.2. Deneyde Kullanılan Çözeltiler

Fosfat Tamponu: Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) ve monosodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) kullanılarak hazırlanmak istenilen pH değerlerine göre hesaplanıp gerekli olan miktarlar belirlendi. Belirlenen miktarlar tartılarak saf suda çözüldü. Daha sonra pH metre yardımı ile ölçüm sağlandı. İstenilen pH ya gelinceye kadar 0,1M'lık NaOH ilave edilerek fosfat tamponları hazırlandı.

Sodyum Hidroksit Çözeltisi: Belirli miktar NaOH saf suda çözüldü ve daha sonra kullanılmak üzere hazırlandı.

Bisfenol-A Çözeltisi: BFA'dan 0,0590 gram alınıp %60'ı metil alkol ve %40'ı saf su olacak şekilde çözülerek 10mL'ye tamamlandı ve 0,01 M'lık stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan bu stok çözeltiden alınıp çalışılacak derişimlere seyreltilip kullanıldı.

Enzim Çözeltisi: Mantarlardan saflaştırılmış aktivitesi 5KU/mL ünite olan tirozinaz enziminden 3 mg alınıp toplam hacim 2 mL olacak şekilde pH 7,0 olan fosfat tamponu ile seyreltilerek bir çözelti hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltiden 0,5'er mL alınarak eppendorflara konuldu. Deneyde kullanılacak kısmı buzdolabında daha sonra kullanılacak olan kısım ise derin dondurucuda muhafaza edildi.

Gluteraldehit Çözeltisi: %25'lik gluteraldehit çözeltisinden seyreltilerek %2,5'luk gluteraldehit çözeltisi hazırlandı ve buzdolabında +4°C'de saklandı.

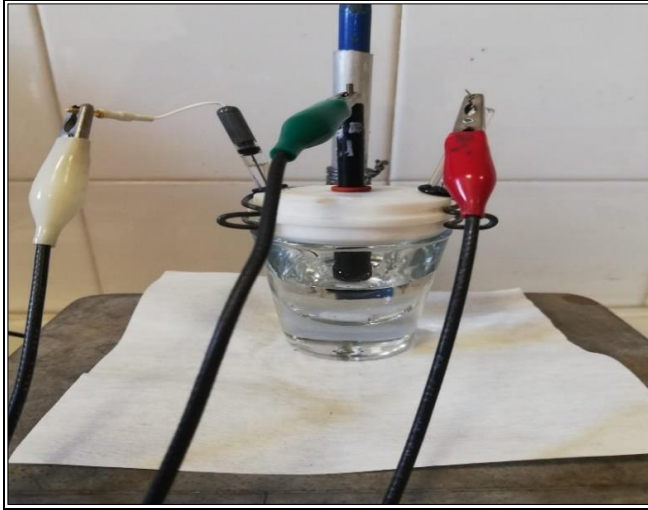
3.3. Deneyde Kullanılan Cihazlar

3.3.1. Elektrokimyasal analiz cihazı

Çalışılan tüm elektrokimyasal deneylerde bilgisayara bağlantılı olarak çalışan CHI firmasının 1230-B model elektrokimyasal analiz cihazı kullanıldı.

3.3.2. Elektrotlar ve hücre

Amperometrik olarak yapılan ölçümler, üçlü elektrot hücre sisteminde gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. Elektrotların hücreye yerleşimi

Çalışma elektrotu olarak Ø 0,3 cm olan teflondan imal edilmiş karbon pasta elektrot kullanıldı.



Şekil 3.2. Teflondan yapılmış karbon pasta elektrot

Karşıt elektrot için k MW-1032 no'lu platin tel ve referans elektrot için BAS RE-5B no'lu Ag/AgCl kullanıldı. Çalışma elektrodu çalışma sonrasında tampon çözelti içerisinde buzdolabında +4°C saklandı.

3.3.3. pH metre

ORION Model 720A pH-iyonmetre marka pH metre ile ölçüm yapıldı.

3.3.4. Su banyosu

Yapılzn deneylerde su banyosu olarak Grant GD120 marka termostatlı dolaşım sistemli su banyosu kullanıldı.

3.3.5. Mikro pipet

10 μ L-1000 μ L miktarlarındaki çözeltilerin hücre içine ilave edilmesi ve gerekli olduğu zaman yeni çözeltilerin hazırlanması için $\pm 0,05$ μ L hassasiyeti olan Brand marka mikro pipetler kullanıldı.

3.3.6. Saf su üretim cihazı

Deneyde kullanılan saf su GFL marka saf su üretim cihazından temin edildi.

3.4. Bisfenol-A Biyosensörü Hazırlanması ve Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

Hazırlanan biyosensörün optimum çalışma koşullarının belirlenebilmesi için, BFA'ya olan duyarlılığının belirlenmesi, çalışma potansiyeli, polimer miktarının belirlenmesi, gluteraldehit miktarının belirlenmesi, pH 'nın belirlenmesi, sıcaklığın etkisi, BFA derişiminin etkisi, tekrarlanabilirlik, raf ömrünün belirlenmesi, girişim yapan türlerin etkisinin incelenmesi ve gerçek örneklerde biyosensör uygulaması çalışmaları yapıldı.

3.4.1. Çalışma elektrodunun hazırlanması: Modifiye karbon pasta elektrot (MCPE) ve karbon pasta elektrot (CPE) oluşturulması

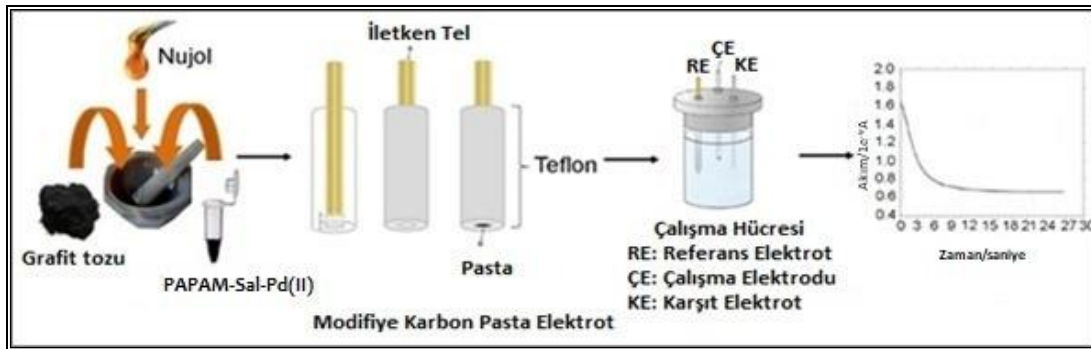
Karbon pasta elektrot (CPE) oluşturulması

Çalışma yapılacak olan karbon pasta elektrot saf su yardımı ile temizlendi. Hazırlanan her karbon pasta elektrodun içeriği aynı olacak şekilde grafit tozu (0,0375g) hassas terazi yardımıyla tartılarak karma işlemi yapılacak olan saat camına alındı. Üzerine maddeleri bir arada tutan nujol (25 μ L) mikro pipet yardımıyla eklenerek uygun kıvama gelene kadar karma işlemi yapıldı. Hazırlanan madde karbon pasta elektrotdaki boşluğa uygun aparatlar yardımı ile madde artışı olmayacak şekilde sıkıca dolduruldu. Doldurma sonrasında doldurulan yüzeyde pürüz olmaması için özel bir pede sekiz çizilerek elektrot pürüzsüz hale getirildi. En son elektrot saf su ile yıkanarak temizlendi ve kullanılmak üzere hazırlandı.

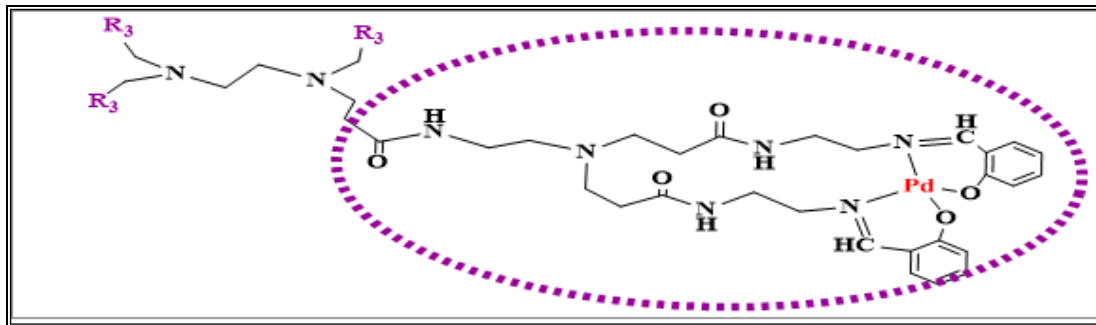
Modifiye karbon pasta elektrot (MCPE) oluşturulması

Çalışılacak karbon pasta elektrot saf su yardımı ile temizlendi. Hazırlanan her karbon pasta elektrodun içeriği aynı olacak şekilde grafit tozu (0,0375g) ve PAMAM-Sal-Pd(II) (0,5 mg) hassas terazi yardımıyla tartılarak karma işlemi yapılacak olan saat camına alındı. Üzerine maddeleri bir arada tutan nujol (25μl) mikro pipet yardımıyla eklenerek uygun kıvama gelene kadar karma işlemi yapıldı. Hazırlanan madde karbon pasta elektrottaki boşluğa uygun aparatlar yardımı ile madde artışı olmayacak şekilde sıkıca dolduruldu. Doldurma sonrasında doldurulan yüzeyde pürüz olmaması için özel bir pede sekiz çizilerek elektrot pürüzsüz hale getirildi. En son elektrot saf su ile yıkanarak temizlendi ve kullanılmak üzere hazırlandı. (şekil 3.3).

Yapılan çalışmada modifiye işlemi için kullanılan madde poli (amidoamin) salisilidenimin paladyum (II) (PAMAM-Sal-Pd(II))' dir (şekil 3.4). PAMAM-Sal-Pd(II) çalışmamız için ilk kez Gazi Üniversitesi Fen Fakóltesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Nurřen SARI ve Dr. Elvan HASANOĐLU ÖZKAN tarafından sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir.



şekil 3.3. Modifiye karbon pasta elektrot hazırlanması ve çalışma hücresi şeması



şekil 3.4. Poli (amidoamin) salisilidenimin paladyum

3.4.2. Karbon pasta elektrotun sabit akıma gelmesinin sağlanması

Elektrokimyasal hücre derişimi 0,1M olacak şekilde NaCl çözeltisi ve 0,1M pH 7,0 olan 9,0 mL fosfat tamponu çözeltisi çalışma hücrelerine ilave edildi. Elektrokimyasal hücreye çalışma elektrodu olan modifiye karbon pasta elektrot, karşıt ve referans elektrot yerleştirildi. Çalışılacak olan potansiyel ayarlandı ve hücre dengeye gelene kadar beklendi. Akım sabit değere gelince denge akımı olarak kaydedildi. Tüm deneylerde bu işlemler uygulandı.

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

Elektrokimyasal hücre derişimi 0,1M olacak şekilde NaCl çözeltisi ve 0,1M pH 7,0 olan 9,0 mL fosfat tamponu çözeltisi çalışma hücrelerine ilave edildi. Üzerine 50 µL 5 KU/mL tirozinaz enzimi eklendi. Elektrokimyasal hücreye; çalışma (CPE veya MCPE), karşıt ve referans elektrotlar yerleştirildi. Hazırlanan hücre -0,10V potansiyelde dengeye getirildi. Daha sonra hücre içindeki BFA derişimi $1,0 \times 10^{-6} \text{M}$ - $5,0 \times 10^{-4} \text{M}$ aralığında olacak şekilde eklemeler yapıldı. Her ilave edilen çözeltiden sonra 20 dk karıştırıldı ve 200 s sonra enzimatik tepkime sonucu oluşan kinon bileşiğinin elektrot yüzeyinde katodik akımları amperometrik yöntemle ölçüldü. Elde edilen akımlar denge akımından çıkarılarak (Δi) değerleri hesaplandı. Artan derişimlerde BFA ilavesi yapıldığı için artan bir grafik elde edildi (Şekil 4.2).

3.4.4. MCPE'ye tirozinaz enziminin immobilize edilmesi

Çalışılacak karbon pasta elektrot saf su ile temizlendi. Hassas terazide grafit tozu (0,0375g) ve PAMAM-Sal-Pd (II) (1,0mg) tartılarak saat camına alındı. Üzerine mikro pipet yardımıyla 25 µl nujol ilave edilip karma işlemi gerçekleştirildi. Hazırlanan pasta elektrot içerisinde boşluk kalmayacak şekilde sıkıca dolduruldu. Elektrot yüzeyinin düzgün olması için bir ped yardımıyla düzeltildi ve en son saf su ile yıkanarak elektrot immobilize işlemine hazır hale getirildi.

Eppendorf içine alınan 2,0 mg bovine sığır albümin (BSA)'nin üzerine 50 µl fosfat tamponu eklenerek iyice çözünene kadar karıştırıldı. Daha sonra üzerine 100 µl 5 KU/mL tirozinaz enzimi ilave edildi ve çalkalama işlemi yapıldı. En son 30 µl glutraldehit ilave edilerek homojen bir karışım elde edildi. Hazırlanan bu karışım yüzeyi kuru olan elektrot üzerine

pipet yardımıyla hava kabarcığı oluşmayacak şekilde yavaşça ilave edildi. İmmobilize edilmiş elektrot oda sıcaklığında kuruyana kadar bekletildi. Kuruma işlemi bittikten sonra saf su ile yıkandı böylece immobilize olmayan serbest enzimler ortamdaki uzaklaştırıldı. Hazırlanan biyosensör buzdolabında +4°C’ de tampon çözelti içerisinde saklandı.

3.4.5. Çalışma potansiyelin incelenmesi

Elektrokimyasal hücre derişimi 0,1M olacak şekilde NaCl çözeltisi ve 0,1M pH 7,0 olan 9,0 mL fosfat tamponu çözeltisi çalışma hücreğine ilave edildi. Üzerine çalışma, karşıt ve referans elektrotlar yerleştirilerek dengeye gelene kadar bekletildi. Dengeye gelen hücreye $1,0 \times 10^{-6} \text{M}$ - $5,0 \times 10^{-4} \text{M}$ aralığında artan derişimlerde BFA eklemeleri yapıldı. Her eklemede 20 dk karıştırılarak BFA’nın enzimatik tepkimeyle kinon bileşiğine dönüşümü sağlandı. 200 s belirlenen potansiyellerde (-0,10V, -0,15V, -0,20V ve -0,25V) enzimatik tepkime sonucu oluşan kinon bileşiğinin elektrot yüzeyinde katodik akımları kare dalga yöntemi ile ölçüldü. Denge akımı okundu ve kaydedildi. Yapılan bu çalışmalar üç kez tekrarlanıp ortalamaları alınarak Δi_{ort} değeri hesaplandı ve bisfenol-A derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.3).

3.4.6. PAMAM-Sal-Pd (II) polimer miktarının incelenmesi

Elektrokimyasal hücre derişimi 0,1M olacak şekilde NaCl çözeltisi ve 0,1M pH 7,0 olan 9,0 mL fosfat tamponu çözeltisi çalışma hücreğine ilave edildi. Farklı derişimlerde (0,5mg, 1mg, 2mg) hazırlanan biyosensörler -0,10 V potansiyelde dengeye getirildi. Daha sonra $1,0 \times 10^{-6}$ - $5,0 \times 10^{-4} \text{M}$ aralığında artan derişimlerde BFA eklemeleri yapıldı. Her eklemede 20 dk karıştırılarak BFA’nın enzimatik tepkimeyle kinona dönüşümü sağlandı ve 200 s boyunca ölçüm alındı. Denge akımı okundu ve kaydedildi. Yapılan bu çalışmalar üç kez tekrarlanıp ortalamaları alınarak Δi_{ort} değeri hesaplandı ve bisfenol-A derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.4).

3.4.7. Gluteraldehit miktarının incelenmesi

Elektrokimyasal hücre derişimi 0,1M olacak şekilde NaCl çözeltisi ve 0,1M pH 7,0 olan 9,0 mL fosfat tamponu çözeltisi çalışma hücreğine ilave edildi. Farklı miktarlarda %2,5’luk stok gluteraldehitten (20µl, 30µl, 40µl) hazırlanan biyosensörler -0,10V potansiyelde dengeye getirildi. Daha sonra $1,0 \times 10^{-6}$ - $5,0 \times 10^{-4} \text{M}$ aralığında artan derişimlerde BFA eklemeleri

yapıldı. Her eklemede 20 dk karıştırılarak BFA'nın enzimatik tepkime ile kinon bileşiğine dönüşümü sağlandı ve 200 s boyunca ölçüm alındı. Denge akımı okundu ve kaydedildi. Yapılan bu çalışmalar üç kez tekrarlanıp ortalamaları alınarak Δi_{ort} değeri hesaplandı ve bisfenol-A derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.5).

3.4.8. Enzim elektrodunun optimum çalışma koşullarının incelenmesi

pH'nin bulunması;

Elektrokimyasal hücre derişimi 0,1M olacak şekilde NaCl çözeltisi ve 0,1M pH 7,0 olan 9,0 mL fosfat tamponu çözeltisi çalışma hücresine ilave edildi ve -0,10 V'da dengeye getirildi. BFA çözeltisi ilave edilerek hücre derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan çözelti 20 dk karıştırıldı ve 200 s boyunca ölçüm gerçekleştirildi ve akım değeri kaydedildi. Yapılan bu çalışmalar üç kez tekrarlanıp ortalamaları alınarak Δi_{ort} değeri hesaplandı ve bisfenol-A derişimine karşı grafiğe geçirildi.

Yapılan çalışmalar pH 5,0 - 6,0 - 7,0 - 8,0 - 9,0 olan tampon çözeltileri için tekrar edildi. Çalışılacak her pH tamponu için akım farkı ortalamaları hesaplandı. Hesaplanan akım farkları değerine karşı pH değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.6).

- 0,1M pH 5,0 için Asetik asit – Asetat Tamponu
- 0,1M pH 6,0 için Fosfat Tamponu (Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4)
- 0,1M pH 7,0 için Fosfat Tamponu (Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4)
- 0,1M pH 8,0 için Fosfat Tamponu (Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4)
- 0,1M pH 9,0 için Glisin-NaOH Tamponu kullanıldı.

Sıcaklığın çalışma koşullarına olan etkisi;

Elektrokimyasal hücre derişimi 0,1M olacak şekilde NaCl çözeltisi ve 0,1M pH 7,0 olan 9,0 mL fosfat tamponu çözeltisi çalışma hücresine ilave edildi ve -0,10V'da termostatl dolaşimli su banyosu kullanılarak sıcaklığı 20°C'ye sabitlenip dengeye getirildi. BFA çözeltisi ilave edilerek hücre derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan çözelti 20 dk karıştırıldı ve 200 s boyunca ölçüm gerçekleştirilip akım değeri kaydedildi. Yapılan bu çalışmalar üç kez tekrarlanıp ortalamaları alınarak Δi_{ort} değeri hesaplandı ve

bisfenol-A derişimine karşı grafiğe geçirildi. Yapılan ęalıřmalar 30°C - 40°C - 50°C - 60°C sıcaklıklar için tekrarlandı ve bulunan sıcaklık değerleri grafiğe geçirildi (şekil 4.7).

Bisfenol-A'nın derişiminin ęalıřma koşullarına olan etkisi;

Elektrokimyasal hücre derişimi 0,1M olacak şekilde NaCl ęözeltisi ve 0,1M pH 7,0 olan 9,0 mL fosfat tamponu ęözeltisi ęalıřma hücreesine ilave edildi ve -0,10 V'da oda koşullarında dengeye getirildi. BFA ęözeltisi ilave edilerek hücre derişimi $1,0 \times 10^{-9}$ M olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan ęözelti 20 dk karıştırıldı ve 200 s boyunca ölçüm geręekleřtirilip akım değeri kaydedildi. Bu işlemler artan derişimlerle BFA ilave edilerek $1,0 \times 10^{-3}$ M'a kadar tekrarlandı ve akım farkı (Δi) değerleri hesaplandı. Yapılan bu ęalıřmalar üç kez tekrarlanıp ortalamaları alınarak Δi_{ort} değeri hesaplandı ve bisfenol-A derişimine karşı grafiğe geçirildi (şekil 4.8).

Tekrarlanabilirliğin etkisi;

Elektrokimyasal hücre derişimi 0,1M olacak şekilde NaCl ęözeltisi ve 0,1M pH 7,0 olan 9,0 mL fosfat tamponu ęözeltisi ęalıřma hücreesine ilave edildi ve -0,10 V'da dengeye getirildi. Optimum şartlar içinde tekrarlanabilirliğinin belirlenebilmesi için BFA ęözeltisi ilave edilerek hücre derişimi $2,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan ęözelti 20 dk karıştırıldı ve 200 s boyunca ölçüm geręekleřtirilip akım değeri kaydedildi. Bu ęalıřma için gün içinde 18 tekrar alınısı ve sonuçlar grafiğe geçirildi. Yapılan bu ęalıřmalar üç kez tekrarlanıp ortalamaları alınarak Δi_{ort} değeri hesaplandı ve bisfenol-A derişimine karşı grafiğe geçirildi (şekil 4.12).

Raf ömrü süresinin bulunması;

Elektrokimyasal hücre derişimi 0,1M olacak şekilde NaCl ęözeltisi ve 0,1M pH 7,0 olan 9,0 mL fosfat tamponu ęözeltisi ęalıřma hücreesine ilave edildi ve -0,10 V'da dengeye getirildi. Optimum şartlar içinde tekrarlanabilirliğinin belirlenebilmesi için BFA ęözeltisi ilave edilerek hücre derişimi $2,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan ęözelti 20 dk karıştırıldı ve 200 s boyunca ölçüm geręekleřtirilip akım değeri okundu ve kaydedildi. Yapılan bu ęalıřmalar üç kez tekrarlanıp ortalamaları alınarak Δi_{ort} değeri hesaplandı ve bisfenol-A derişimine karşı grafiğe geçirildi. Deneyler ve akım farkı ortalamaları belirlenen

her gün için tekrarlandı. Bulunan ortalama değerlere karşı deney günleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.13).

3.4.9. Bisfenol-A tayinine girişim yapabilecek türlerin belirlenmesi

Bisfenol-A tayinine girişim yapabilecek gerçek örnekler (asetonitril (C_2H_3N), etilasetatın ($C_4H_8O_2$), hegzan (C_6H_{14}), fenol (C_6H_5OH), nitrofenol ($C_6H_5NO_3$), üre (CH_4N_2O), potasyum nitrat (KNO_3)) incelendi. Çalışma hücresine 9,0 mL 0,1M pH 7,0 olan fosfat tamponu ve 1M 1,0 mL NaCl ilave edilerek -0,10V'da dengeye getirildi. Daha sonra hücre içi derişim $1,0 \times 10^{-8}$ M olacak şekilde bisfenol-A eklemeleri yapıldı. 20 dk karıştırıldı ve 200 s boyunca ölçüm gerçekleştirilip akım değeri kaydedildi. Daha sonra girişimi incelenen türün hücre içi derişimi $1,0 \times 10^{-8}$ M olacak şekilde hücreye eklendi 20 dk karıştırıldı ve 200 s boyunca ölçüm gerçekleştirilip akım değeri kaydedildi. Gözlenen cevap akımı hücre içindeki bisfenol- A ve girişimi incelenecek türün oluşturduğu akımların toplamıdır. Girişim etkisi incelenen maddeye karşılık gelen cevap akımı, toplam cevap akımı değerinden bisfenol-A'ya karşılık gelen cevap akımının çıkarılması ile elde edilir. Bu işlemler sonrasında bulunan cevap akımı ile girişimi incelenen türün yüzde cinsinden ne kadar girişim yaptığı hesaplanmıştır.

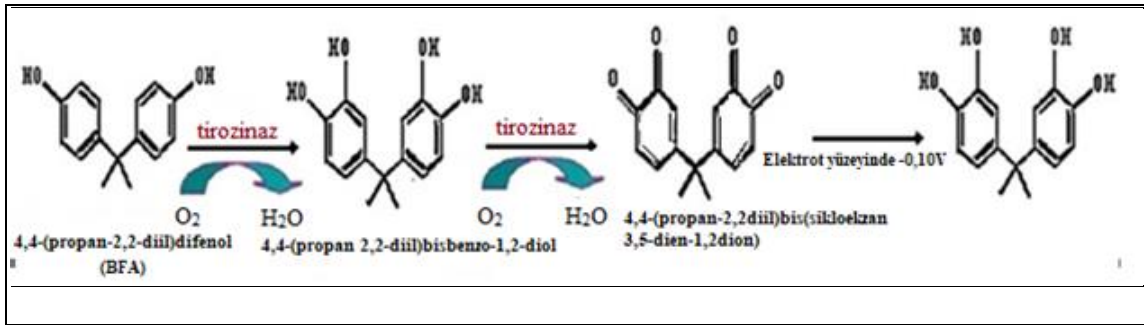
3.4.10. Biyosensörün gerçek örnekler üzerinde çalışmasının incelenmesi

İçme sularında kullanılan plastik su şişelerinde ve plastik yiyecek saklama kaplarında bisfenol-A'nın varlığını tespit etmek amacıyla bu deneysel çalışma yapıldı. Öncelikle su şişesinden 1'er gramlık numuneler üç ayrı beher içerisine alındı. Birinci behere 20 ml saf su konulup oda sıcaklığında 48 saat, ikinci behere 20 ml etil alkol konulup oda sıcaklığında 48 saat ve üçüncü behere 20 ml saf su konulup 78°C de 48 saat bekletildi. Aynı işlemler yiyecek saklama kabı içinde yapıldı (Wu, L. 2020).

Elektrokimyasal hücre derişimi 0,1M olacak şekilde NaCl çözeltisi ve 0,1M pH 7,0 olan 9,0 mL fosfat tamponu çözeltisi ilave edildi ve -0,10V'da dengeye getirildi. Akım değeri okundu ve kaydedildi. Daha sonra numuneden 100 µL alınarak çalışma hücresine eklendi. Çözelti 20 dakika boyunca karıştırıldı ve 200 s ölçüm alındı cevap akımı kaydedildi. Akım farkına karşılık gelen derişim değeri kalibrasyon grafiğinde (Şekil 4.9) yerine koyularak yaklaşık değerler belirlendi.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

PAMAM-Sal-Pd (II) katkılı modifiye edilmiş bir karbon pasta elektrot hazırlandı. Hazırlanan bu elektroda tirozinaz enzimi çapraz bağlama yöntemi ile immobilize edildi. Tirozinaz enzimi oksijen varlığında BFA'nın kinon bileşiğine yükselmesini sağlar. BFA'nın tayini ise enzimatik bir tepkime sonucunda oluşan kinon bileşiğinin -0,10V'da indirgenmesi ile gerçekleştirilir (Şekil 4.1).



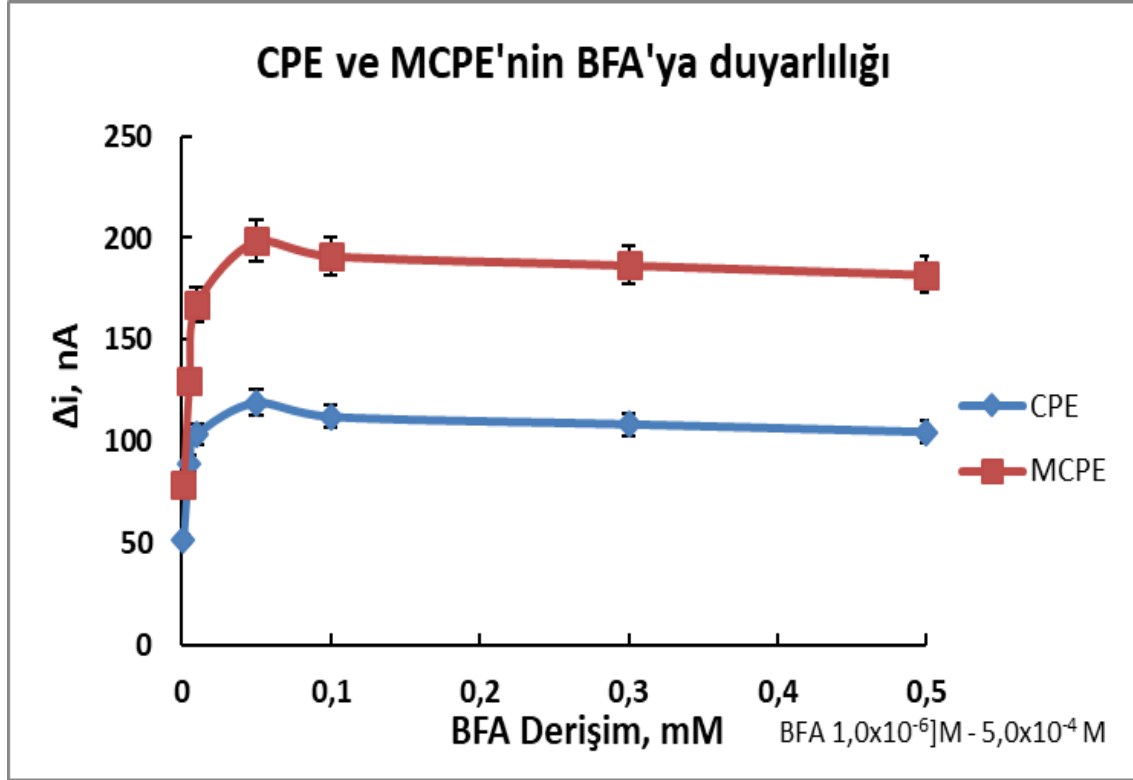
Şekil 4.1. BFA tayini için biyosensörün çalışma şeması

Çalışmalar sonucunda elde edilen biyosensörün optimum çalışma koşulları ve performansına etki eden faktörler incelendi. Biyosensörün çalışma ortamlarında olabilecek madde girişimleri yapılan deneylerle incelendi ve immobilize edilmiş elektrot plastik su şişesi ve yiyecek saklama kaplarında bisfenol-A varlığının tespiti için kullanıldı.

4.1. Biyosensörün Optimum Çalışma Aralığının Belirlenmesi

4.1.1. CPE ve MCPE elektrodlarının bisfenol-A'ya olan duyarlılığının etkisinin incelenmesi

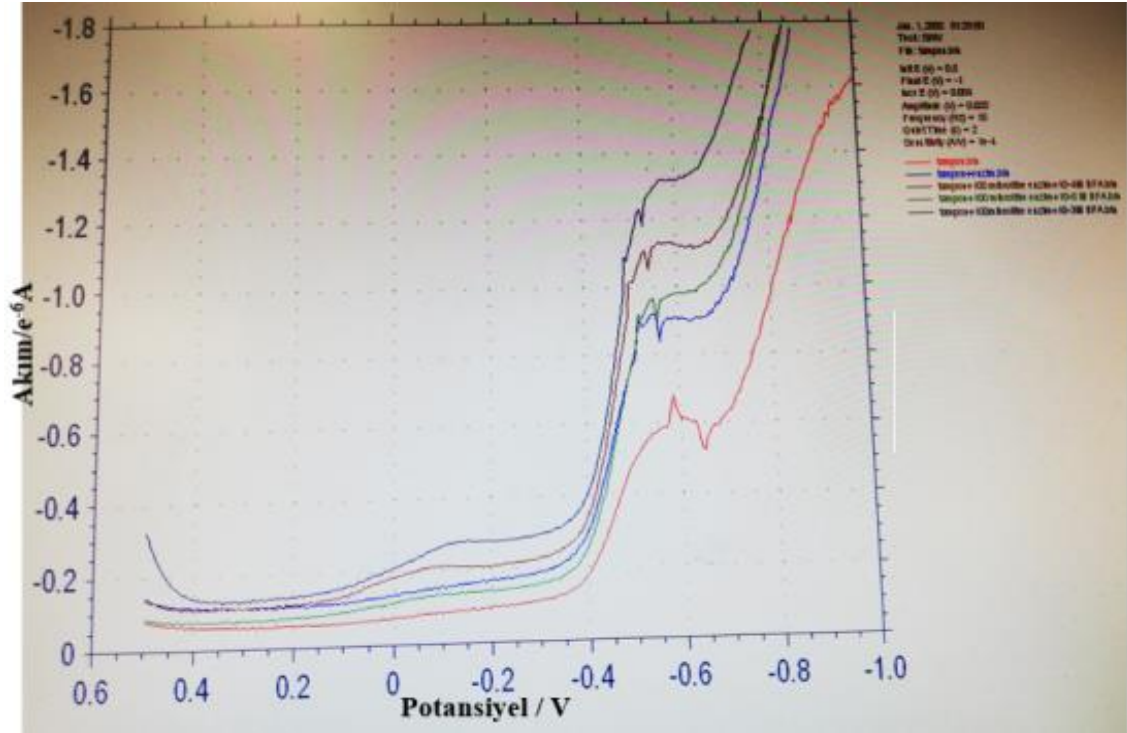
Hazırlanan elektrotların duyarlılık karşılaştırılması bisfenol-A'nın hücre içerisinde enzimatik tepkimelerle kinon bileşiğine yükseltgenmesi ve kinon bileşiklerinin oluşturmuş olduğu katodik akımlarının amperometrik yöntemle ölçülüp kaydedilmesi ile incelendi. Karbon pasta elektrot ve modifiye edilmiş karbon pasta elektrot -0,10V'da dengeye getirildikten sonra çalışma hücresinin içine derişimi $1,0 \times 10^{-6}$ - $5,0 \times 10^{-4}$ M olacak bisfenol-A çözeltisi ilave edildi. Bisfenol-A derişimine karşı elde edilen cevap akımları grafiğe geçirildi (Şekil 4.2). Şekil incelendiği zaman MCPE'nin akımlarının CPE'ye göre yaklaşık olarak iki kat arttığı tespit edildi. MCPE'daki PAMAM-Sal-Pd (II)'nin iletkenliği arttırarak akımlarda artışa neden olduğu düşünüldü.



Şekil 4.2. MCPE-CPE'nin bisfenol A'ya olan duyarlılığının belirlenmesi (-0,10V potansiyel, 0,1M pH 7,0 fosfat tamponu, 25°C, $1,0 \times 10^{-6}$ M- $5,0 \times 10^{-4}$ M bisfenol-A derişimi).

4.1.2. Çalışma potansiyelinin etkisinin incelenmesi

Hazırlanan biyosensörün bisfenol-A tayininde optimum çalışma potansiyelini belirleyebilmek için kare dalga voltametrisinde -0,10V, -0,15V, -0,20V çalışma potansiyellerinde okunan akımlar bisfenol-A derişimine karşı grafiğe geçirildi. Oluşturulan grafikler (Şekil 4.3) incelendiğinde enzimatik tepkime sonucunda oluşan kinon bileşiğinin -0,10V'da en yüksek indirgenme akımına sahip olduğu belirlendi ve çalışma potansiyeli -0,10V olarak kaydedildi.

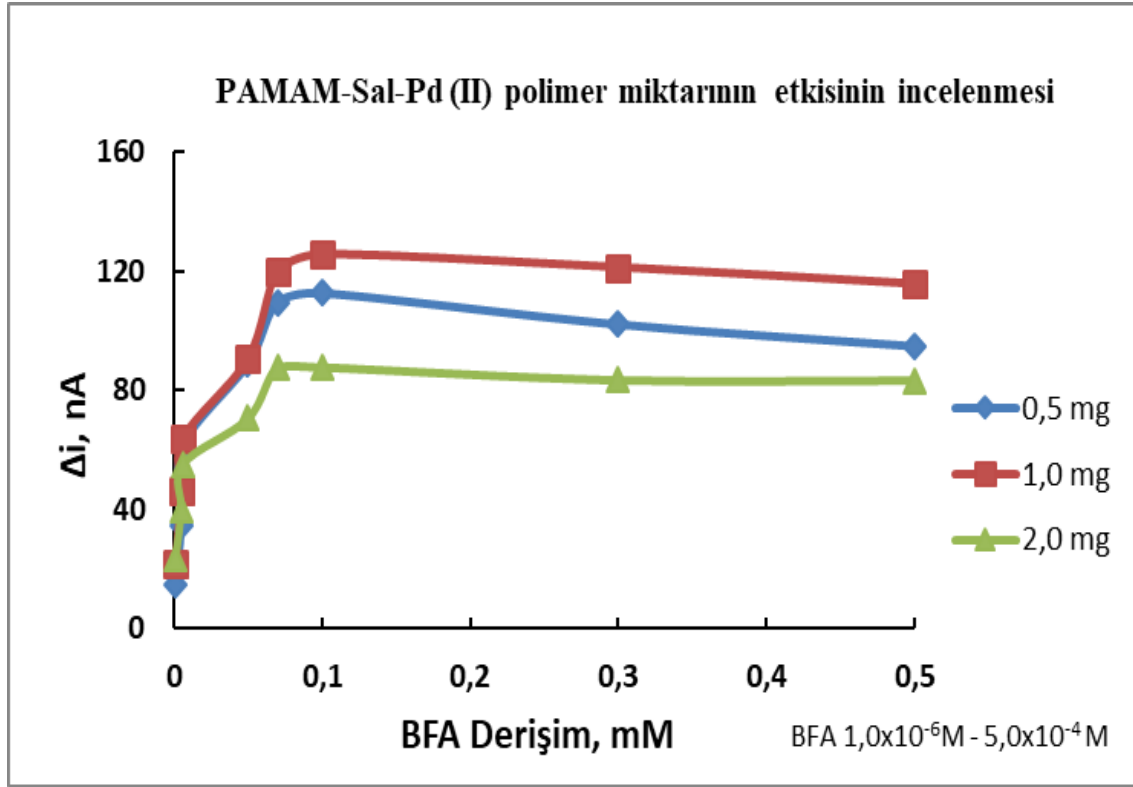


Şekil 4.3. Çalışma potansiyelinin bulunması (-0,10V potansiyel, 0,1M pH 7,0 fosfat tamponu, 25 °C, $1,0 \times 10^{-5}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M bisfenol-A derişimi).

4.1.3. PAMAM-Sal-Pd (II) polimer miktarının etkisinin incelenmesi

Polimerler oldukça fazla sayıda molekülün kimyasal bağlarla belirli bir düzende bağlanmasıyla oluşan oldukça yüksek molekül kütleli bileşiklerdir. İletken polimerler optik ve elektriksel özellikleri sayesinde teknolojik uygulamalarda kullanım potansiyeli en yüksek malzemelerden biridir (Metin, 2017).

Daha önce yapılan deneylerde polimer katkılı karbon pasta elektrotun akım değerlerinin karbon pasta elektroda göre yüksek olduğu görüldü. Uygulanan polimer miktarları sırası ile 0,5mg - 1,0mg - 2,0mg olacak şekilde biyosensörler hazırlandı. Hücre derişimi $1,0 \times 10^{-6}$ - $5,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde bisfenol-A ilave edildi ve -0,10V'da dengeye getirilip akımlar kaydedildi. Denge akımı okundu ve grafiğe geçirildi (Şekil 4.4). Polimer miktarları arttıkça akımların arttığı tespit edildi. Fakat 2,0 mg olarak hazırlanan biyosensörün belirli bir süre sonra tampon içinde şişerek dağıldığı gözlemlendiğinden polimer miktarı 1,0 mg olarak bulundu.



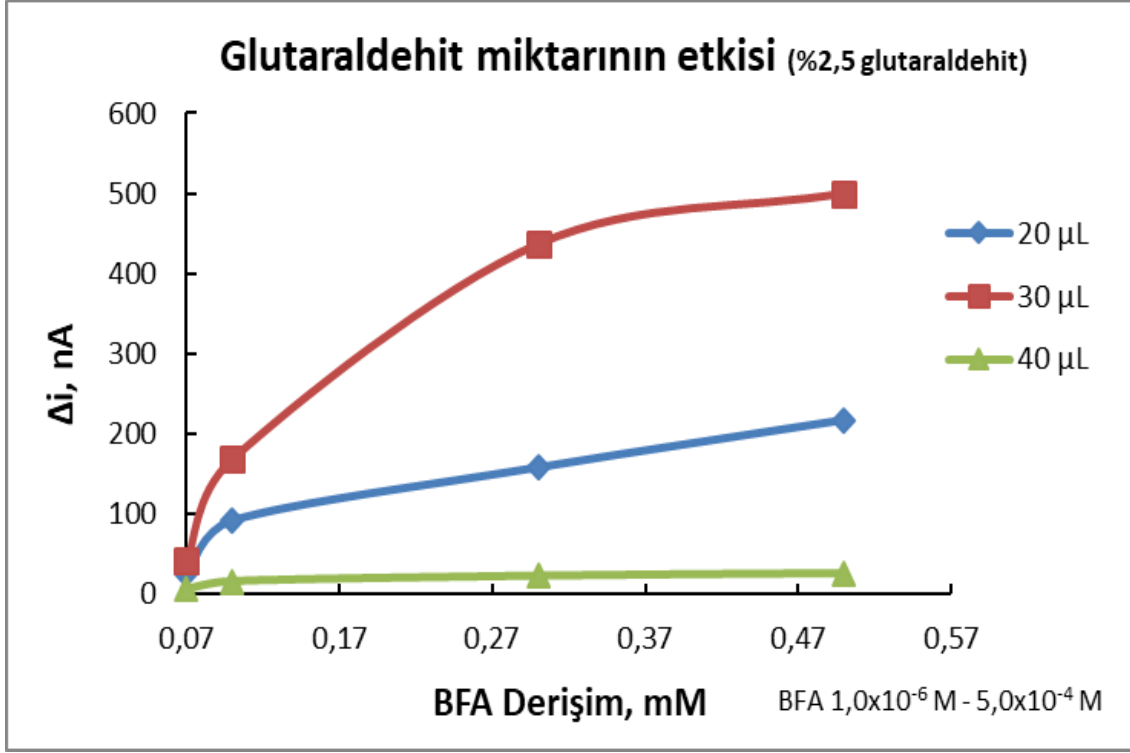
Şekil 4.4. Polimer miktarının bisfenol-A biyosensörüne karşı olan etkisi (-0,10V potansiyel, 0,1M pH 7,0 fosfat tamponu, 25°C, $1,0 \times 10^{-6}$ - $5,0 \times 10^{-4}$ M bisfenol-A derişimi).

4.1.4. Gluteraldehit miktarının etkisinin incelenmesi

Yapılan birçok çalışmada çapraz bağlayıcı olarak gluteraldehit ($\text{CHO-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-CHO}$) reaktifi tercih edilmektedir. Gluteraldehit küçük bir molekül olduğundan enzim yüzeyinde ve iç kısımlarında bulunan amin grupları ile etkileşime girebilir. Bu olay sonucu enzimin aktif bölgesi fazla çapraz bağlama ile bloke olabilir. Enzimin üç boyutlu yapısı değişebilir ve aktivite kayıpları yaşanabilir (Xin, 1997). Enzimin aktif bölgesinin etkilenmemesi ve aktivite kayıpları yaşanmaması için kullanılan gluteraldehit miktarının araştırılması fayda sağlayacaktır.

Hazırlanan biyosensörde kullanılacak olan en iyi gluteraldehit miktarını belirleyebilmek için 20 μL , 30 μL ve 40 μL , %2,5'luk gluteraldehit çözeltisi ile hazırlanmış elektrotlar bisfenol-A tayini için kullanıldı. Denge akımı okundu ve akım farkları grafiğe geçirildi (Şekil4.5). Gluteraldehit miktarının 20 μL 'den 30 μL 'ye çıkarılmasıyla akımlarda bir artış olduğu görülmüştür. 30 μL 'den 40 μL 'ye çıkarıldığında ise aktivitede kayıplar yaşanıp akımların azaldığı gözlemlenmiştir. Yapılan deneylerle ulaşılan sonuçlar şu şekilde yorumlanmıştır;

20 μL glutaraldehitin enzimi immobilize edebilmede yetersiz kaldığı ve yapıyı bir arada tutamada zorlandığı, 40 μL glutaraldehitin fazla olması sonucu aşırı bağlanmadan dolayı enzimde aktivite kaybına yol açtığı düşünüldü. Oluşturulan grafik incelendiği zaman en yüksek akımların 30 μL glutaraldehit içeren elektrot olduğu tespit edildi (Şekil 4.5).



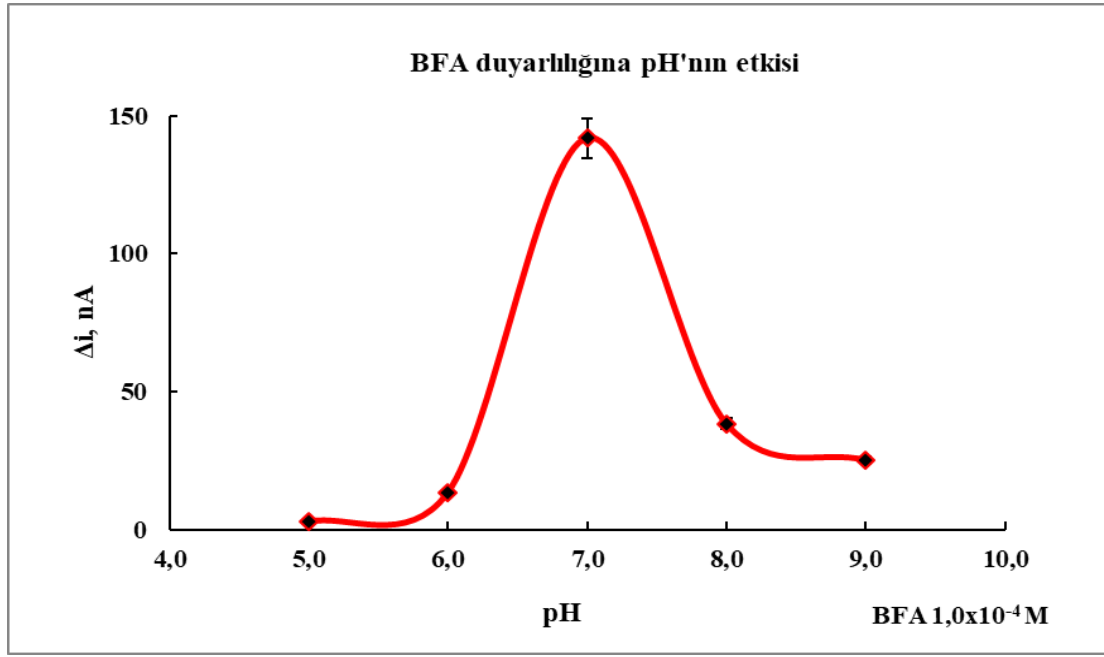
Şekil 4.5. Glutaraldehit miktarının bisfenol-A biyosensörüne karşı etkisi (-0,10V potansiyel, 0,1M pH 7,0 fosfat tamponu, 25 °C, $1,0 \times 10^{-6}$ - $5,0 \times 10^{-4}$ M bisfenol-A derişimi).

4.1.5. pH'nın etkisinin incelenmesi

Değişen pH değerlerinin enzimlerin aktivitelerine etki ettiği bilinmektedir. Yapılan bu çalışmada optimum pH değerinin belirlenebilmesi için çalışılacak biyosensör pH 5,0 - 6,0 - 7,0 - 8,0 - 9,0 da hazırlanan tampon çözeltileri içinde -0,10V'da dengeye gelene kadar bekletildi. Hücre derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde bisfenol-A eklemeleri yapıldı. Denge akımı okundu. Deneyler iki kez daha tekrarlandı ve Δi_1 , Δi_2 , Δi_3 değerleri elde edildi. Akım farkının ortalaması alınarak Δi_{ort} değeri hesaplandı. Bisfenol-A derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.6).

Çizilen grafik incelendiğinde en yüksek akım değerinin pH 7,0'de olduğu gözlemlendi. Bundan sonraki yapılan çalışmalarda tampon çözeltisi pH 7,0 olarak kullanıldı. Yapılan

literatür araştırmalarında farklı materyallerle yapılmış olan ve tirozinaz enzimi varlığında hazırlanmış biyosensör çalışmalarında, çalışmamızla uyum içinde olan optimum pH değerleriyle birlikte farklı pH değerlerinde çalışmalarda olduğu gözlemlendi. Kitamura pH=7,0 (Kitamura, 2005) Cemeroğlu pH=6,5'da (Cemeroğlu, 2001) çalışmışlardır. pH değerlerindeki bu değişimin nedeni immobilize edilen materyallerin içeriklerinin farklı olduğu ve immobilizasyon yöntemlerindeki farklılıklardan kaynaklı olduğu düşünüldü.



Şekil 4.6. pH'nın bisfenol-A biyosensörüne amperometrik olarak etkisi (-0,1V potansiyel, 25°C, 1,0x10⁻⁴ M bisfenol-A derişimi).

4.1.6. Sıcaklığın etkisinin incelenmesi

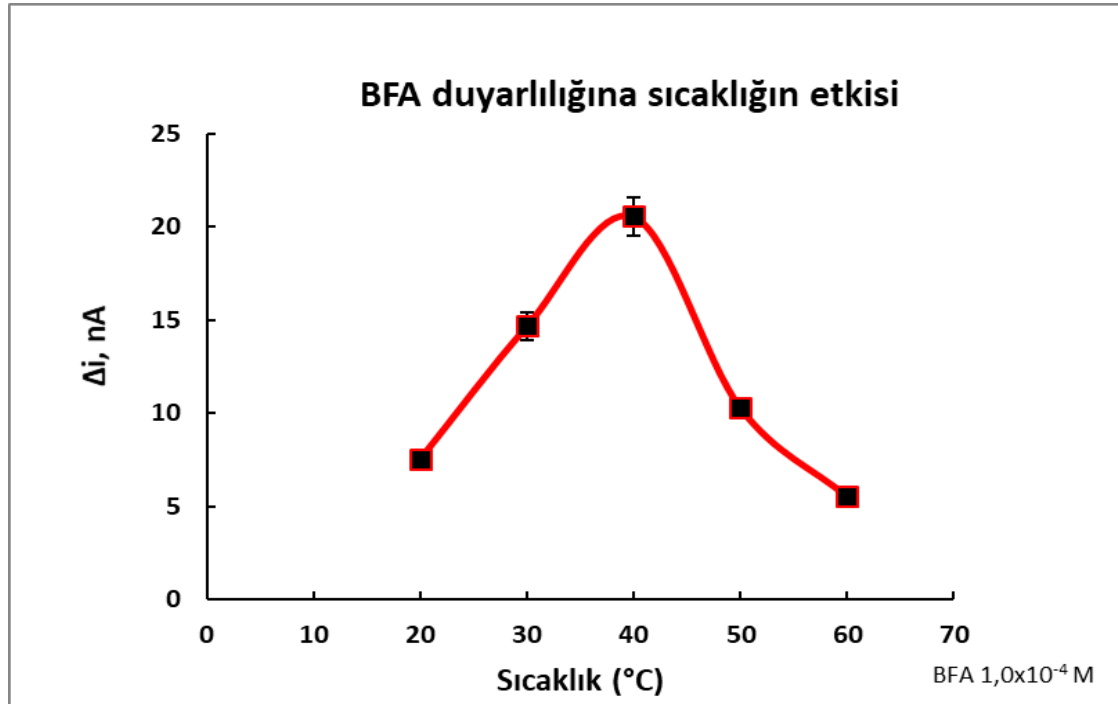
Enzimler proteinlerin tersiyer yapısında olduklarından sıcaklığa karşı duyarlı oldukları bilinmektedir. Düşük sıcaklıklarda enzimlerin aktivitesinde azalma, yüksek sıcaklıklarda ise enzimlerin denatüre olarak yine aktivitelerinde azalmalar gözlemlenir. Enzimler bulunduğu ortam koşullarına en iyi şekilde adapte olarak optimum çalışma sıcaklığını belirlemişlerdir (Henri, 2006).

Yapılan bu çalışmada kullanılan enzimin optimum çalışma sıcaklığını belirleyebilmek için hazırlanan biyosensör 0,1M pH 7,0 olan fosfat tamponu içinde -0,10V'da termostatlı ve dolaşımli su banyosu içinde 20°C - 30°C - 40°C - 50°C - 60°C'lere geldiğinde sabit halde

tutarak dengeye gelene kadar bekletildi. Dengeye gelme işlemi tamamlandıktan sonra hücre derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde bisfenol-A ilavesi yapıldı.

Denge akımları okundu ve kaydedildi. Deneyler iki kez daha tekrarlandı ve Δi_1 , Δi_2 , Δi_3 değerleri elde edildi. Akım farkının ortalaması alınarak Δi_{ort} değeri hesaplandı. Bisfenol-A derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.7). Çizilen grafik incelendiğinde en yüksek akım değerinin 40°C de olduğu gözlemlendi. Ancak bu çalışmadan sonra yapılan deneylere daha kolay ve pratik olabilmesi için oda sıcaklığında devam edildi.

Yapılan literatür araştırmalarında farklı materyaller kullanılarak ve tirozinaz enzimi varlığında hazırlanan biyosensör çalışmalarında, yapılan çalışmalarımızla uyum içinde olan optimum sıcaklık değerleriyle birlikte farklı sıcaklık değerlerinde çalışmalarda olduğu gözlemlendi. Gupta ve arkadaşları 35°C 'de (Gupta, 2017), Koçak ve arkadaşları 40°C çalışmışlardır (Koçak. H, 2020).



Şekil 4.7. Sıcaklığın bisfenol-A biyosensörüne karşı etkisi (-0,10V potansiyel, 0,1M pH 7,0 fosfat tamponu, $1,0 \times 10^{-4}$ M bisfenol-A derişimi

4.1.7. Bisfenol-A'ya kullanılan substratın derişiminin etkisi

Bisfenol-A ya duyarlı hazırlanan biyosensöre substratın etkisini incelemek amacıyla -0,10V'da artan bisfenol-A derişimine ($1,0 \times 10^{-9}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M) karşı immobilize edilmiş olan elektrodun amperometrik akımları kaydedildi. Bisfenol-A derişimine karşı akım farkları grafiğe geçirildi (Şekil 4.8). Michaelis-Menten eğrisi olarak bilinen şekile bakıldığında bisfenol-A derişimi arttıkça akım farklarının öncelikle doğrusal olarak arttığı daha sonra artan derişimlerde doğrusallıktan sapıp hiperbolik bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir.

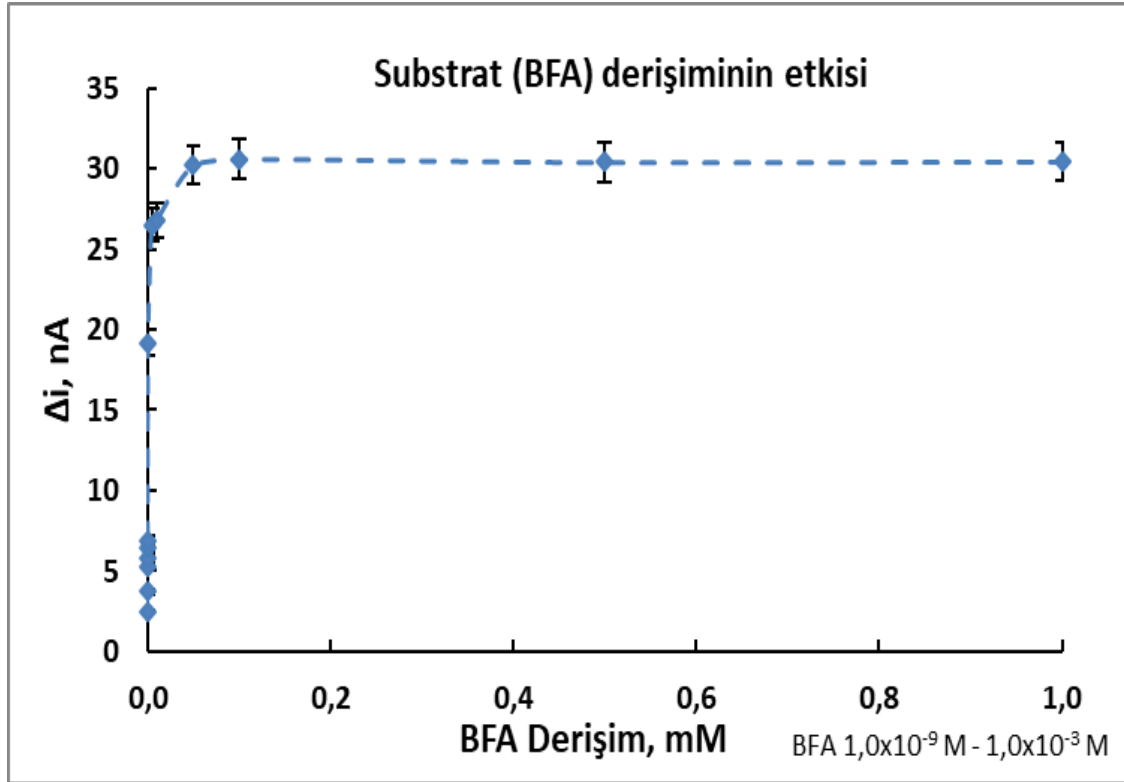
Bisfenol-A derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M'dan sonra artan derişimlerde eklemelere devam edildiğinde akım farklarındaki artışın oldukça küçük olduğu görülmektedir. $1,0 \times 10^{-4}$ M'dan itibaren tirozinaz enzimi bisfenol-A ile doyunluk seviyesine ulaştığından akım farklarındaki değişim oldukça küçük olmuştur.

Şekil 4.8'in doğrusal bölgelerdeki verileri grafiğe geçirildiği zaman bisfenol-A tayini için kullanılabilecek olan iki tane kalibrasyon grafiği olduğu görüldü. (Şekil 4.9) (Şekil 4.10). Kalibrasyon grafikleri incelendiği zaman ($1,0 \times 10^{-9}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M) derişimleri arasında doğrusal bölge çalışma aralıklarının ($R^2=0,9530$ ve $R^2=0,9765$) $0,001 \mu\text{M}$ - $0,05 \mu\text{M}$ ve $0,1 \mu\text{M}$ - $1 \mu\text{M}$ arasında, alt tayin sınırının ise 1 nM olduğu belirlenmiştir.

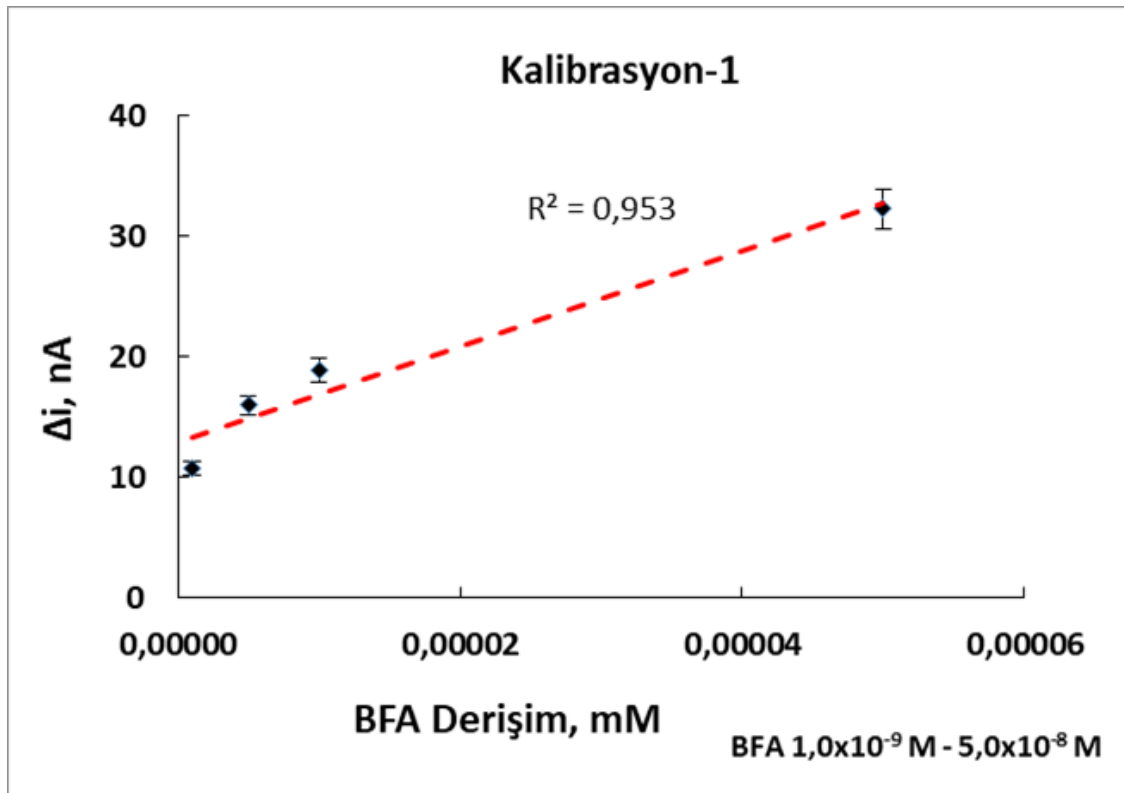
Literatür incelemeleri yapıldığında doğrusal aralığı 100 fM - $1 \mu\text{M}$, tayin sınırı ise 5 nM (Yu, 2019), doğrusal çalışma aralığı $1,25$ - $10,0 \mu\text{M}$, alt tayin sınırı $18,21 \text{ nM}$ (Sun, 2013) olduğu görülmüştür. Hazırlamış olduğumuz biyosensörün doğrusal çalışma aralığının oldukça geniş ve alt tayin sınırının düşük olduğunu söyleyebiliriz.

Michaelis - Menten eğrisi hiperbolik olan bir eğridir. Enzimler için yüksek spesifiteye sahip olan K_m ve V_{max} değerleri oluşan grafikten doğru olarak hesaplanamaz. Bu sebepten dolayı Michaelis - Menten eşitliğinin her iki tarafı ters çevrilerek yeni bir eşitlik ve doğrusal olan Lineweaver Burk grafiği oluşturulur. (Şekil 4.11).

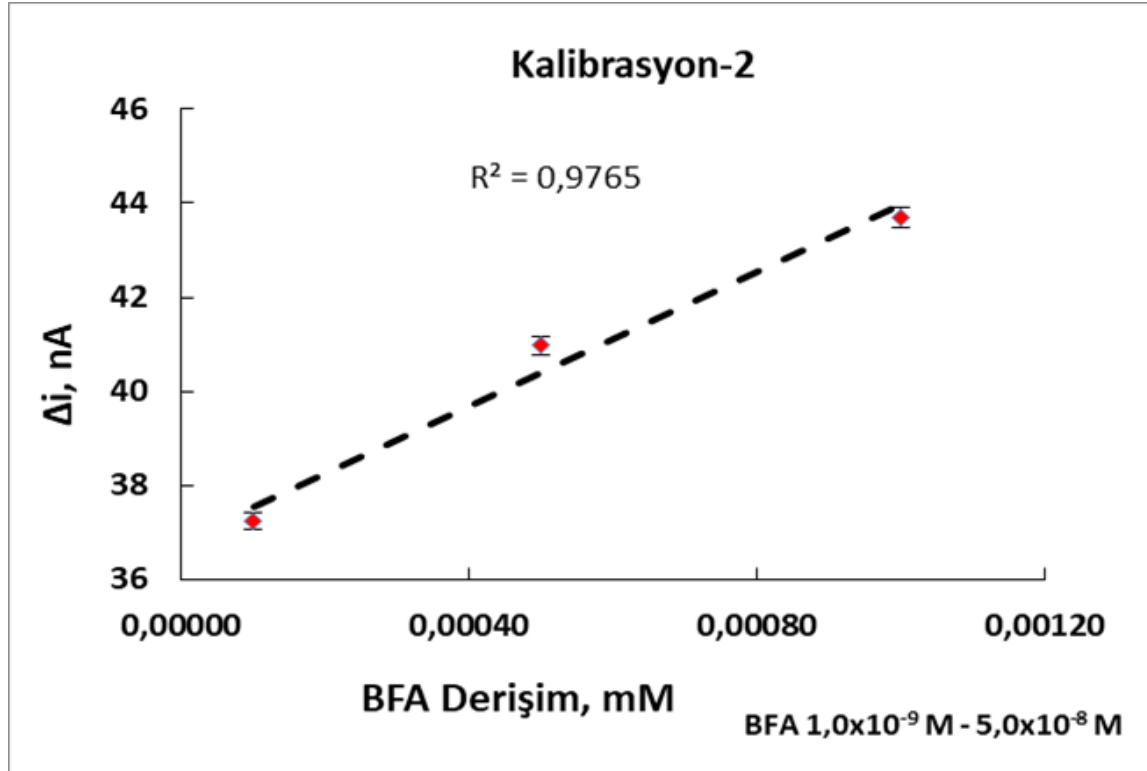
Şekil 4.11 incelendiği zaman $K_{m(göz)}$ değerinin $0,00325 \mu\text{M}$, $I_{max(göz)}$ değerinin ise $0,04065 \mu\text{A}$ olduğu görülmektedir. Hazırlamış olduğumuz biyosensörün bisfenol-A'ya ilgiyi gösteren $K_{m(göz)}$ değeri literatürlerde olan $K_{m(göz)}$ değerlerinden daha düşük olduğu yapılan deneylerle belirlenmiştir (Yu, 2019; Sun, 2013). K_m değerinin düşük olması kullanılan polimerin enzimin substratına olan ilgisini arttırdığı görülmüştür.



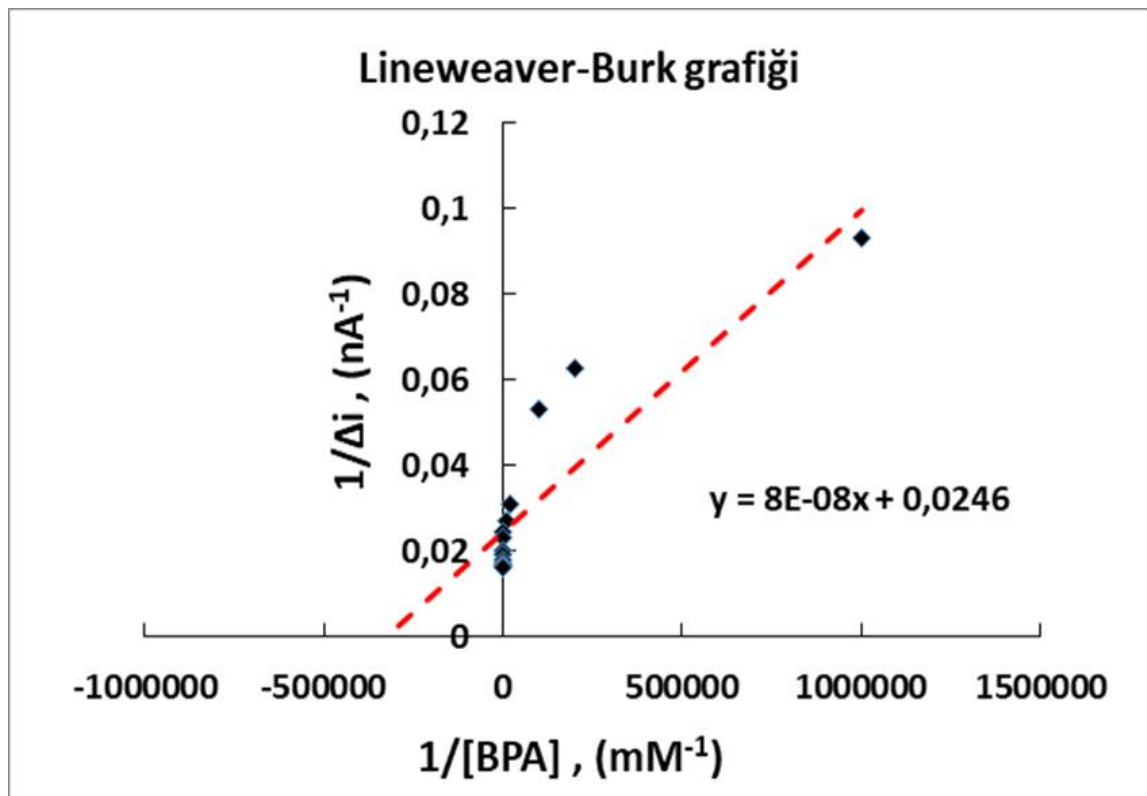
Şekil 4.8. Substart miktarının bisfenol-A biyosensörüne karşı etkisi (-0,10V potansiyel, 25°C, pH 7,0 fosfat tamponu $1,0 \times 10^{-9}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M bisfenol-A derişimi).



Şekil 4.9. Bisfenol-A biyosensörü için oluşturulan kalibrasyon grafiğı 1 (-0,10V potansiyel, 25 °C, 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu).



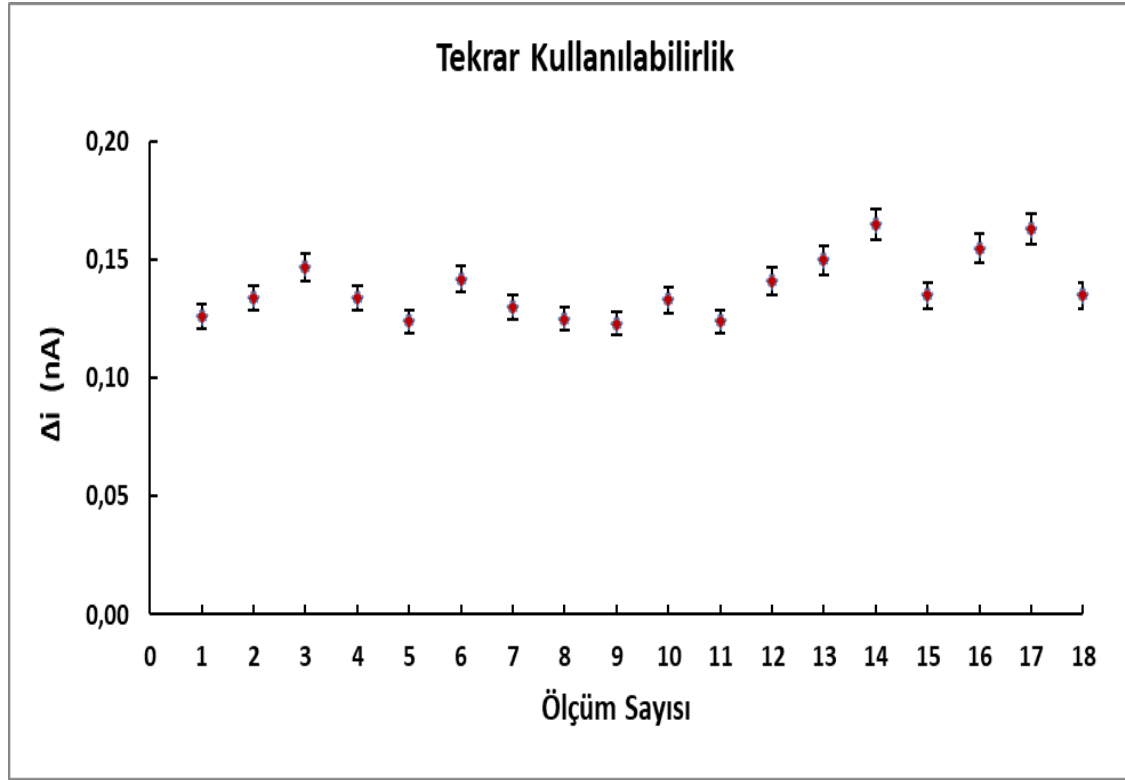
Şekil 4.10. Bisfenol-A biyosensörü için oluşturulan kalibrasyon grafiği 2 (-0,10V potansiyel, 25°C, 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu).



Şekil 4.11. Tirozinaz enzimi varlığında oluşan Lineweaver – Burk grafiği (25°C de, -0,10V çalışma potansiyeli, 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu).

4.1.8. Tekrarlanabilirliğin belirlenmesi

Elektrokimyasal hücre derişimi 0,1M olacak şekilde NaCl çözeltisi ve 0,1M pH 7,0 olan 9,0 mL fosfat tamponu çözeltisi çalışma hücreesine ilave edildi ve -0,10V'da dengeye getirildi. Dengeye getirilen biyosensörün optimum şartlarda tekrarlanabilirliğinin belirlenebilmesi için hücre derişimi $2,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde bisfenol-A ilavesi yapıldı. Denge akımı okundu ve kaydedildi. Yapılan bu çalışmalar 17 kez tekrarlandı ve grafiğe geçirildi (Şekil 4.12). 18 ölçüm sonunda ulaşılan akım değişimlerinden hesaplamalar yapılarak bağıl standart sapma %9,43 olarak bulundu. Yapılan 18 ölçüm sonunda biyosensörün başlangıç aktivitesinin %6,67'sini kaybettiği gözlemlendi.

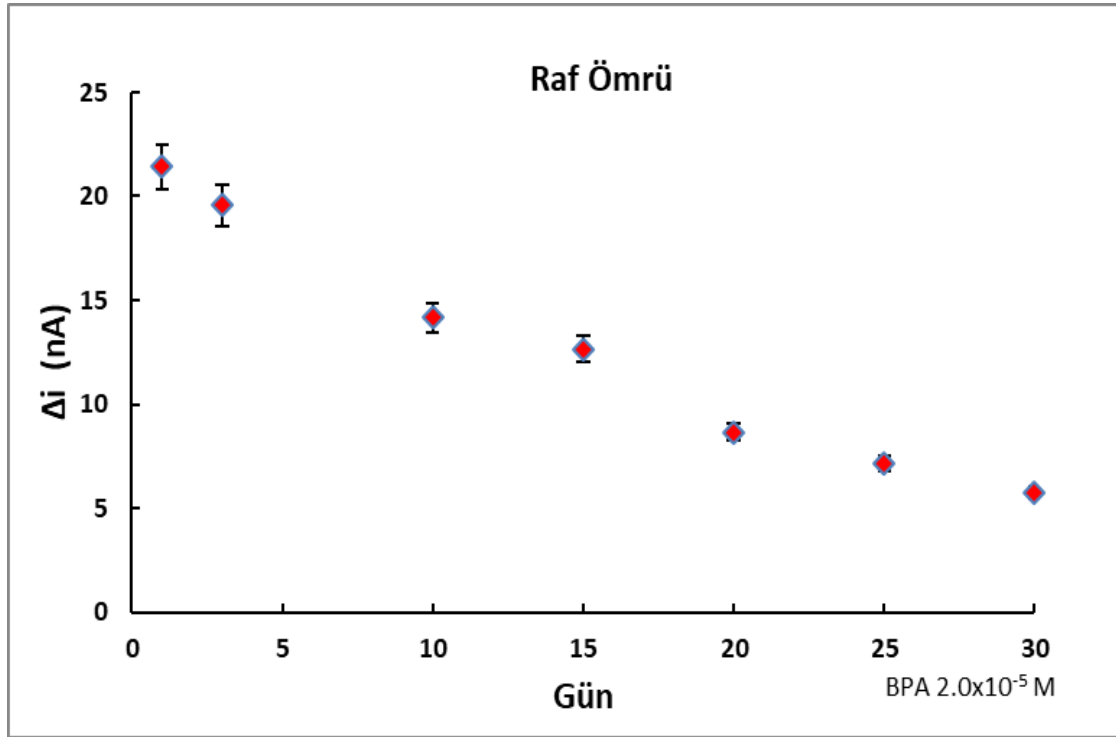


Şekil 4.12. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi (-0,10V potansiyel, pH 7,0 fosfat tamponu, 25 °C, $2,0 \times 10^{-5}$ M bisfenol-A derişimi).

4.1.9. Raf ömrü süresinin bulunması

Elektrokimyasal hücre derişimi 0,1M olacak şekilde NaCl çözeltisi ve 0,1M pH 7,0 olan 9,0 mL fosfat tamponu çözeltisi çalışma hücreesine ilave edildi ve -0,10V'da dengeye getirildi. Dengeye gelme işlemi tamamlandıktan sonra hücre derişimi $2,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde

bisfenol-A eklendi. Denge akımı okundu ve kaydedildi. Deneyler iki kez daha tekrarlandı ve Δi_1 , Δi_2 , Δi_3 değerleri elde edildi. Akım farkının ortalaması alınarak Δi_{ort} değeri hesaplandı. Bisfenol-A derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.13). Grafik incelendiğinde 1-3. gün aralığında gözlenen akım değışiminin düşük olduğu 3-15.gün aralığında akım düşüşlerinin arttığı 15-30. günler arasında akım düşüşünün yavaşladığı kaydedilmiştir. Biyosensörün 30. gün sonunda başlangıç aktivitesinin %26,75'ini koruduğu görüldü. Koçak H. ve arkadaşları biyosensörün 25. gün sonunda başlangıç aktivitesinin %24,05'ini, Sun ve arkadaşları biyosensörün 30. gün sonunda başlangıç aktivitesinin %30,57'sini koruduğunu gözlemlemişlerdir.



Şekil 4.13. Biyosensörün raf ömrü süresinin bulunması (-0,10V potansiyel, 0,1M pH 7,0 fosfat tamponu, 25 °C, $2,0 \times 10^{-5}$ M bisfenol-A derişimi).

4.1.10. Bisfenol-A tayininde girişim oluşturabilecek türlerin etkisinin belirlenmesi

Bisfenol-A tayini sırasında girişim yapabilecek türler için literatür incelemeleri yapıldı. Bu incelemeler sonucunda girişim yapabilen maddeler asetonitril, etilasetat, hegzan, fenol, nitrofenol, üre ve potasyum nitrat olarak bulundu. Bu maddeler ile inceleme yapılırken hücre içi derişim $1,0 \times 10^{-8}$ M olacak şekilde bisfenol-A ilave edildi. Girişimi incelenecek türün ise hücre içi derişimi $1,0 \times 10^{-8}$ M olacak şekilde eklemeler. Oluşabilecek girişimlerin en aza

indirgenmesi veya yok edilmesi gerçek numune analizlerinin tespiti ve doğruluğu açısından önem teşkil etmektedir. Bu maddelerden asetonitril (C_2H_3N), etilasetat ($C_4H_8O_2$), hegzan (C_6H_{14}), fenol (C_6H_5OH), nitrofenol ($C_6H_5NO_3$), üre (CH_4N_2O), potasyum nitratın (KNO_3), bisfenol-A tayinine girişim yapmadıkları tespit edildi.

Literatür incelemesi yapıldığında Koçak. H ve arkadaşları bisfenol-A tayini yaparken girişim yapabilecek türlerin etkisini incelemek amacı ile fenol, nitrofenol, potasyum nitrat, üre, hegzan, etil asetat ve asetonitril maddelerini kullanmışlardır. Bu maddeleri incelemek için hücre derişimi 2×10^{-8} M olacak şekilde BFA, girişim yapan maddelerin derişimini ise 2×10^{-9} M olacak şekilde hazırlayıp eklemeler yapmışlardır. Bu incelenen maddelerin girişim yapmadıklarını tespit etmişlerdir (Koçak.H, 2020).

4.1.11. Biyosensörün gerçek örnekler üzerinde çalışmasının incelenmesi

Elektrokimyasal hücre derişimi 0,1M olacak şekilde NaCl çözeltisi ve 0,1M pH 7,0 olan 9,0 mL fosfat tamponu çözeltisi ilave edildi ve -0,10V'da dengeye getirildi. Dengeye gelme işlemi tamamlandıktan sonra hücre içine (bölüm 3.4.10 göre) hazırlanan numuneden 100 μ L ilave edildi. Denge akımı okundu ve kaydedildi. Akım farkına (Δi) karşılık gelen derişim değeri kalibrasyon grafiklerinde (Şekil 4.9) yerine koyularak karşılık gelen değerler belirlendi. Yapılan bu çalışmalar üç kez tekrarlanıp ortalamaları alınarak Δi_{ort} değeri hesaplandı ve bisfenol-A derişimine karşı grafiğe geçirildi.

Çevre koruma ajansı (U.S EPA) plastik su şişesinde ve bebek biberonlarında BFA kullanımını 2010 yılından itibaren yasaklamıştır (Jalal, 2018). Yapılan su şişesi deneylerinde de ölçülen bisfenol-A değerleri kalibrasyon grafiğinin dışında kalmıştır. Sonuç olarak su şişesinde BFA'ya rastlanmamıştır.

Oda sıcaklığında saf su içerisinde 48 saat bekletilen plastik saklama kabından, dengeye getirilen hücreye numuneden 100 μ L ilave edildi. Denge akımı okundu ve kaydedildi. Bu çalışma üç kez tekrarlandı ve akım farkı ortalaması $-8,0 \times 10^{-9}$ M olarak bulundu. Bulunan değer kalibrasyon grafiğinde (Şekil 4.9) yerine koyularak 100 μ L suda BFA miktarı 0,165 mM olarak belirlendi. Bu değer mole çevrilirse $0,165 \text{ mM} / 10^6 \text{ M} = 1,65 \times 10^{-7} \text{ mol}$ olarak bulunur. Bisfenol-A'nın moleköl kütlesi ile çarpıldığında $1,65 \times 10^{-7} \text{ mol} \times 228,29 \text{ g/mol} = 3,767 \times 10^{-5} \text{ g}$ elde edilir. Bu değer 1000 mg'daki değer olduğu için 0,0377 mg/kg elde edilir.

Bu deneyler ve hesaplamalar 78°C saf su ve oda sıcaklığında etil alkol içinde bekletilen numunelere de uygulanarak aşağıdaki çizelgede verilen değerler elde edilmiştir.

Çizelge 4.1. Gerçek örneklerle biyosensörün uygulanması

Plastik saklama kabı saf su oda sıcaklığı (48 saat)	0,0377 ± 0,0008 mg/kg
Plastik saklama kabı etil alkol oda sıcaklığı (48saat)	0,0385 ± 0,0002 mg/kg
Plastik saklama kabı saf su 78 °C (48saat)	0,0394 ± 0,0005 mg/kg

Oda sıcaklığında saf su içinde 48 saat bekletilen plastik saklama kabı ile 78°C de saf su içinde 48 saat bekletilen plastik saklama kabı karşılaştırıldığında saf su içine salınan BFA miktarının 78°C de daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan literatür araştırmalarında gıdaların muafaza edilmesinde kullanılan BFA katkılı konserve ve plastik saklama kaplarının ısıtılması sonucunda BFA'nın gıda ürünlerine sızmasının arttığı bilinmektedir (Doerge, 2010).

Oda sıcaklığında saf su içinde 48 saat bekletilen plastik saklama kabı ile oda sıcaklığında etil alkol içinde 48 saat bekletilen plastik saklama kabı karşılaştırıldığında etil alkolde çözünen BFA miktarının saf suya oranla daha fazla olduğu görülmektedir. Yapılan literatür araştırmalarında BFA'nın sudaki çözünürlüğünün düşük olmasına karşın organik çözücülerde iyi çözünen bir kimyasal madde olduğu bilinmektedir (Fernandez, 2007).

Oda sıcaklığında etil alkol içinde 48 saat bekletilen plastik saklama kabı ile 78°C de saf su içinde 48 saat bekletilen plastik saklama kabı karşılaştırıldığında 78°C de çözünen BFA miktarının, etil alkolde çözünen BFA miktarından daha fazla olduğu belirlenmiştir (Wu, L, 2020).

Literatür araştırmalarına göre tolere edilebilir günlük doz miktarı 0,05mg/kg'dır (Buket, 2011). Deneyisel çalışmamıza göre plastik saklama kabında bulunan BFA miktarları tolere edilebilir günlük doz sınırları içerisinde.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında PAMAM-Sal-Pd (II) polimeri kullanılarak hazırlanan bisfenol-A'ya duyarlı biyosensör;

- Biyosensörün hazırlanması kolay, pratik ve maliyeti düşüktür.
- Biyosensörün cevap süresi 200 s olarak belirlendi.
- Biyosensör çalışmasında kullanılan enzimin optimum çalışması için gereken pH 7,0 olarak belirlendi.
- Biyosensörün en iyi çalışma sıcaklığı 40 °C olarak belirlendi.
- Hazırlanan biyosensörün doğrusal bölge çalışma aralığı 0,001µM-0,05µM ve 0,1µM-1µM arasında, ($R^2=0,9530$ ve $R^2=0,9765$), tayin sınırı ise 0,001µM olduğu belirlendi. Biyosensörün tayin sınırının oldukça düşük olması, biyosensörün çok küçük derişimlerdeki madde miktarlarının tayin edilebilmesine olanak sağlamaktadır.
- Biyosensörün K_m (göz) değeri, 0,00325 µM olarak tespit edilmiştir. Hazırlamış olduğumuz biyosensörün bisfenol-A'ya ilgiyi gösteren K_m (göz) değeri literatürlerde olan K_m (göz) değerlerinden daha düşük olduğu yapılan deneylerle belirlenmiştir. K_m değerinin düşük olması düşük derişimleri tayin edebilme imkanı sağlar ve kullanılan PAMAM-Sal-Pd (II) polimerinin, enzimin substratına olan ilgisini yaklaşık iki kat arttırdığı görülmektedir.
- 18 ölçüm sonunda elde edilen akım değışimlerinden hesaplamalar yapılarak bağıl standart sapma %9,43 olarak bulundu ve biyosensörün başlangıç aktivitesinin %6,67'sini kaybettiği gözlemlendi. Elde edilen verilere dayanarak elektrodun tekrarlanabilirliğinin kabul edilebilir düzeyde olduğu görülmektedir.
- Raf ömrü süresi incelendiğinde, 30. gün sonunda başlangıç aktivitesinin %26,75'ini koruduğu görüldü.
- Sonuç olarak elde edilen bisfenol-A'ya duyarlı biyosensör, düşük cevap süresine, geniş çalışma aralığı ve düşük tayin sınırına sahiptir. Bunlara ek olarak tekrarlanabilirliğinin iyi olması ve uzun bir raf ömrü süresine sahip olması hazırlanan biyosensörün avantajlarındandır.

Yapılan bu çalışmada elde edilen bisfenol-A biyosensörünün uygulama alanları bulabileceği, kullanım imkanlarının olabileceği ve geliştirilmeye açık olduğu söylenebilir.

KAYNAKLAR

- Aehle, W. (2004). Enzymes in industry: production and applications (Second. *Enzymes in industry: production and applications (Second, completely revised edition).*, (Ed. 2).
- Akyilmaz, E., & Yorganci, E. (2008). A novel biosensor based on activation effect of thiamine on the activity of pyruvate oxidase. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(12), 1874-1877.
- Akyilmaz, E., Baysal, Ş. H., ve Dinçkaya, E. (2007). Investigation of metal activation of a partially purified polyphenol oxidase enzyme electrode. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, 87(10-11), 755-761.
- Ayazgök, B., & Küçükkilinç, T. T. (2017). Düşük Doz Bisfenol A'nın Büyük Etkileri. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(2), 139.
- Bahadır, A. (2011). Ratlarda uzun dönem bisfenol a kullanımı üzerine alfa tokoferol ve alfa lipoik asit'in etkileri.
- Bickerstaff, G. F. (1997). Immobilization of Enzyme as the 21 st Century Begins. *Immobilization of Enzyme and Cells*.
- Bodur, O. C. (2019). Alzheimer hastalığının teşhisi için asetilkolin biyosensörünün hazırlanması. *Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara*, 3-20.
- Bolt, H. M., and Stewart, J. D. (2011). Highlight report: the bisphenol A controversy. *Archives of toxicology*, 85(12), 1491-1492.
- Buket, E. R. ve Sarımeahmetoğlu, B. (2011). Gıdalarda bisfenol A varlığının değerlendirilmesi. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 82(1), 69-74.
- Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A., & Özkan, M. (2001). Meyve ve sebzelerin bileşimi soğukta depolanmaları. *Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları*, 24(3), 21-25.
- Churchwell, M. I., Camacho, L., Vanlandingham, M. M., Twaddle, N. C., Sepehr, E., Delclos, K. B., ... and Doerge, D. R. (2014). Comparison of life-stage-dependent internal dosimetry for bisphenol A, ethinyl estradiol, a reference estrogen, and endogenous estradiol to test an estrogenic mode of action in Sprague Dawley rats. *Toxicological Sciences*, 139(1), 4-20.
- Cimmino, I., Fiory, F., Perruolo, G., Miele, C., Beguinot, F., and Formisano, P. (2020). Potential mechanisms of bisphenol A (BPA) contributing to human disease. *International journal of molecular sciences*, 21(16), 5761.

- Doerge, D. R., Twaddle, N. C., Vanlandingham, M., and Fisher, J. W. (2010). Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult Sprague-Dawley rats. *Toxicology and applied pharmacology*, 247(2), 158-165.
- Dündar, B. S. (2014). İçme Sularında Bisfenol-A araştırması, Ankara Örneği. *Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.*
- Dzyadevych, S. V., Arkhypova, V. N., Soldatkin, A. P., El'Skaya, A. V., Martelet, C., and Jaffrezic-Renault, N. (2008). Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. *Irbm*, 29(2-3), 171-180.
- Erdem, C. (2012). Glukoz Tayini için Nikel Oksit Modifiye Karbon Pasta Elektrotların Hazırlanması. *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.*
- FDA, U. (2010). Update on bisphenol A for use in food contact applications. *US Food and Drug Administration, Silver Spring, MD.*
- Fernandez, M. F., Arrebola, J. P., Taoufiki, J., Navalón, A., Ballesteros, O., Pulgar, R., ... and Olea, N. (2007). Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reproductive toxicology*, 24(2), 259-264.
- Garcia-Molina, F., Munoz, J. L., Varón, R., Rodriguez-Lopez, J. N., Garcia-Canovas, F., and Tudela, J. (2007). A review on spectrophotometric methods for measuring the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(24), 9739-9749.
- Gerardo, R. M. (2005). Biosensor immunoassays for the dedection of bisphenol-A. *Analytica Chimica Acta*, 558, 37-45
- Gupta, S., & Wood, R. (2017). Development of FRET biosensor based on aptamer/functionalized graphene for ultrasensitive detection of bisphenol A and discrimination from analogs. *Nano-Structures and Nano-Objects*, 10, 131-140.
- Henri, V. (2006). Théorie générale de l'action de quelques diastases par Victor Henri [CR Acad. Sci. Paris 135 (1902) 916-919]. *Comptes rendus. Biologies*, 329(1), 47-50.
- Huang, Y. Q., Wong, C. K. C., Zheng, J. S., Bouwman, H., Barra, R., Wahlström, B., ... and Wong, M. H. (2012). Bisphenol A (BPA) in China: a review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environment international*, 42, 91-99.
- Jalal, N., Surendranath, A. R., Pathak, J. L., Yu, S., and Chung, C. Y. (2018). Bisphenol A (BPA) the mighty and the mutagenic. *Toxicology reports*, 5, 76-84.
- Kim, Y. J., and Uyama, H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and molecular life sciences CMLS*, 62(15), 1707-1723.

- Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., ... and Ohta, S. (2005). Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicological Sciences*, 84(2), 249-259.
- Klonoff, D. C. (2005). A review of continuous glucose monitoring technology. *Diabetes Technology and Therapeutics*, 7(5), 770-775.
- Koçak, H. (2020). *Bisfenol-A tayini için bir biyosensör hazırlanması* (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Kökbaş, U., Kayrın, L., ve Abdullah, T. U. L. İ. (2013). Biyosensörler ve tıpta kullanım alanları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 22(4), 499-513.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685..
- Lerner, A. B., and Fitzpatrick, T. B. (1950). Biochemistry of melanin formation. *Physiological reviews*, 30(1), 91-126.
- Lineweaver, H., and Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American chemical society*, 56(3), 658-666.
- Lobo, M. J., Miranda, A. J., and Tuñón, P. (1997). Amperometric biosensors based on NAD (P)-dependent dehydrogenase enzymes. *Electroanalysis*, 9(3), 191-202..
- Manfo, F. P. T., Jubendradass, R., Nantia, E. A., Moundipa, P. F., and Mathur, P. P. (2014). Adverse effects of bisphenol A on male reproductive function. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 228*, 57-82.
- Messaoud, N. B., Ghica, M. E., Dridi, C., Ali, M. B., and Brett, C. M. (2018). A novel amperometric enzyme inhibition biosensor based on xanthine oxidase immobilised onto glassy carbon electrodes for bisphenol A determination. *Talanta*, 184, 388-393.
- Metin, A. K., Soğancı, T., Gümüşay, O., ve Çukurluoğlu, S. Yeşil kimya ile iletken polimer sentezi ve elektrokromik özellikleri. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 23(6), 753-758.
- Nice, E. C., and Catimel, B. (1999). Instrumental biosensors: new perspectives for the analysis of biomolecular interactions. *Bioessays*, 21(4), 339-352.
- Özdal, T., ve Yeşilcubuk, N. Ş. (2014). Toxicity of bisphenol-a: effects on health and regulations. *International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering*, 8(6), 553-557.

- Pan, D., Gu, Y., Lan, H., Sun, Y., and Gao, H. (2015). Functional graphene-gold nano-composite fabricated electrochemical biosensor for direct and rapid detection of bisphenol A. *Analytica Chimica Acta*, 853, 297-302..
- Rahman, M. S., Kwon, W. S., Karmakar, P. C., Yoon, S. J., Ryu, B. Y., and Pang, M. G. (2017). Gestational exposure to bisphenol A affects the function and proteome profile of F1 spermatozoa in adult mice. *Environmental health perspectives*, 125(2), 238-245.
- Rittersma, Z. M. (2002). Recent achievements in miniaturised humidity sensors—a review of transduction techniques. *Sensors and Actuators A: Physical*, 96(2-3), 196-210.
- Rochester, J. R. (2013). Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reproductive toxicology*, 42, 132-155.
- Scott, A. M., Wolchok, J. D., and Old, L. J. (2012). Antibody therapy of cancer. *Nature reviews cancer*, 12(4), 278-287.
- Spille, G. A. (1997). Caffeine, Chapter 3. Tea: The Plant and Its Manufacture; Chemistry and Consumption of the Beverage.
- Stetter, J. R., and Penrose, W. R. (2002). Understanding chemical sensors and chemical sensor arrays (electronic noses): Past, present, and future. *Sensors update*, 10(1), 189-229.
- Sun, P., and Wu, Y. (2013). An amperometric biosensor based on human cytochrome P450 2C9 in polyacrylamide hydrogel films for bisphenol A determination. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 178, 113-118.
- Şimşek, Ş., ve Yemenicioğlu, A. (2007). Partial purification and kinetic characterization of mushroom stem polyphenoloxidase and determination of its storage stability in different lyophilized forms. *Process Biochemistry*, 42(6), 943-950.
- Tang, X., Bansaruntip, S., Nakayama, N., Yenilmez, E., Chang, Y. L., and Wang, Q. (2006). Carbon nanotube DNA sensor and sensing mechanism. *Nano letters*, 6(8), 1632-1636..
- Telefoncu, A. 1997. Biyosensörler. Biyokimya lisansüstü yaz okulu 20-26 Haziran 1999 Kusadası, Türkiye. *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi*, 1-9.
- Tüylek, Z. (2017). Biyosensörler ve nanoteknolojik etkileşim. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 6(2), 71-80.
- Uhlig, H. (Ed.). (1998). *Industrial enzymes and their applications*. John Wiley and Sons..

- Vaghari, H., Jafarizadeh-Malmiri, H., Mohammadlou, M., Berenjian, A., Anarjan, N., Jafari, N., and Nasiri, S. (2016). Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization. *Biotechnology letters*, 38(2), 223-233.
- Vámos-Vigyázó, L., and Haard, N. F. (1981). Polyphenol oxidases and peroxidases in fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15(1), 49-127.
- Velasco-Garcia, M. N., and Mottram, T. (2003). Biosensor technology addressing agricultural problems. *Biosystems engineering*, 84(1), 1-12.
- Wang, H., Ding, Z., Shi, Q. M., Ge, X., Wang, H. X., Li, M. X., ... and Xu, L. C. (2017). Anti-androgenic mechanisms of Bisphenol A involve androgen receptor signaling pathway. *Toxicology*, 387, 10-16.
- Wenzel, A., Müller, J., and Ternes, T. (2003). Study on endocrine disrupters in drinking water. *Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology (IME)*. ENV. D, 1.
- Wu, L., Lu, X., Niu, K., and Chen, J. (2020). Tyrosinase nanocapsule based nano-biosensor for ultrasensitive and rapid detection of bisphenol A with excellent stability in different application scenarios. *Biosensors and Bioelectronics*, 165, 112407.
- Xin, Q., and Wightman, R. M. (1997). Enzyme modified amperometric sensors for choline and acetylcholine with tetrathiafulvalene tetracyanoquinodimethane as the electron-transfer mediator. *Analytica chimica acta*, 341(1), 43-51.
- Yu, Z., Luan, Y., Li, H., Wang, W., Wang, X., and Zhang, Q. (2019). A disposable electrochemical aptasensor using single-stranded DNA–methylene blue complex as signal-amplification platform for sensitive sensing of bisphenol A. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 284, 73-80.
- Zhou, Y., and Zhi, J. (2006). Development of an amperometric biosensor based on covalent immobilization of tyrosinase on a boron-doped diamond electrode. *Electrochemistry communications*, 8(12), 1811-1816.



GAZİ GELECEKTİR..