



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**BİSFENOL-A TAYİNİ İÇİN ALTERNATİF BİR
YÖNTEM: ALKANTİYOL/ALTIN NANOPARTİKÜL/
3-MERKAPTOPROPİYONİK ASİT MODİFİYE
ENZİM TEMELLİ BİYOSENSÖR SİSTEMİ**

Yüksek Lisans Tezi

Hatice Cansu TEMEL

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

İzmir
2022

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

**BİSFENOL-A TAYİNİ İÇİN ALTERNATİF BİR
YÖNTEM: ALKANTİYOL/ALTIN NANOPARTİKÜL/
3-MERKAPTOPROPİYONİK ASİT MODİFİYE
ENZİM TEMELLİ BİYOSENSÖR SİSTEMİ**

Hatice Cansu TEMEL

Danışman: Prof. Dr. Erol AKYILMAZ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı

İzmir

2022

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “BİSFENOL-A TAYİNİ İÇİN ALTERNATİF BİR YÖNTEM: ALKANTİYOL/ALTIN NANOPARTİKÜL/3-MERKAPTOPROPİYONİK ASİT MODİFİYE ENZİM TEMELLİ BİYONSENSÖR SİSTEMİ” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

07/01/2022

İmzası

Hatice Cansu TEMEL

ÖZET

BİSFENOL-A TAYİNİ İÇİN ALTERNATİF BİR YÖNTEM: ALKANTİYOL/ALTIN NANOPARTİKÜL/ 3-MERKAPTOPROPIYONİK ASİT MODİFİYE ENZİM TEMELLİ BİYOSENSÖR SİSTEMİ

TEMEL, Hatice Cansu

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erol AKYILMAZ

Ocak 2022, 76 sayfa

Çalışmanın amacı, hidrojen peroksit içeren çalışma ortamında önemli bir kanserojen olarak değerlendirilen Bisfenol A'nın katalaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisini dikkate alarak, BPA'nın spesifik tayini amacıyla katalaz enzim temelli yeni bir biyosensör geliştirmektir.

Bu amaç dahilinde hazırlanan karbon pasta elektrot yüzeyine ilk olarak 10 mM'lık sisteamin çözeltisi damlatıldı. Bu sayede elektrot yüzeyinde tiyol grupları oluşturuldu ve ardından damlatılan 5 nm altın nanopartiküllerin tiyol grupları üzerinden immobilizasyonu sağlandı. Modifiye elektrot üzerine 10 mM'lık 3-merkaptopropiyonik asit damlatıldı ve karboksil gruplarını aktive etmek için elektrot 50 mM'lık EDC-NHS (1:1) çözeltisine daldırıldı. Son aşamada 10 mg/ml'lik katalaz enzim çözeltisi damlatılarak biyosensör hazırlandı.

Sis/AuNP/3-MPA/Kat enzim temelli biyosensörün pH, sıcaklık ve tampon sistemi optimizasyonu yapılarak çalışma koşulları; enzim miktarı ve AuNP boyutu optimizasyonu yapılarak da biyoaktif tabaka bileşenleri ile ilgili parametreler belirlenmiştir. Biyosensörün karakterizasyonuna yönelik çalışmalarda ise doğrusal

tain aralığı, tekrarlanabilirlik, substrat spesifikliği, kronoamperometrik ölçümler ve örnek uygulaması amacı ile damacana suda BPA taini ile ilgili sonuçlar elde edilmiştir.

Tasarlanan biyosensör ile diferansiyel puls voltametrisi (DPV) metodu kullanılarak -0,15 V & +0,95 V potansiyel aralıkta ve $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren ortamda ölçümler alınmıştır. H_2O_2 konsantrasyonu (500 μM) sabit tutulurken BPA konsantrasyonu arttırılarak ölçümler yapılmıştır. BPA'nın katalaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi ile artan BPA konsantrasyonu ile orantılı akım değerleri elde edilmiştir ve standart grafiği çizilmiştir.

Deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar incelenerek en iyi çalışma ortamı koşullarının 25 °C'de 50 mM, pH 7,0 potasyum fosfat tamponu olduğu belirlenmiştir. BPA'nın doğrusal tain aralığı 0,25 - 2,5 μM olarak bulunmuştur. Tekrarlanabilirlik çalışmaları ile 0,75 μM BPA için yapılan (n=10) ölçüm ile ortalama değer ($\bar{x}$)= 0,756 μM , standart sapma (S.S.)= $\pm 0,769 \mu M$ ve % varyasyon katsayısı (%V.K.)= % 1,31 olarak bulunmuştur. Biyosensörün cevap süresi 22 saniyedir. Diferansiyel puls voltammetrisi ile yapılan çalışmanın tain limiti 0,16 μM ve amperometri çalışmasının tain limiti 0,45 μM 'dir. Son olarak 6 ay boyunca bekletilmiş damaca suda BPA taini için hazırlanan enzim temelli elektrotla ölçümler yapılmıştır.

Anahtar sözcükler: Biyosensör, Bisfenol A, Katalaz, Altın nanopartikül, 3- Merkaptopropiyonik asit, Sisteamin

ABSTRACT

AN ALTERNATIVE METHOD FOR THE DETERMINATION OF BISPHENOL-A: ALKANTHIOL/GOLD NANOPARTICLE/ 3-MERCAPTOPROPIONIC ACID MODIFIED ENZYME-BASED BIOSENSOR SYSTEM

TEMEL, Hatice Cansu

Master of Science Thesis, Biotechnology Department

Supervisor: Prof. Dr. Erol AKYILMAZ

January 2022, 76 Pages

The aim of the study is to develop a new catalase enzyme-based biosensor for the specific determination of Bisphenol A, which is considered an important carcinogen based on the inhibition effect of Bisphenol A on the catalase enzyme in a working environment containing hydrogen peroxide.

For this purpose, 10 mM cysteamine solution was first dripped onto the prepared carbon paste electrode surface. In this way, thiol groups were formed on the electrode surface and then immobilization of the dripped 5 nm gold nanoparticles over the thiol groups was achieved. 3-mercaptopropionic acid of 10 mM was dripped onto the modified electrode and the electrode was immersed in a 50 mM EDC-NHS (1:1) solution to activate the carboxyl groups. At the final stage, a 10 mg/ml catalase enzyme solution was dripped and a biosensor was prepared.

By optimizing the pH, temperature and buffer system of the Cys/AuNP/3-MPA/Cat enzyme-based biosensor, the operating conditions were determined; the amount of enzymes and the size of AuNP were optimized, and the parameters related to the bioactive layer components were determined. In the studies aimed at

characterizing the biosensor, results were obtained regarding the determination of BPA in the water of the vessel for the purpose of linear range of determination, repeatability, substrate specificity, chronoamperometric measurements and sample application.

Measurements were taken using the differential pulse voltammetry (DPV) method in the potential range of -0,15 V & +0,95 V and in the medium containing $K_4[Fe(CN)_6]$ with the designed biosensor. While the H_2O_2 concentration (500 μM) was kept constant, measurements were made by increasing the BPA concentration. Due to the inhibition effect of BPA on the catalase enzyme, current values proportional to the increased BPA concentration were obtained and the standart graph was plotted.

When the results obtained from experimental studies were examined, it was determined that the best working environment conditions were 50 mM at 25 °C and pH 7,0 potassium phosphate buffer. The linear range of determination of BPA was found to be 0,25 – 2,5 μM . After the repeatability studies, the mean value ($\bar{x}$)= 0,756 μM with the measurement ($n=10$) made for 0.75 μM BPA, the standard deviation (S.S.)= $\pm 0,769 \mu M$ and % coefficient of variation (% V.K.)= 1,31%. The response time of the biosensor is 22 seconds. The limit of detection of the study with differential pulse voltammetry is 0,16 μM and the limit of detection of the amperometry study is 0,45 μM . Finally, measurements were made with an enzyme-based electrode prepared for the determination of BPA in the water of the vessel, which was kept for 6 months.

Keywords: Biosensor, Bisphenol A, Catalase, Gold nanoparticle, 3-Mercaptopropionic acid, Sisteamine

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında birçok alanda sıklıkla kullanılan bir endokrin bozucu olan Bisfenol A tayini için alternatif olarak bir biyosensör geliştirildi. Amacımız bu kimyasalı farklı bir immobilizasyon tekniği ile hazırladığımız elektrot sayesinde damacana sularda tayin yapmaktır. Enzim temelli bu biyosensörde yüksek aktivitesi sayesinde katalaz enzimi tercih edildi.

Çalışma konusunun belirlenmesinde ve hazırlanma sürecinin her aşamasında değerli bilgilerini ve zamanını benden esirgemeyerek her fırsatta çalışmamla yakından ilgilenen, her zaman yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Erol AKYILMAZ'a ve desteğini benden esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İZMİR

07/01/2022

Hatice Cansu TEMEL



İÇİNDEKİLER**Sayfa**

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xix
TABLolar DİZİNİ	xxiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xxv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Biyosensörler	2
2.2. Biyosensörlerin Tarihçesi	4
2.3. Biyosensörlerin Karakteristik Özellikleri	5
2.4. Biyosensörlerin Sınıflandırılması	7
2.4.1. Elektrokimyasal biyosensörler	8
2.5. Voltammetrik Metotlar	11
2.5.1. Döngüsel voltammetri	10

İÇİNDEKİLER (devam)**Sayfa**

2.5.2. Diferansiyel puls voltammetrisi (DPV)	13
2.5.3. Kronoamperometri	14
2.6. Enzim Biyosensörleri	14
2.7. Enzim Biyosensörlerinin Uygulama Alanları	16
2.8. Karbon Pasta Elektrotlar	17
2.9. Bisfenol A (BPA).....	18
2.10. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	21
2.11. Altın Nanopartikül (AuNP)	22
2.12. Katalaz	23
2.12.1. Katalaz ve BPA arasındaki etkileşim.....	25
2.12.2. Katalazın Uygulama Alanları.....	26
3. MATERYAL METOT.....	28
3.1. Materyal	28
3.1.1. Cihaz ve Diğer Ekipmanlar.....	28
3.1.2. Kimyasallar	28

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2. Yöntem	29
3.2.1. Biyosensörün hazırlanması	29
3.2.2. Biyosensörün Çalışma Prensibi	32
3.3. Çalışmada Tasarlanan Enzim Temelli Biyosensörün Karakterizasyonuna Yönelik Çalışmalar	33
3.3.1. Sis/AuNP/3-MPA/Cat Biyosensörünün CV Karakterizasyonu.....	33
3.3.2. KPE/Sis/AuNP/3-MPA/Kat Biyosensörünün Tarama Hızı Karakterizasyonu	34
3.4. KPE/Sis/AuNP/3-MPA/Kat Biyosensörünün Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyonu	34
3.4.1. Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi	34
3.4.2. AuNP boyutunun biyosensör cevabı üzerine etkisi	35
3.5. Enzim Temelli Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonu	35
3.5.1. Tasarlanan enzim temelli biyosensör için optimum pH belirlenmesi	35
3.5.2. Tasarlanan Enzim Temelli Biyosensör İçin Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	35
3.5.3. Tasarlanan enzim biyosensörüne farklı tamponların etkisi	36

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.6. Sis/AuNP/3-MPA/Kat Enzim Temelli Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları	36
3.6.1. Sis/AuNP/3-MPA/Kat biyosensörünün doğrusal tayin aralığı belirlenmesi	36
3.6.2. Sis/AuNP/3-MPA/Kat enzim temelli biyosensörün tekrarlanabilirliğine yönelik denemeler	36
3.6.3. Sis/AuNP/3-MPA/Kat enzim temelli biyosensör için amperometri çalışması	37
3.6.4. Sis/AuNP/3-MPA/Kat enzim temelli biyosensör için substrat spesifikliği çalışması	37
3.6.5. Sis/AuNP/3-MPA/Kat enzim temelli biyosensör ile örnek tayini	37
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	39
4.1. Sis/AuNP/3-MPA/Kat Enzim Temelli Biyosensörünün CV Karakterizasyonuna İlişkin Olarak Yapılan Deneylerde Elde Edilen Sonuçlar	39
4.1.1. Sis/AuNP/3-MPA/Kat biyosensörünün tarama hızı kontrolüne ilişkin yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar	40
4.2. Sis/AuNP/3-MPA/Kat Enzim Temelli Biyosensörün Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyon Çalışmalarında Elde Edilen Sonuçlar	42

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.2.1. Katalaz enzimi miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin sonuçları...	42
4.2.2. AuNP boyutunun biyosensör cevabı üzerine etkisinin sonuçları	44
4.3. Sis/AuNP/3-MPA/Kat Enzim Temelli Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyon Çalışmalarından Elde Edilen Sonuçlar	46
4.3.1. Enzim temelli biyosensörün optimum ph değerine ilişkin deney sonuçları	46
4.3.2. Enzim temelli biyosensörün optimum sıcaklığına ilişkin deney sonuçları .	47
4.3.3. Farklı Tamponlardaki Ölçüm Sonuçları	49
4.4. Sis/AuNP/3-MPA/Kat Enzim Temelli Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmalarına Yönelik Sonuçlar	51
4.4.1. Sis/AuNP/3-MPA/Kat biyosensörünün doğrusal tayin aralığı sonuçları	51
4.4.2. Sis/AuNP/3-MPA/Kat biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen sonuçlar	52
4.4.3. Sis/AuNP/3-MPA/Kat enzim temelli biyosensörünün amperometri sonuçları	54
4.4.4. Sis/AuNP/3-MPA/Kat enzim temelli biyosensörünün substrat spesifikliği sonuçları.....	56
4.4.5. Sis/AuNP/3-MPA/Kat biyosensörü ile örnek tayinine yönelik yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar	58

İÇİNDEKİLER (devam)**Sayfa**

5. BPA TAYİNİNE YÖNELİK GELİŞTİRİLEN Sis/AuNP/3-MPA/Kat MODİFİYE ENZİM TEMELLİ BİYOSENSÖRÜN BAZI BİYOSENSÖRLERLE KIYASLANMASI	61
6. GENEL DEĞERLENDİRME.....	62
KAYNAKLAR DİZİNİ	64
TEŞEKKÜR.....	74
ÖZGEÇMİŞ	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2. 1: Biyosensörün temel bileşenleri	2
2. 2: Yıllara göre biyosensörlerle ilgili yayın sayıları	3
2. 3: Biyosensörlerle ilgili yapılan çalışmaların 5 yıllık değişimi.....	8
2. 4: Oksidasyon-redüksiyonun voltamogramı.....	12
2. 5: Bisfenol A'nın Kimyasal Yapısı	18
2. 6: Katalaz çeşitlerin yapısal gösterimi.....	24
2. 7: Kat-BPA sisteminin molekül yerleştirme sonuçları.....	25
2. 8: Katalaz enziminin kullanım alanları.....	27
3. 1: Enzim temelli biyosensörün immobilizasyon şeması	31
3. 2:Tasarlanan enzim temelli biyosensörün çalışma prensibi.	32
4. 1: Tasarlanan enzim biyosensörünün yüzey modifikasyonuna ilişkin CV voltammogramları.....	40
4. 2: Tarama hızının biyosensör cevabı üzerine etkisi.	41

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4. 3: Enzim biyosensörünün farklı enzim miktarı ile çalışmalarından elde edilen DPV sonuçları.....	42
4. 4: Enzim miktarı optimizasyon grafiği.	43
4. 5: Farklı boyutlardaki AuNP ile hazırlanan biyosensörler ile elde edilen DPV sonuçları	44
4. 6: AuNP boyutu optimizasyon grafiği.	45
4. 7: Enzim biyosensörü optimum pH çalışması için DPV sonuçları.....	46
4. 8: Enzim biyosensörü için optimum pH grafiği.....	47
4. 9: Enzim biyosensörünün optimum sıcaklık DPV sonuçları.	48
4. 10: Enzim biyosensörünün optimum sıcaklık grafiği..	49
4. 11: Enzim biyosensörünün farklı tamponlardaki çalışmalarından elde edilen DPV sonuçları ve buna bağlı çizilen standart grafikler.	50
4. 12: Enzim temelli biyosensörün doğrusal tayin aralığının belirlenmesi.....	51
4. 13: Katalaz enzimi biyosensörünün BPA için doğrusal tayin aralığı..	52

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sekil

Sayfa

4. 14: Enzim biyosensörünün tekrarlanabilirliğinin incelenmesi amacıyla yapılan DPV sonuçları.....	53
4. 15: Enzim biyosensörünün amperometrik ölçüm sonuçları.	55
4. 16: Enzim biyosensörünün amperometrik ölçüm sonuçları akım farkı-BPA konsantrasyonu standart grafiği.	55
4. 17: Enzim biyosensörüne ait substrat spesifikliğı DPV sonuçları.....	56
4. 18: Katalaz biyosensörüne ait substrat spesifikliğı grafiği.....	57
4. 19: Enzim biyosensörünün damacana suyu ve BPA tayini için tekrarlanabilirliğinin incelenmesi amacıyla yapılan DPV sonuçları	59
4. 20: Enzim biyosensörünün sadece damacana suyu için tekrarlanabilirliğinin incelenmesi amacıyla yapılan DPV sonuçları.	60



TABLÖLAR DİZİNİ**Tablo****Sayfa**

4. 1: Tasarlanan biyosensörde BPA ve H ₂ O ₂ için gözlenen tekrarlanabilirlik değerleri.	53
4. 2: Tasarlanan biyosensörde damacana suyu, BPA ve H ₂ O ₂ için gözlenen tekrarlanabilirlik değerleri.	59
4. 3: Tasarlanan biyosensörde damacana suyu ve H ₂ O ₂ için gözlenen tekrarlanabilirlik değerleri.	60
5. 1: BPA tayini için geliştirilmiş enzim temelli elektrokimyasal biyosensörlerle ilgili çalışmalar	61



SİMGELER VE KISALTMALARKısaltmalar

Kat Katalaz

BPA Bisfenol A

H₂O₂ Hidrojen Peroksit

Sis Sisteamin

AuNP Altın Nanopartikül

3-MPA 3-Merkaptopropiyonik asit

KPE Karbon Pasta Elektrot

DPV Diferansiyel puls voltammetri

CV Döngüsel voltammetri

KA Kronoamperometri

EDC 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid

NHS N-hidroksisülfosüksinimid

1. GİRİŞ

İnsan vücudundaki en ufak fizyolojik değişikliği bile yüksek hassasiyetle tespit edebilme ve insan doğasını, çevresini etkileyen süreçleri doğru bir şekilde izleyebilme yeteneği, yaşam kalitesini büyük ölçüde iyileştirmiştir. Biyosensörler, biyomedikal teşhis, tedavi ve hastalık ilerlemesinin izlenmesi, ilaç, gıda kontrolü ve çevresel analizler dahil olmak üzere sayısız alanda kritik bir rol oynar. Bir transdüksiyon elemanına bağlı biyolojik tanıma elemanının kullanımı yoluyla analitik veriler sağlayan entegre cihazlardır. Bu analitik cihazların amacı, bir analit hakkında gerçek zamanlı olarak doğru ve güvenilir bilgileri hızlı bir şekilde sağlamaktır (Thevenot et al., 2001).

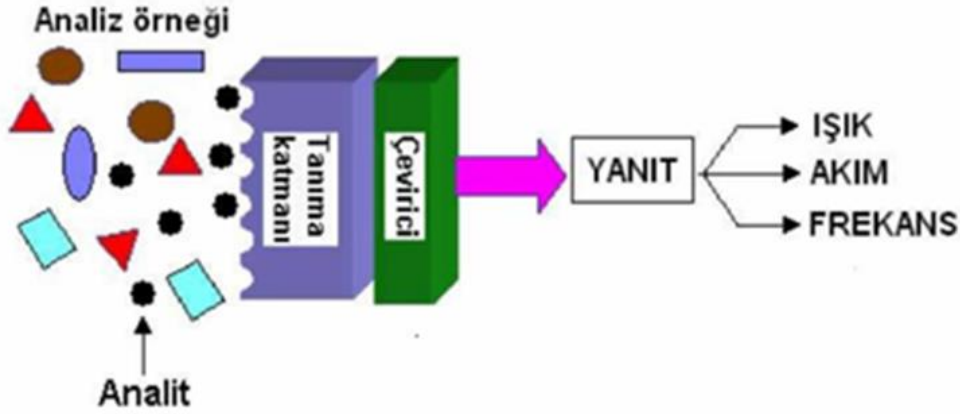
Bisfenol A şeffaf, güçlü ve hafif özelliklerinden dolayı plastik üretiminde en yaygın kullanılan endüstriyel bileşiklerden biridir. Toksikoloji çalışmalarına göre BPA'nın, düşük bir düzeyin bile büyüme ve üreme gelişimini etkileyerek hormonal aktiviteyi taklit edebilen bir endokrin bozucu bileşik (EDC) olduğu görülmektedir. Sonuç olarak, BPA'nın yaygın kullanımı sebebiyle insan vücuduyla teması artmış dolayısıyla çeşitli yollarla metabolizmaya girişi de artmıştır (Hsine and Mlika, 2021).

Karbon pasta elektrot yüzeyine immobilize edilen kimyasallarla hazırlanan biyosensör ile Bisfenol A elektrokimyasal yöntemlerle tayin edilebilmiştir. Çalışmada ortamda bulunan H_2O_2 'nin katalaz enzimi tarafından parçalanması sırasında ortama eklenen BPA'nın inhibisyon etkisiyle akım farklanmalarını değiştirdiği görülmüştür. Literatürde benzer çalışmalar bulunmaktadır (Zhang et al., 2019; Suthar et al., 2013).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyosensörler

Bir biyosensör genellikle biyolojik bir yanıtı bir sinyale dönüştüren analitik cihaz olarak tanımlanır (Grieshaber et al., 2008). Sinyal iletimi ilkesiyle çalışır, biyolojik yanıtı elektrik yanıtına kısacası ölçülebilir bir sonuca dönüştürmek için tasarlanmıştır. Daha basit bir ifadeyle, bir molekülün biyolojik etkisini ölçülebilir bir sinyalle ilişkilendirerek nicel analizinden sorumludur. Şekil 2.1’de temel bileşenleri basit olarak gösterilmektedir. Analit, biyolojik reseptöre yüksek seçicilikle bağlanır veya etkileşime girerek fizyolojik bir değişime neden olur. Dönüştürücü tarafından üretilen sinyal, biyolojik reseptörün tipine bağlı olarak bir akım veya voltaj olabilir. Örneğin, dönüştürücüden gelen sinyal bir akım şeklinde ise eşdeğer bir gerilime dönüştürülecektir. Son olarak, sinyal işleme ünitesinden alınan sonuç, ölçülen biyolojik miktarla ilişkilendirilir (Tetyana, 2021).

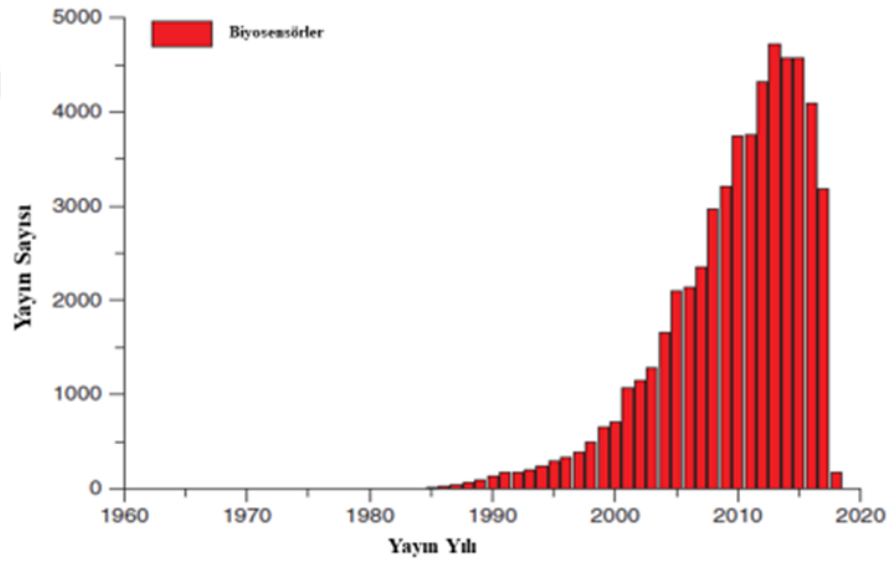


Şekil 2.1: Biyosensörün temel bileşenleri (Arıksoysal, 2006)

Biyosensörlerin tasarımı genel olarak dört ana bileşenden oluşur: biyoreseptör, dönüştürücü, elektronik bileşenler, görüntüleme birimi. Bir reseptör,

işlem sırasında hedef analitle doğrudan temas halinde olan ve ana işlevi analitleri yüksek seçicilikle yakalayan harici bir bileşendir. Sıklıkla kullanılan biyoreseptörler; aptamerler, DNA, antikorlar ve enzimlerdir (Bhattarai and Hameed, 2020). Amaç, bir analitin konsantrasyonuyla orantılı elektronik sinyal üretmektir. Bu sinyal, proton konsantrasyonundaki değişiklikten, oksijen ve amonyak gibi gazların değişiminden, ışık emisyonu veya absorpsiyonundan, ısı emisyonundan veya algılama moleküllerinin hareketiyle ortaya çıkan diğer mekanizmalardan kaynaklanabilir. Bu sinyal daha sonra dönüştürücü tarafından ölçülebilir bir yanıtla çevrilir (Tothill and Turner, 2003).

Geliştirilmesi kolay, hızlı, düşük maliyetli, son derece hassas ve oldukça seçici olmaları gibi avantajları sayesinde biyosensörle ilgili araştırmaların sayısı, son yirmi yılda oldukça artmıştır (Grieshaber et al., 2008).



Şekil 2.2: Yıllara göre biyosensörlerle ilgili yayın sayıları (Bhattarai and Hameed, 2020)

2.2. Biyosensörlerin Tarihçesi

1906 yılında M. Cremer'in bir sıvıdaki asit konsantrasyonunun, sıvının bir cam zarın karşıt taraflarında bulunan kısımları arasında ortaya çıkan elektrik potansiyeli ile orantılı olduğunu göstermesiyle biyosensör çalışmalarının temeli atılmıştır. pH, hidrojen iyonu konsantrasyonu kavramının 1909 yılında Sorensen tarafından tanıtılmasının ardından 1922 yılında Hughes tarafından pH ölçümleri için bir elektrot gerçekleştirildi. Griffin ve Nelson ilk olarak invertaz enziminin alüminyum hidroksit ve odun kömürü üzerinde immobilize edilebildiğini göstermişlerdir. Bu çalışmaların tümü tam olarak gerçek bir biyosensör tasarımının temelini oluşturmuşlardır (Bhalla et al., 2016).

1956 yılında Leland C. Clark oksijen tespiti için biyosensör geliştirmiştir. Immobilize glikoz oksidaz ile ilk enzim elektrodunu geliştirerek glikozun saptanmasını sağlamıştır (Pohanka and Skladal, 2008).

Biyosensör çalışmalarında bazı parametreler çok önemlidir. Hedef analit araştırılmalı, uygun koşullar ayarlanmalıdır. Analit için yüksek afiniteye sahip reseptör seçilmelidir. Biyolojik reseptörün avantaj ve dezavantajları çalışmayı etkiler. Ayrıca reseptörün dönüştürücü yüzeyine immobilize edilme yöntemi doğru seçilmelidir. Adsorpsiyon, kovalent bağlanma, mikro kapsülleme ve çapraz bağlama immobilizasyon yöntemlerine örnektir. Dönüştürücü, biyosensör cihazının hassasiyetini büyük ölçüde etkiler. Doğru dönüştürücünün kullanılması, duyarlılığın artmasıyla sonuçlanırken, etkisiz bir dönüştürücünün kullanılmasıyla duyarlılığı negatif şekilde etkiler (Grieshaber et al., 2008).

Yüksek özgüllük, hızlı ve sürekli ölçüm alabilme gibi avantajları sayesinde birçok alanda biyosensörler tercih edilmektedir. Hızlı tepki süresi ve kalibrasyon için gereken reaktiflerin çok daha az kullanımı ile daha az reaktifle ve daha düşük maliyetle hastalıkların teşhisi için sıklıkla kullanılırlar. Özellikle bulaşıcı

hastalıklar için biyosensörler, patojenleri hızla tanımlayabilen ve etkili tedaviyi öngörebilen, kullanımı kolay, hassas ve ucuz bir teknoloji platformu imkanı sunar. Mikro ve nanoteknolojilerdeki son gelişmeler incelendiğinde, birçok bulaşıcı hastalık için gerekli olan karmaşık moleküler deneyleri gerçekleştirebilen ve diğer geleneksel cihazlar tarafından tayin edilemeyen molekülleri ölçme avantajına sahip biyosensörlerin geliştirildiği görülmektedir (Srivastava, 2020).

2.3. Biyosensörlerin Karakteristik Özellikleri

Bir biyosensör tasarlanırken birçok özellik veya parametrenin karşılanması gerekir. Bu özellikler, biyosensörün performansını belirler. Düşük maliyetle çok sayıda üretilebilmeleri, olabildiğince küçük ve kullanıma uygun boyutta olmak, hızlı sonuç vermek, sağlam ve taşınabilir olmak, kullanımı kolay olmak gibi özelliklerinin yanı sıra aşağıdaki parametrelere de uygun olmalıdır (Thevenot et al., 2001).

Tekrarlanabilirlik

Biyoalgılamadaki en önemli özelliklerden biri tekrarlanabilirliktir. Cihazın eşleşen çıkış sinyalleri üretebilmesi ve yinelenen deneysel çalışmalarda doğru sonuç vermesini gösterir (Chen et al., 2020). Dönüştürücünün kesinliği ve doğruluğu ile karakterize edilir. Bir analitin her ölçümünde biyosensörün benzer sonuçlar verebilmesi hassasiyetini, analit ile birden fazla ölçüm yapıldığında sensörün gerçek değere yakın bir ortalama değer sağlama kapasitesi ise doğruluğunu gösterir. Yeniden üretilebilir sinyaller, bir biyosensörün verdiği sonucun yüksek güvenilirlik ve sağlamlık içerdiğini gösterir (Bhalla et al., 2016).

Seçicilik

Bir biyosensörün diğer moleküller veya maddelerin varlığında sadece istenilen analitle seçici olarak bağlanma ve yanıt vermesidir (Tetyana, 2021). Seçiciliğe örnek olarak bir antijenin antikor ile etkileşimi gösterilebilir. Antikorlar biyoreseptör görevi görür ve dönüştürücünün yüzeyine immobilize edilir (Cho et al., 2020). Hedef analitten farklı bir analit ile etkileşimlerden bir sinyal üretildiğinde buna yanlış pozitif sonuç denir. Bu durum seçiciliği zayıf olan biyosensörlerde yaygındır. Tıbbi uygulamalarda oldukça önemli olan bu özellik, biyosensör tasarımı için maksimum düzeyde olmalıdır (Tetyana, 2021).

Duyarlılık

Bir biyosensörün duyarlılığı, analit konsantrasyonundaki değişiklik ile dönüştürücüden üretilen sinyalin yoğunluğu arasındaki ilişki olarak tanımlanır. İdeal olarak, bir biyosensör, hedef analitin konsantrasyonundaki küçük değişikliklere yanıt olarak bir sinyal üretmelidir. Bazı çalışmalarda ng/ml veya µg/ml konsantrasyon aralıklarındaki analitleri tespit etmek için biyosensörler gereklidir. Bu genellikle tıbbi uygulamalar ve çevresel izleme amaçları için önemlidir. Örneğin, kanda 4 ng/ml'lik prostata özgü antijen konsantrasyonu, prostat kanseri ile ilişkilidir. Bu nedenle, duyarlılık bir biyosensörün en önemli özelliklerinden biridir (Tetyana, 2021). Ayrıca bir biyosensör tarafından analitin en düşük tespit limitini (LOD) ifade eder. Tespit limiti, hedefin ölçülebilir bir sinyal ortaya çıkarabilen en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanır. Bir biyosensör en düşük tespit limitine sahip olmalıdır. (Bhattarai and Hameed, 2020).

Kararlılık

Kararlılık biyosensörün sistemdeki ve çevredeki bozukluklara karşı ne kadar duyarlı olduğunu gösteren bir parametredir. Bu bozukluklar, ölçüm altındaki biyosensörün sonuçlarında değişikliklere neden olarak, ölçüm konsantrasyonunda hatalara, biyosensörün kesinliği ve doğruluğu ile ilgili sorunlara neden olabilir (Thevenot et al., 2001). Biyosensörün uzun inkübasyon adımları veya sürekli izleme gerektirebileceği uygulamalarda çok önemli bir özelliktir. Biyoreseptörün afinitesi yani analitin biyoreseptöre bağlanma derecesi, sıcaklık gibi çeşitli faktörler bir biyosensörün stabilitesini etkileyebilir (Bhalla et al., 2016).

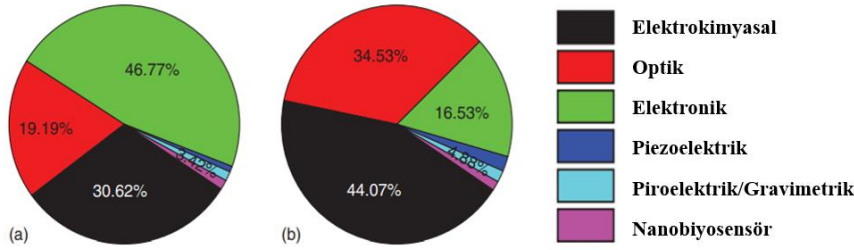
Doğrusallık

Doğrusallık, alınan sinyaller ve konsantrasyon arasında çizilen standart grafiğin bir sonucu olarak elde edilen lineer çizgi ve $y=mc$ denklemi sayesinde anlaşılır. Bu denklemde c analitin konsantrasyonudur, y çıkış sinyalidir ve m biyosensörün duyarlılığını ifade eder. Biyosensörün doğrusallığı, biyosensörün çözünürlüğü ve test edilen analit konsantrasyonları aralığı ile ilgilidir. Biyosensörün çözünürlüğü, biyosensörün yanıtında bir değişiklik meydana getirmek için gerekli olan bir analitin konsantrasyonundaki en küçük değişiklik olarak tanımlanır. Uygulamaya bağlı olarak, çoğu biyosensör uygulaması yalnızca analit tespiti değil, aynı zamanda geniş bir çalışma aralığında analit konsantrasyonlarının ölçülmesini gerektirdiğinden iyi bir çözünürlük gereklidir (Bhalla et al., 2016).

2.4. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler, dönüştürücü tipine göre ve biyoreseptör türüne göre sınıflandırılır. Biyoreseptör türüne göre enzim, antikor, nükleik asit, mikro-

organizma, hücre, yapay biyolojik reseptör ve dönüştürücü tipine göre optik, kalorimetrik, piezoelektrik, elektrokimyasal olarak sınıflandırılır (Tüylek, 2012).



Şekil 2.3: Biyosensörlerle ilgili yapılan çalışmaların 5 yıllık değişimi. a) 2017-2013, b) 2012-2008 (Bhattarai and Hameed, 2020)

2.4.1. Elektrokimyasal biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler, elektrokimyasal dönüştürücüyle yüzeyin iletkenliği, direnci veya kapasitansındaki değişikliklerin ölçülmesi için kullanılır. Kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot içeren biyosensörler olarak tanımlanır (Thevenot et al., 2001). Bu cihazlarda elektrotlardan birine tanıma molekülü immobilize edilir. Analit, biyolojik tanıma elemanına bağlandıktan sonra biyolojik etkileşim aktivitesi sonucu meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları nedeniyle elektriksel özelliklerde bir değişikliği tetikler ve sensör sinyalini oluşturur. Elektrokimyasal biyosensörler, daha sonra tespit edilen akım/potansiyel farkı üretmek için çoğunlukla enzim katalizli reaksiyonlara dayanır (Srivastava, 2020).

Biyolojik tanıma bileşeni olarak bir enzim kullanılabilir; bu durumda analit, enzim substratıdır; ayrıca onun inhibitörü olarak işlev görebilir. Enzimler; antikorlara, antijenlere ve oligonükleotitlere spesifik bir sekans ile bağlanan etiketler olarak kullanılabilir, böylece afiniteye dayalı sensörler tasarlanmış olur.

Metabolitlerin izlenmesi için özellikle oksidoredüktazlar grubundaki enzimler seçilir. Glikoz tahlilleri için glikoz oksidaz ve glikoz dehidrojenaz, etanol için alkol oksidaz, üre için üreaz ve kolesterol tahlili için kolesterol esteraz ve kolesterol oksidaz enzimleri kullanılır. Peroksidaz ve alkalın fosfataz, elektrokimyasal afinite biyosensörleri için en yaygın enzimlerdir. Yüksek hassasiyet, düşük maliyet, küçük örnek hacmi, düşük gözlenebilme sınırı elektrokimyasal biyosensörlerle ilişkili avantajlardan bazılarıdır (Pohanka and Skladal, 2008). Elektrokimyasal biyosensörler hastalıkların teşhisinde, endüstriyel, tarımsal ve çevresel analizlerde sıklıkla kullanılır (Bhattarai and Hameed, 2020). Kondüktometrik, amperometrik, potansiyometrik ve voltammetrik olarak sınıflandırılabilir (Srivastava, 2020).

Kondüktometri

Kondüktometrik cihazlar, bir analitin elektrotlar arasında elektrik akımı iletme yeteneğini ölçer. Elektrokimyasal reaksiyonlarda iyonlar veya elektronlar açığa çıktığında, çözeltinin genel iletkenliği veya direnci değişir. Reaksiyon sırasında çözelti/ortam bileşimindeki elektriksel iletkenlik değişimi bu cihazlarla ölçülebilir. İmpedimetrik cihazların alt kümesi olarak bilinir (Thevenot et al., 2001). Enzimatik reaksiyonların sonucunda iki elektrot arasındaki bir çözeltinin iyonik kuvveti ve dolayısıyla iletkenliği değişir. Bu nedenle, bir çözeltideki yüklü moleküllerin konsantrasyonunda değişiklikler üreten enzimatik reaksiyonları incelemek için kondüktometrik cihazlar kullanılabilir. Enzimler, antikorlar gibi biyoalgılayıcıların elektrot yüzeyine immobilize edilmesiyle iletkenlik değişimi doğrudan izlenir. Ancak klinik uygulamalarda analitin değişken iyonik yapısı ve yüksek iyonik kuvvete sahip ortamlarda spesifik ölçümlerin yapılması gerekliliği, enzimatik kondüktometrik cihazların tercih edilmemesine sebep olur (Tetyana, 2021).

Potansiyometri

Potansiyometrik biyosensörler, pH ve iyon konsantrasyonlarındaki değişiklikleri ölçer (Tetyana, 2021). Çalışma prensibi, çözeltideki bir elektroda voltaj uygulandığında, elektrokimyasal reaksiyonlar nedeniyle bir akım akışı meydana gelmesine dayanır. Çalışma elektrodu ve referans elektrot arasındaki potansiyel fark ölçülür. Ölçülen fark sayesinde, belirli bir elektrokimyasal reaksiyon ve analitin konsantrasyonu belirlenir (Tetyana, 2021). Potansiyometri, bir elektrokimyasal reaksiyondaki iyon aktivitesi hakkında bilgi sağlar (Grieshaber et al., 2008). En yaygın potansiyometrik cihazlar pH elektrotlarıdır. F^- , I^- , CN^- , Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , NH_4^+ iyonları veya CO_2 , NH_3 gazları ile çalışılırken sıklıkla tercih edilir. Analiz edilecek substratın biyosensör yüzeyine taşınmasına, analit difüzyonuna ve reaksiyon ürününün çözeltiye doğru difüzyonuna dikkat edilmelidir. Potansiyometrik biyosensörlerin tepkisi, amperometrik biyosensörlerde olduğu gibi, kararlı hal veya geçicidir. Ancak asla bir denge tepkimesi değildir (Thevenot et al., 2001). Birkaç iyonun in vivo testi için büyük ölçüde yararlı olan daha küçük boyutlu cihazların kolayca üretilmesi gibi bir avantajı vardır (Bhattarai and Hameed, 2020).

Amperometri

Biyokimyasal reaksiyonlarda elektroaktif türün indirgenmesinden veya yükseltgenmesinden kaynaklanan akımı sürekli olarak ölçen cihazlardır. Akım, sabit bir potansiyelde ölçülür. Biyosensörlerde yaygın olarak kullanılan algılama yöntemlerindendir. Bu yüksek hassasiyetli biyosensörler, biyolojik örneklerde bulunan elektroaktif türleri tespit edebilir (Grieshaber et al., 2008). Amperometrik temelli biyosensörler, antijen/antikor eşleşmesi meydana geldiğinde redoks reaksiyonları sırasında mevcut potansiyellerdeki farkı tespit eder. En yaygın amperometrik biyosensörler Clark oksijen elektrodunu kullanır. Clark elektrotları oksijen konsantrasyonuyla orantılı bir akımın üretildiği amperometrik biyosensörlerin temelini oluşturur (Srivastava, 2020). Amperometrik biyosensörler,

potansiyometrik biyosensörlere göre oldukça hassastır ve endüstriyel üretime daha uygundur (Pohanka and Skladal, 2008).

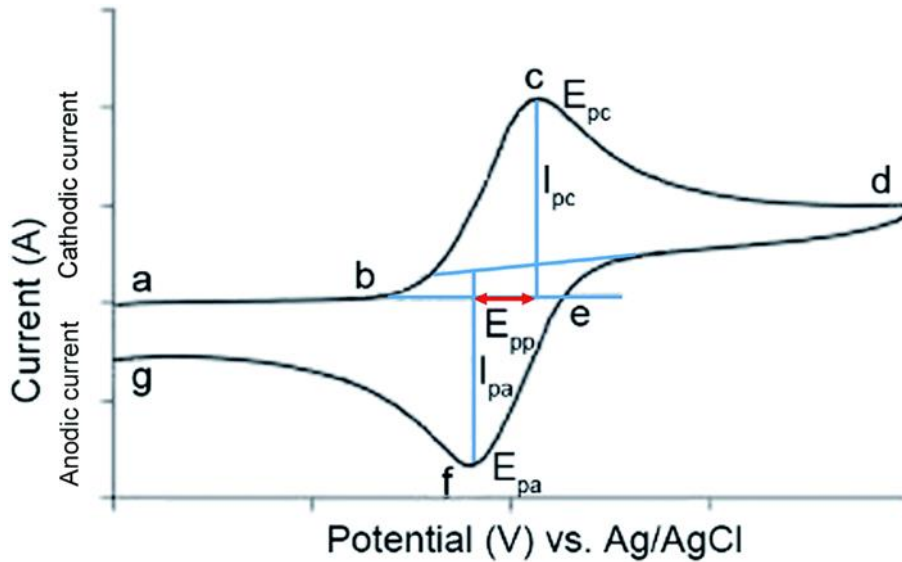
2.5. Voltammetrik Metotlar

Voltammetri, elektroda uygulanan potansiyelin ardından ortaya çıkan akımın ölçülmesi prensibiyle çalışan bir yöntemdir. Sabit potansiyelde yapılan çalışmalar amperometrik çalışmalardır. Buna karşılık, voltammetri, potansiyelin kontrollü değişimi sırasında veya belirli bir potansiyel aralığının üzerindeki akımı ölçen tekniktir. Yani hem akımı hem de potansiyeli ölçerler (Srivastava, 2020). Biyokimyasal reaksiyon sırasında oksidasyon/redüksiyon işleminden kaynaklanan akımın sürekli ölçümünden sorumludur (Bhattarai and Hameed, 2020). Elektrokimyasal oksidasyon veya redüksiyonun bir sonucu olarak çalışma elektrotunda üretilen akım, ölçülen analit konsantrasyonuyla orantılıdır. Örneğin glikoz biyosensörleri, gebelik testi, adenosin trifosfat sensörleri voltammetrik biyosensörler grubuna dahildir (Srivastava, 2020). Döngüsel voltammetri, diferansiyel puls voltammetrisi ve kare dalga voltammetrisi voltammetrik yöntem çeşitleridir. (Tokuçcu, 2020).

2.5.1. Döngüsel voltammetri

Döngüsel voltammetri, yaygın olarak kullanılan elektrokimyasal yöntemlerden biridir. Analit çözeltileri hakkında bilgi edinmek için, örneğin hız sabitini, redoks potansiyeli ve elektrokimyasal reaksiyon hızlarını tespit etmek için tercih edilir. Döngüsel voltammetri ölçümleri, bir çalışma elektrotu, karşı elektrot ve bir referans elektrottan oluşan bir hücre konfigürasyonu ile gerçekleştirilir. Çalışma elektrodu aracılığıyla analite uygulanan geniş bir voltaj potansiyeliyle elde edilen akım ölçülür. Düşük molekül ağırlıklı antioksidanların saptanmasında oldukça hassas bir yöntemdir. İlaç kalitesinin ölçülmesi, yiyecek ve şaraplarda fenolik ve antioksaiderin tayini, hormonlar gibi biyomoleküllerin tespitinde sıklıkla kullanılır (Wang et al,2021).

Döngüsel voltammetride, reaksiyon tarafından üretilen voltajı ölçmek yerine, elektrotlara bir voltaj uygulanır. Voltaj zamanla değiştirilir ve bir devre üzerinden akım izlenir. Voltaj, bir oksidasyon/redüksiyon indüklendiği bir noktaya ulaştığında, akım geçmeye başlar. Bir döngüsel voltamogram, uygulanan gerilime karşı akımın grafiğidir (Marken et al., 2010). Şekil 2.4'te döngüsel voltammetri grafiği gösterilmiştir. Redoks proseslerinin termodinamiği, analitin enerji seviyeleri ve elektronik transfer reaksiyonlarının kinetiği hakkındaki bilgileri hızlı bir şekilde belirlemek için kullanışlı bir yöntemdir (Kandahar et al., 2021). Deneye başlamak için çalışma elektroduna pozitif bir potansiyel uygulanır. Uygulanan potansiyel referans elektrodun potansiyelinden daha fazladır. Bu adımda, ilgilenilen türlerin baştan tamamen oksitlenmesi sağlanır. Potansiyel daha sonra sabit bir oranda negatif yönde süpürülür. Çalışma elektrotu potansiyeli, referans elektrotla karşılaştırıldığında negatif olana kadar alçalır. Bir noktada, voltaj taraması tersine çevrilir ve başlangıç ayarına dönene kadar giderek daha pozitif hale gelir (Wang et al., 2021). Voltammetri tepe noktaları, biyolojik numunede bulunan spesifik redoks moleküllerinden kaynaklanır ve her bir tepe noktasındaki akımın genliği, moleküllerin konsantrasyonu ile ilişkilidir (Chevion et al., 2000).



Şekil 2.4: Oksidasyon-redüksiyonun voltamogramı (Wang and Tian, 2016)

İndirgeme işlemi (A) başlangıç potansiyelinden (D) geçiş potansiyeline kadar gerçekleşir. Bu bölgede potansiyel negatif taranarak bir azalmaya neden olur. Ortaya çıkan akıma katodik akım (I_{pc}) denir. Karşılık gelen tepe potansiyeli C noktasında oluşur ve katodik tepe potansiyeli (E_{pc}) olarak adlandırılır. Elektrot yüzeyindeki tüm substrat azaltıldığında E_{pc} 'ye ulaşılır. Geçiş potansiyeline (D) ulaşıldıktan sonra, potansiyel D'den G'ye pozitif olarak taranır. Bunun sonucunda anodik akım (I_{pa}) oluşur ve oksidasyon meydana gelir. F'deki tepe potansiyeline anodik tepe potansiyeli (E_{pa}) denir ve elektrot yüzeyindeki tüm substrat D'den G'ye oksitlendiğinde bu potansiyeye ulaşılır. Bu sayede anodik akım (I_{pa}) ve oksidasyon oluşur. F'deki tepe potansiyeli, anodik tepe potansiyeli (E_{pa}) olarak adlandırılır ve elektrot yüzeyindeki tüm substrat oksitlendiğinde ulaşılır (Mabbott, 1983).

2.5.2. Diferansiyel puls voltammetrisi (DPV)

Diferansiyel puls voltammetrisi, özellikle, artan voltaj ile elektrota bir dizi pulsun uygulandığı bir voltammetri tekniğidir. Tekniğinin temeli, potansiyel bir puls uygulandığında şarj ve Faradaik akımın azalma hızındaki farklılıkları ölçmektir. Akım puls öncesi ve sonrası iki kere ölçülür. Her puls küçük bir genlikte sabitlenir ve akım tepe şeklinde bir voltamogram oluşturur. Çalışma elektrodu tarafından genellikle ve kademeli olarak 10 mV-100 mV'luk bir artışla ve 10 ms–100 ms arasında gönderilir. Analiz sırasında arka plan akımının etkisini en aza indirilebildiği için tercih edilir. Kısa pulslar, tekniği oldukça hassas hale getirir. Bir diferansiyel puls voltammetri mekanizmasının kurulumu, en az iki elektrot içerir: bir çalışma elektrotu ve bir karşı elektrot. Gerilim pulsları karşı elektrot tarafından iletilirken, çalışma elektrotu ortaya çıkan akımı ölçer. Üçüncü elektrot olarak referans elektrot, genellikle karşı elektrotun voltajını kontrol etmek için kullanılır (Molina et al., 2011).

2.5.3. Kronoamperometri

Kronoamperometri, çalışma elektroduna sabit bir potansiyel uygulandığında, çalışma elektrodundan geçen akımı zamana karşı ölçer. Akım akışı, çalışma elektrotunun yüzeyindeki oksitlenmiş veya indirgenmiş türlerin konsantrasyonu ile ilişkilidir. kimyasal reaksiyonların, difüzyon proseslerinin ve adsorpsiyonun kinetiğini incelemek için kullanılır. Zamanın bir fonksiyonu olarak ölçülen elektrot akımı, bir analitin çözeltiden sensör yüzeyine doğru difüzyonuna göre değişir. Bu nedenle kronoamperometri, bir elektrotta meydana gelen difüzyon kontrollü süreçte akım-zaman değişimini ölçmek için kullanılabilir. Bu değişim analit konsantrasyonuna bağlıdır. Kronoamperometri, hassas bir tekniktir ve birçok çalışmada bağımsız olarak veya döngüsel voltammetri gibi diğer elektrokimyasal tekniklerle birlikte uygulanmıştır (Guy and Walker, 2016).

2.6. Enzim Biyosensörleri

Enzimatik biyosensörler, analit konsantrasyonu ile orantılı sinyal üretmek için dönüştürücüye immobilize edilmiş enzimin biyoreseptör olarak kullanıldığı analitik bir cihaz olarak tanımlanabilir (Karunakaran et al., 2015). Kullanılan enzimlerin tüketilmemeleri sayesinde uzun süreli kullanımları ve tekrar kullanılabilirlikleri ile bilinirler. Böylece, enzim temelli biyosensörlerin tespit limiti ve ömrü, enzimin stabilitesi ile büyük ölçüde artırılır (Tetyana, 2021).

Enzim temelli biyosensörler hücre temelli biyosensörlerden daha spesifiktir. Kısa difüzyon yolları sayesinde çok daha hızlı tepki verirler. Ancak enzimin izole edilmesinin zorluğu nedeniyle üretimleri daha pahalıdır. Enzimlerin elektrokimyasal sensörlerle birleştirilmesi, metabolitlerin, terapötik ilaçların, antijenlerin ve antikorların basit bir şekilde belirlenmesine izin verir (Karunakaran et al., 2015).

Enzimatik biyosensör, enzimatik reaksiyonun substratı veya ürünü elektrokimyasal olarak aktif olduğunda, uygun bir potansiyel uygulayarak elektrot üzerinde hızla ve geri dönüşümlü olarak oksitlenebildiği veya indirgenebildiği zaman kullanılır. Substrat ve inhibitör biyosensörleri olarak fonksiyonlarına göre ikiye ayrılırlar. Substrat biyosensörleri, enzimatik reaksiyonların spesifik substratlarının belirlenmesi için tasarlanmıştır. Glikoz oksidaz bazlı enzimatik sensör kullanılarak glikoz tayini ve üreaz sensörü kullanılarak üre tayini yapılması substrat biyosensörlerine örnektir. İnhibitör sensörleri, bir enzimin aktivitesini azaltan maddelerin belirlenmesi için tasarlanmıştır (Korotkaya, 2014). Katalaz tarafından katalize edilen hidrojen peroksidin hidrolizini inhibe eden bisfenol A miktarının belirlenmesi için yapılan çalışmada inhibitör biyosensörü kullanılır.

Enzimatik biyosensörlerin ömrü, zaman içinde değişen enzim aktivitesiyle ilgilidir. İmmobilizasyon, enzimin uzun bir süre boyunca yeniden kullanılmasına izin verir ve katalizörün üründen daha kolay ayrılmasını sağlar. İmmobilize edilmiş enzimler için aktivite kaybı, esas olarak, sensörün ömrünü azaltan proteinin denatürasyonu ve deaktivasyonundan kaynaklanır (Rocchitta et al., 2016). İmmobilizasyon, enzimatik aktiviteyi ve biyosensör stabilitesini koruyabilir. Bununla birlikte, immobilizasyon işlemi enzim aktivitesini ve stabilitesini etkileyebilir, bazı immobilizasyon teknikleri, enzimin denatürasyonu veya analitin katalitik bölgeye erişimini bloke etmesi nedeniyle kısmen veya tamamen aktivite kaybına neden olabilir. Ayrıca, enzim denatürasyonu immobilizasyon sırasında meydana gelebilir, katalitik aktiviteyi azaltabilir veya biyokatalizörün özelliklerini değiştirebilir (Guzik et al., 2014).

1980'lerin sonundan beri, araştırmalar karbon pasta elektrotlarına dayalı amperometrik biyosensörlerin geliştirilmesine odaklanmıştır (Svorc et al., 1997). Karbon, karbon nanotüpler ve grafenin uygun kimyasal ve fiziksel özelliklerinin yanı sıra yüksek yüzey alanı, biyoyumluluk, kimyasal kararlılık ve sinyal tekrarlanabilirliği gibi özellikleri biyolojide en yaygın kullanılan malzemeler olmalarını sağlar. Altın, platin veya paladyum gibi metaller, elektron

transferi kolay olduğundan elektrokimyasal biyosensörlerde dönüştürücü olarak kullanılmıştır (Rocchitta et al., 2016).

2.7. Enzim Biyosensörlerinin Uygulama Alanları

Enzim bazlı biyosensörlerin yüksek hassasiyet ve özgüllük, taşınabilirlik, çoğu zaman düşük maliyet gibi avantajları klinik analiz, gıda güvenliği, hastalık tanısı ve kontrolü gibi alanlarda sıklıkla tercih edilmelerini sağlamıştır (Mehrotra, 2016).

Gıda malzemelerinin ve gıda ürünlerinin üretim sürecinde kalite kontrolü, üreticiler ve hijyen denetimleri için önemlidir. Mikrobiyal kontaminasyon veya önemli üretim parametrelerinin analizinin kısa sürede yapılması için biyosensör cihazları kullanılmaktadır. Gıda bileşenleri için enzim biyosensörleri ve patojen, pestisit tespiti için immünosensörler olmak üzere biyosensörlerin gıda analizlerinde kullanımı iki gruba ayrılır (Haleem et al., 2021). Ayrıca besin etiketlemesi, pestisit kalıntılarının belirlenmesi, doğal olarak oluşan toksinler ve anti-besinler, işleme değişiklikleri, mikrobiyal kontaminasyon, enzimatik inaktivasyon tayini için de kullanılırlar.

Biyosensörler, tıbbi teşhiste gıda endüstrisinden daha sık kullanılırlar. Nedeni ise tıp alanında kan, serum, idrar gibi belirli örnekler kullanılırken gıda alanında çok daha fazla çeşitte örnek bulunmasıdır. Bu durum biyosensör tasarımı ve ölçüm koşullarının optimizasyonu sürecini daha zor hale getirir (Monosik et al., 2012).

Tıp alanında biyosensörler dokularda, mikroorganizmalarda, organellerde, hücre reseptörlerinde, enzimlerde, antikorlarda ve nükleer asitlerde hassas biyoelementlerdeki spesifik bir maddeyi tespit etmek için kullanılır. Antikorlar arasındaki ilişki, katalizör enzimler, mikrobiyal hastalıklar, tümör büyümesinin tespiti, patojenler ve toksinler gibi süreçlerin tanımlanmasını sağlar (Zhang et al.,

2021). Enzimatik reaksiyonlarda CO_2 , NH_3 , H_2O_2 , H^+ , O_2 gibi türlerin tüketimi ve üretimi tespit edilerek biyolojik analitlerin aktivitesi ölçülür (Nguyen et al., 2019).

Çeşitli çevre kirleticiler örneğin; pestisitler, insektisitler, farmasötikler, fenolik bileşikler ve ağır metaller enzim biyosensörleriyle tespit edilebilir. Çevredeki kirletici kaynakları, insan veya doğa faaliyetlerinden kaynaklanabilir. Orman yangınları, biyolojik bozulma, volkanik patlama ve diğer doğal afetler, doğaları gereği kirletici kaynaklarıdır. Ayrıca madencilik, radyoaktif keşif, tarımsal faaliyetler, endüstriyel üretim toprak ve suya kirleticilerin geçmesine neden olabilir. Çeşitli tehlikeli metal iyonlarının enzimler üzerindeki inhibitör etkisinden faydalanılarak üreazlar, oksidazlar, peroksidazlar, dehidrojenazlar gibi enzimlerin aktiviteleri ile metal iyonların tayini yapılır. Enzim inhibisyonu, ağır metallerin amino asitlerin tiyol veya metiltiyol gruplarıyla etkileşime girdiği enzim bölümlerinde meydana gelir. Kadmiyum, krom, bakır, nikel, çinko gibi ağır metaller nitrat redüktaz enziminin inhibisyonu ile tespit edilmiştir. Civa, bakır, kadmiyum ve çinko, üreaz glutamik dehidrojenaz ve üreaz enzim inhibisyon sistemi kullanılarak tespit edilebilir (Sarkar et al., 2019).

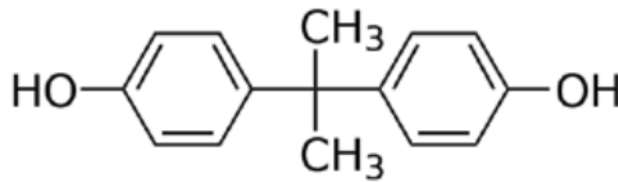
2.8. Karbon Pasta Elektrotlar

Karbon pasta elektrot, voltammetrik deneylerde yaygın olarak kullanılır. Karbon pasta, grafit tozu ve bir bağlayıcı yağ ile hazırlanır. Karışım, hem grafitin tozunun hem de mineral yağının fiziko-kimyasal özelliklerini içerir. Son elli yılda elektrokimyasal ve elektroanalitik ölçümlerde sıklıkla karbon pasta elektrotlar kullanılmıştır (Svancara et al., 2008). Karbon pasta elektrotlar bağlayıcı yağ içinde dağılmış karbon parçacıkları nedeniyle heterojen yüzeye sahiptir. Karbon partiküllerinin aktif yüzeyi, kısmen veya tamamen mineral yağı ile kaplanmıştır ve bu nedenle elektrotların yüzeyi lipofiliktir. Elektrokimyada, karbon pastaların hidrofobikliği, elektrokimyasal çalışmalarda tercih edilme sebeplerinden biridir (Svancara et al., 1996).

Düşük maliyetli, basit tasarıma sahip, düşük arka plan akımı, pasta karışıma iletkenliği ve kimyasal bağlanmayı arttırabilen moleküller ilave etme, düşük omik direnç, geniş potansiyel aralığı gibi avantajlara sahiptir. Bu avantajlara rağmen pratik kullanım için çok da uygun değildir. Elektrot yüzey tabakasının düzenli olarak çıkarılmasını gerektiren deneylerde karbon macununun yeniden doldurulması gereklidir ve bu işlem zaman alır. Karbon pasta yumuşaktır ve kompakt değildir. Karbon pasta teflon çubuğa, cam tüpe veya elektriksel iletkenliği sağlayan tel içeren polietilen malzeme içine sıkıştırılarak doldurulur (Vitras et al., 2009).

2.9. Bisfenol A (BPA)

Bisfenol A (BPA) $((CH_3)_2C(C_6H_4OH)_2)$ fenol reçineleri, şeffaf polikarbonat plastik, poli-akrilatlar ve polyesterlerin üretiminde kullanılan endüstriyel bir kimyasaldır (Ali et al., 2018). 1891'de, Aleksandr P. Dianin tarafından bir asit katalizörü varlığında fenolün asetonla birleştirilmesiyle elde edilmiştir. 1950'li yıllarda bilim adamları, BPA'nın karbonil klorür ile reaksiyonundan polikarbonat üretildiğini keşfetmişlerdir. Polikarbonat, plastik üretiminde yaygın olarak kullanılan berrak, sert bir reçinedir (Michalowicz, 2013). Dünyadaki toplam BPA üretimi 2015 yılında 7,7 milyon ton olmuştur. 2022'de 10.6 milyon tona ulaşması beklenmektedir (Industry Experts. (2016).



Şekil 2.5: Bisfenol A'nın Kimyasal Yapısı (Usta, 2016)

BPA katı ve kristal yapıda, fenolik kokulu, krem-beyaz renklidir. Çözünürlüğü alkali pH'da daha fazladır ve suda 120- 300 mg/L arasında değişir. Aseton, etanol ve dimetil sülfoksit gibi çözücülerde suya göre çok daha iyi çözünmektedir. Moleküler ağırlığı 228.29 g/mol ve yoğunluğu 1,2 g/cm³'tür (Usta, 2016).

BPA, Östrojenik aktiviteye sahip bir endokrin bozucudur. BPA'nın östrojenik aktivitesi, Krishnan'ın grubu tarafından tesadüfen keşfedilmiştir (Krishnan et al., 1993). Östrojenik aktivitesi nörolojik, hormonal ve kardiyovasküler bozukluklara yol açarak metabolizmaya ciddi zararlar verir (Kang et al., 2006).

Son yıllarda, BPA aktivitesini araştıran çalışmalar, BPA'nın neden olduğu oksidatif stresle hastalık patogenezi arasında doğrudan bağlantı olduğunu göstermektedir. Östrojenik, antiandrojenik ve antitiroid aktivite yoluyla hormon fonksiyonlarını etkiler. Spesifik olarak, BPA'ya maruz kalma, insanlarda ve hayvanlarda kardiyovasküler hastalıklara, beyin gelişimi anormalliklerine, obeziteye, hipertansiyona, tiroid fonksiyon bozukluğuna, diyabete, meme kanserine ve kısırlığa neden olmaktadır (Amjad et al., 2020).

BPA genellikle polikarbonat reçinelerin % 71 oranında, epoksi reçinelerin % 27 oranında ve doymamış polyester, polisülfon, polieterimid ve poliakrilat reçinelerin % 25 oranında hammaddesidir (Usta, 2016). Yüksek sıcaklıklara dayanıklı ve stabil olması gibi avantajları sayesinde birçok alanda kullanılmaktadır. Sert ve doğal yapıştırıcı özelliği sayesinde yapı malzemeleri, toz boyalar, teneke kutuların iç kaplamaları, otomotiv ürünleri, termal kağıt, elektronik parçaların kapsüllenmesi, tekrar kullanılabilir yiyecek ve içecek kapları gibi birçok üründe son derece kullanışlıdır. Çarpışmalara dayanabilirler, bu da BPA'nın güvenlik gözlükleri, yüz korumaları, motosiklet kaskları ve kurşungeçirmez camlar gibi güvenlik ekipmanlarının bileşenleri olarak kullanılmasını sağlar (Metz, 2016).

Kutuların iç yüzeylerini kaplayan koruyucu kaplamalardaki epoksi reçinelerin bir bileşeni olan BPA, yiyecek ve içecek ürünlerinin raf ömrünün uzatılmasına yardımcı olur. Ancak gıda ambalajları, damacana sular vb. ürünlerde ambalajdan gıdaya BPA migrasyonu gerçekleşebilmektedir (Subramanya, 2007).

Çok sayıda çalışmayla, BPA'nın polikarbonatlardan ve epoksi reçinelerden gıda ve içme suyuna salınabileceği kanıtlanmıştır. BPA'ya maruz kalma oranları incelendiğinde katı konserve gıdalarda ortalama konsantrasyonların 10 µg/kg ile 70 µg/kg arasında değiştiği, sıvı konserve gıdalarda ise 1 µg/L ile 23 µg/L arasında değiştiği görülmektedir. Balık, süt ürünleri, et, konserve sebzeler ve bebek maması BPA içerebilecek ürünlere örnektir. BPA'nın spesifik migrasyon limiti yani herhangi bir maddeden örneğin ambalajdan gıdaya geçişi için izin verilen maksimum BPA miktarı 0,6 mg/kg olarak belirlenmiştir (İyigündoğdu et al., 2020). Literatürdeki çalışmalar satesinde, et ürünlerinde 0.49–56 µg/kg, balıkta 7.1–102,7 µg/kg, sebze ve meyvelerde 11.0–95.3 µg/kg ve tahıllarda 1.0–3.8 µg/kg miktarlarda BPA bulunduğu tespit edilmiştir. BPA'nın her gün tüketilen gıdalardan sindirim kanalıyla insan vücuduna geçen miktarının 0.48 - 1.6 µg/kg/vücut ağırlığı/gün arasında olduğu tahmin edilmektedir (Michalowicz, 2013). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), BPA'nın günlük alım limitinin 0.05 mg/kg vücut ağırlığı/gün olduğunu belirtmiştir (Öksüz vd., 2012).

Yapılan araştırmaların sonuçlarına göre damacana sulara BPA tespit edilmiştir. Güneş ışığına maruz bırakılan ve 35°C'nin altında tutulan damacana sular incelendiğinde suya BPA migrasyonu gerçekleştiği görülmektedir. Maksimum migrasyon miktarı 0,003 mg/kg olarak ölçülmüştür. Bu seviye yasal olarak izin verilen seviyenin oldukça altındadır. Yetişkinlerin günlük 1.200 lt ve çocukların günlük 120 lt su içmeleri doğrudan toksik etkiye ancak sebep olabilmektedir. Doğru şartlar altında depolanan damacana suların insan sağlığı üzerinde çok ciddi şekilde toksik etkisi olduğu söylenemez (Erdem, 2012).

Vücut için oldukça zararlı bu kimyasalla teması en aza indirmek gereklidir. Gıda saklama ve mikrodalgada ısıtma için plastik kapların kullanımına dikkat edilmedilir. Uzun süreli kullanım sonrası yüzeyin aşınmasıyla BPA migrasyonu artmaktadır. Ayrıca sıcaklık da migrasyonu hızlandırır (Metz, 2016).

Çocukların vücutları kimyasalları detoksifiye etmek için yeterince gelişmemiştir. Bu nedenle BPA çocuklara daha fazla zarar verir. Bu zararı azaltmak için uzun süre kullanılmış ve çizilmiş biberonlar kullanılmamalıdır. Sıcak su ile hazırlanan bebek maması BPA ile yapılmış kaplarda saklanmamalıdır (Metz, 2016).

2.10. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit (H_2O_2) farklı konsantrasyonlarda ve sulu çözelti halinde temin edilebilen güçlü bir oksitleyici ajandır. Berrak renkte bir zayıf asittir. Piyasada genellikle ağırlıkça yüzde 30, 50, 70'lik konsantrasyonlarda kullanıma sunulur (Pedziwiatr et al., 2018).

1818'de Louis Jacques Thénard tarafından keşfedilmiş ve endüstriyel bir ürün olarak kullanımı hızla yaygınlaşmıştır. Günümüzde üretilen miktar yılda bir milyon tonun üzerindedir (Otmer, 1981). Saç boyaları ve ağartıcılar, diş macunları, gargaralar, banyo temizleyicileri ve çamaşır leke çıkarıcılar dahil olmak üzere temizlik ve kişisel bakım ürünlerinde kullanılmaktadır. Hidrojen peroksit ilk yardım antiseptiklerinde de bulunabilir ve bazı gıda ürünlerinde kullanılır. Su arıtma gibi endüstriyel kullanımları da vardır (Jonas, 1999).

H_2O_2 süperoksit dismutaz enzimlerle etkisi minimuma indirilmesi gereken oksidatif strese neden olan sitotoksik ajandır. Oksidatif stresin birçok hastalığın ilerlemesine neden olduğu bilinmektedir. Hücre hasarlarının nedeni çoğunlukla oksidatif strestir (Veal et al., 2007).

H_2O_2 , standart bir indirgeme potansiyeline sahip iki elektronlu güçlü bir oksidandır. Ayrıca hücre içi sinyal molekülü olarak görev alır. $O_2^{\cdot -}$ 'ye bir elektron eklenmesi veya O_2 'ye iki elektron eklenmesiyle doğrudan oluşurlar. Oluşan H_2O_2 'nin antioksidan enzimlerle parçalanarak H_2O ve O_2 açığa çıkması sağlanır (Halliwell et al., 2000).

Doğrudan veya ilk iyonizasyon sonrası reaksiyona girebilir ve serbest radikallere ayrışabilir. Çoğu zaman, reaksiyon mekanizması katalizi içermektedir. H_2O_2 'nin oksitleyici etkisinin artırılması, metal katalizörlerin varlığında gerçekleştirilir. Fe(II)–Fe(III) redoks sistemi, H_2O_2 ile birlikte en yaygın kullanılan katalizördür (Otmer, 1981).

2.11. Altın Nanopartikül (AuNP)

Altın nanopartiküller (AuNP), bir altın atomu ve yüzeydeki negatif gruplardan oluşan inorganik 1 ila 100 nm çapında nanopartiküllerdir (Chen et al., 2014). Malzemelerin nanometre boyutuna indirgendiğinde temel özellikleri, fiziksel ve kimyasal özellikleri değişmektedir. Farklı optik, manyetik, elektrik ve mekanik özellikler gösterirler (Zhang, 2015). AuNP'lerin yüksek yüzey-hacim oranı, yüksek yüzey enerjisi, prostetik grup ve elektrot yüzeyi arasında elektron iletkenliği sağlaması sayesinde redoks proteinleri ve elektrot yüzeyi arasında elektron transferini kolaylaştırdığı bilinmektedir. Bu avantajlar sayesinde biyomedikal görüntülemeye ve tedavi yöntemlerinde sıklıkla tercih edilmektedir (Jans and Hou, 2011).

AuNP'ler, biyoyumlulukları ve kolay protein işlevselliği sayesinde elektrokimyasal biyosensörlerde en yaygın olarak kullanılan metal nanopartiküllerdir (Cho et al., 2020).

Elektrokimyasal cihazlarla kimyasal ve biyolojik moleküllerin tespiti hastalıkların teşhisi, çevre koruması, atık kontrolü, gıda endüstrisi gibi alanlarda önemlidir. Bu alanlarda kullanılan biyosensör mekanizmalarında immobilizasyon sistemleri geliştirilerek hassasiyet artırılabilir. İnert yapıları, optik özellikleri, yüzey alanı ve çeşitli yüzey işlevselleştirme yöntemleri sayesinde altın nanopartiküller sıklıkla kullanılmaktadır (Radwan and Azzazy, 2009).

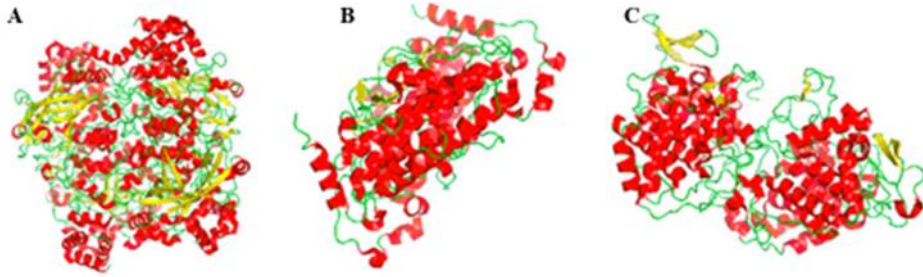
Altın nanopartiküllerin immobilizasyonda stabiliteyi arttırmaları ve doğrudan elektrot transferini sağlayarak aracıya gerek kalmadan elektrokimyasal algılamayı kolaylaştırmaları biyosensör alanındaki en önemli avantajlarındanıdır. Proteinlerin doğrudan elektron transferi üzerine yapılan çalışma, hem teorik hem de pratik açıdan büyük önem taşımaktadır, çünkü bu reaksiyonların anlaşılması, fizyolojik elektron transfer süreci hakkında fikir verir (Pingarron et al., 2008).

Yüzeye tiyol ligandları modifiye edilerek AuNP immobilizasyonu artırılabilir. Kopolimerler, nükleik asitler ve proteinler gibi fonksiyonel gruplar AuNP yüzeyine tiyol-altın etkileşimi sayesinde bağlanabilir (Yu et al., 2016).

2.12. Katalaz

Katalaz (CAT, 1.11.1.6), tek hücreli prokaryotlarda, çok hücreli ökaryotlarda, kısaca tüm canlılarda bulunan ve oksidoredüktaz sınıfına ait bir enzimdir. Yaklaşık 3,5 milyar yıl önce planktonik bakterilerin aerobik solunuma başlamasıyla katalitik enzimlerin evrimsel tasarımı başlamıştır. Daha sonra aerobik biyosferin gelişimi ile katalaz evrimi devam etmiştir (Gagne, 2014). Katalaz, dört polipeptit zincirinden oluşan bir tetramerdir. Bu zincirlerin her biri 500 amino asitten uzundur. Dört porfirin hem yani demir grubu içerir ve bu gruplar hidrojen peroksit ile reaksiyona girer. Katalaz çok geniş bir pH ve sıcaklık çalışma aralığına sahiptir, pH: 4-11 değerleri arasında ve 20-50 °C sıcaklık değerleri arasında katalaz ile çalışma yapılabilir (Kausal et al., 2018).

Katalaz enzimi katalitik merkezin yapısal farklılıklarına göre Şekil 2.6' da gösterildiği gibi üç farklı sınıfa ayrılırlar. Bunlar; monofonksiyonel hem içeren katalazlar, hem içeren katalaz-peroksidazlar ve manganez içeren katalazlar olmak üzere üç farklı sınıfa ayrılır. Bu enzim peroksizomlar/glioksizomlar, sitozol, kloroplast ve mitokondride bulunur. Turnover sayısı en yüksek olan enzimdir (Wu et al., 2014).

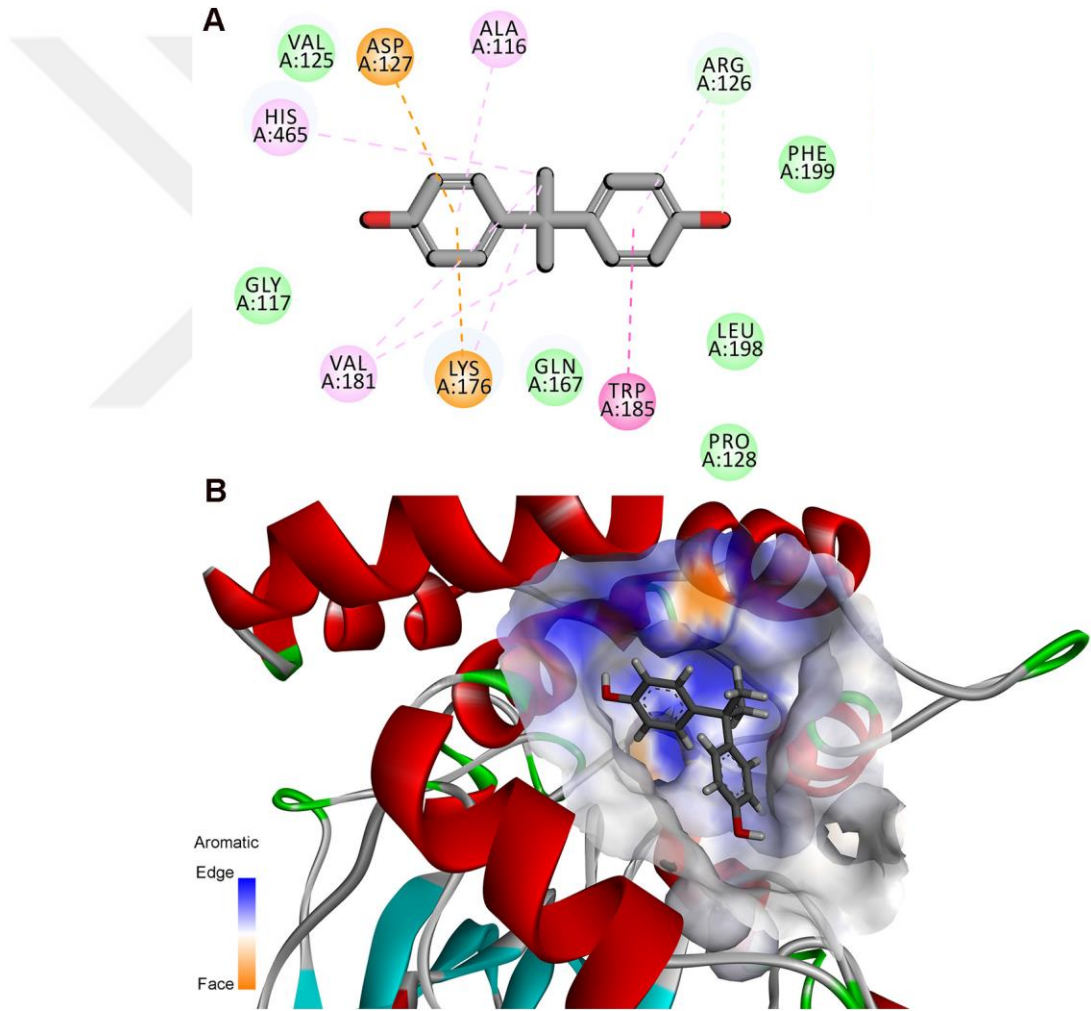


Şekil 2.6: Katalaz çeşitlerinin yapısal gösterimi; A) monofonksiyonel hem içeren katalaz, B) Mn içeren katalaz, C) Katalaz peroksidaz (Liu and Kokare, 2017)

Tüm aerobik organizmalar, zararlı reaktif oksijen türlerinin (süperoksit anyon (O_2^-), hidroksil radikali (OH), hidrojen peroksit (H_2O_2)) üretimi ile hücreler içinde hem fotosentez hem de solunum gerçekleştirebilmektedir. Reaktif oksijen türlerinin üretiminin artması nedeniyle lipidlerin peroksidasyonu, proteinlerin oksidasyonu, nükleik asitlerin zarar görmesi, enzim inhibisyonu, programlanmış hücre ölümü ile hücrelerde oksidatif stres oluşabilir. Tüm bunları engellemek için enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemleri geliştirilmiştir. Bu sistemlerde başlıca bilinen enzim katalaz enzimidir ve H_2O_2 'yi su ve oksijene indirgeyerek hücresel oksidatif hasarı önlemede önemli role sahiptir (Sharma and Ahmad, 2014).

2.12.1. Katalaz ve BPA arasındaki etkileşim

Proteinlerin yapısal değişiklikleri fizyolojik işlev bozukluğuna neden olabilir. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında, BPA'nın hidrofobik ve elektrostatik etkileşim yoluyla katalaz enziminin amino asit parçalarına bağlandığını ve katalazın stereokimyasal yapısının değiştirebildiği görülmüştür. Artan α -sarmalı içeriği ve azalan β yaprağı içeriği sayesinde bu etkileşimlerin neden olduğu değişiklikler gözlemlenebilmektedir.



Şekil 2.7: Kat-BPA sisteminin molekül yerleştirme sonuçları. A: BPA, Katalazın ilgili amino asit parçalarıyla birleşir; B: Kat-BPA sisteminin bağlayıcı kısmı (Piao et al., 2019).

BPA ve katalaz arasındaki etkileşimde katalazın Ala116, Gly117, Val125, Arg126, Asp127, Pro128, Gln167, Lys176, Val181, Trp185, Leu198, Phe199 ve His465 amino asitlerinin bağlanma bölgesindeki en önemli amino asitler olduğu yapılan floresans spektrokopi çalışmasıyla görülmüştür. BPA'nın simetrik fenolik hidroksil kısımları ile Arg126 arasındaki hidrojen bağı kompleksi aktif merkezdedir. Ayrıca BPA ile Gly117, Val125, Pro128, Gln167, Leu198 ve Phe199 arasında Van der Waals etkileşimleri vardır. BPA'nın benzen halkası ile katalaz üzerindeki Asp127, Lys176 arasında da etkileşimler bulunmuştur. BPA ile Trp185 arasındaki etkileşim katalaz enzimi etkinliğinin azalmasındaki birincil nedendir.

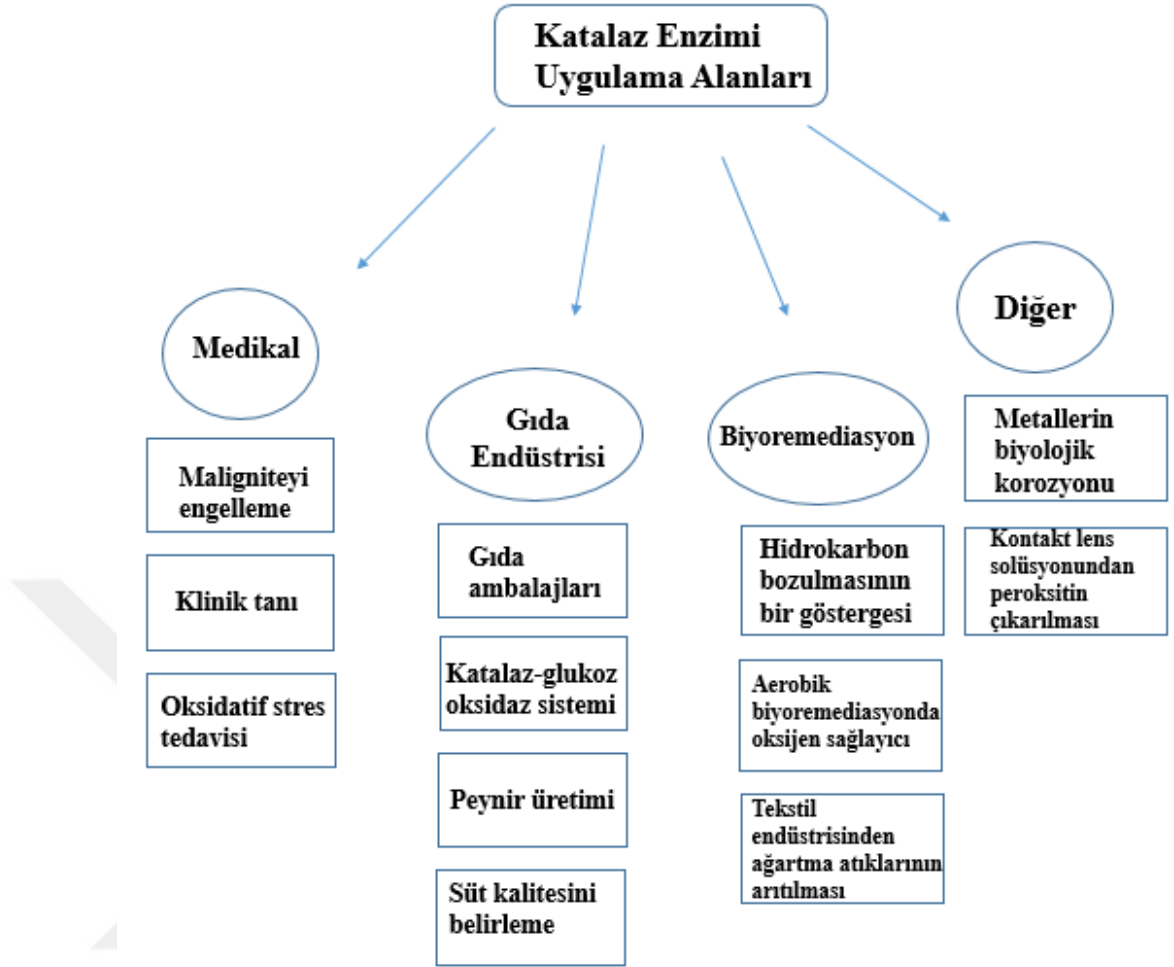
Sonuç olarak, katalaz ve BPA arasındaki etkileşimin, katalazın H_2O_2 üzerindeki etkinliğini azaltan hidrofobik etkileşimler olduğu yapılan çalışmalar sayesinde bilinmektedir (Piao et al., 2019).

2.12.2. Katalazın Uygulama Alanları

Katalaz enzimi biyoremediasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Atıkların aerobik biyoremediasyonu sırasında hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalayarak oksijen sağlar ve aerobik mikroorganizmalar için bir oksijen kaynağı görevi görür.

Tekstil alanında, ağartma atıklarından hidrojen peroksitin uzaklaştırılmasında uygulanması ve sonraki boyama aşamaları için suyun tekrar kullanılmasını sağlamak gibi avantajları sayesinde tercih edilmektedir. Tekstil ürünleri katalaz sayesinde biyolojik olarak atıklardan ayrılabilir.

Gıda endüstrisinde, peynir üretimi, yumurta beyazından unlu mamüller üretebilmek için glikozun uzaklaştırılması, glikoz oksidaz ile birlikte antioksidan enzim sistemi olarak, çalışması için kullanılmaktadır. Ayrıca gıda ambalajlarında ve süt kalitesinin kontrolünde olmak üzere çeşitli alanlarda kullanılmıştır (Kaushal et al., 2018).



Şekil 2.8: Katalaz enziminin kullanım alanları (Kaushal et al., 2018).

3. MATERYAL METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Cihaz ve Diğer Ekipmanlar

PalmSens Ins. (Hollanda) marka potansiyostat; BASI MF-2010 model karbon pasta elektrodu, CHI 111 model Ag/AgCl doygun referans elektrodu, BASI MW-1032 model platin yardımcı elektrodu; Eppendorf 50, 1000 ve 5000 µL otomatik pipetler, Polyscience marka soğutmalı sirkülasyonlu termostat, IKA manyetik karıştırıcı, Hanna marka pH metre kullanıldı.

3.1.2. Kimyasallar

Grafit, Mineral yağı, AuNP, EDC, NHS, Bisfenol-A, Karaciğer Katalazı (E.C. 1. 11. 1. 6), 3- MPA, sisteamin, etanol, potasyum fosfat monobazik, potasyum klorür, potasyum ferrosiyanür, sodyum fosfat monobazik, sodyum klorür, Tris, sodyum asetat, sitrik asit, hidroklorik asit, sodyum hidroksit, potasyum hidroksit, Sigma Chemical (USA)'dan, H₂O₂ (% 30) Riedel-de Haeg'den temin edilmiştir.

Deneysel çalışmalarda kullanılan çözeltiler aşağıda belirtilmiştir:

- 50 mM Potasyum fosfat tamponları (pH: 6,0- 6,5 -7,0 -7,5-8,0)
- 50 mM Tris-HCl tamponu (pH: 7,0-8,5-9,0)
- 50 mM Sodyum fosfat tamponu (pH: 7,0)
- 50 mM Sodyum sitrat tamponu (pH: 5,0-5,5)
- 10 mM K₄[Fe (CN)₆]
- 3 M KCl
- 10 mM Sisteamin (Etanolde çözüldü.)

- 10 mM 3-MPA(Etanolde çözüldü.)
- 5 nm AuNP
- 10 mg/ml (E. C. 1. 11. 1. 6) Katalaz (pH: 7,0 50 mM Potasyum fosfat tamponunda çözüldü.)
- EDC (pH: 6, 5 50 mM Potasyum fosfat tamponunda çözüldü.)
- NHS (pH: 6, 5 50 mM Potasyum fosfat tamponunda çözüldü.)
- H₂O₂ (K₄[Fe (CN)₆] içeren pH: 7,0 50 mM Potasyum fosfat tamponunda çözüldü.)
- 438 µM BPA (5 ml etanolde çözüldü ve 95 ml bidistile su eklendi.)

3.2. Yöntem

3.2.1. Biyosensörün hazırlanması

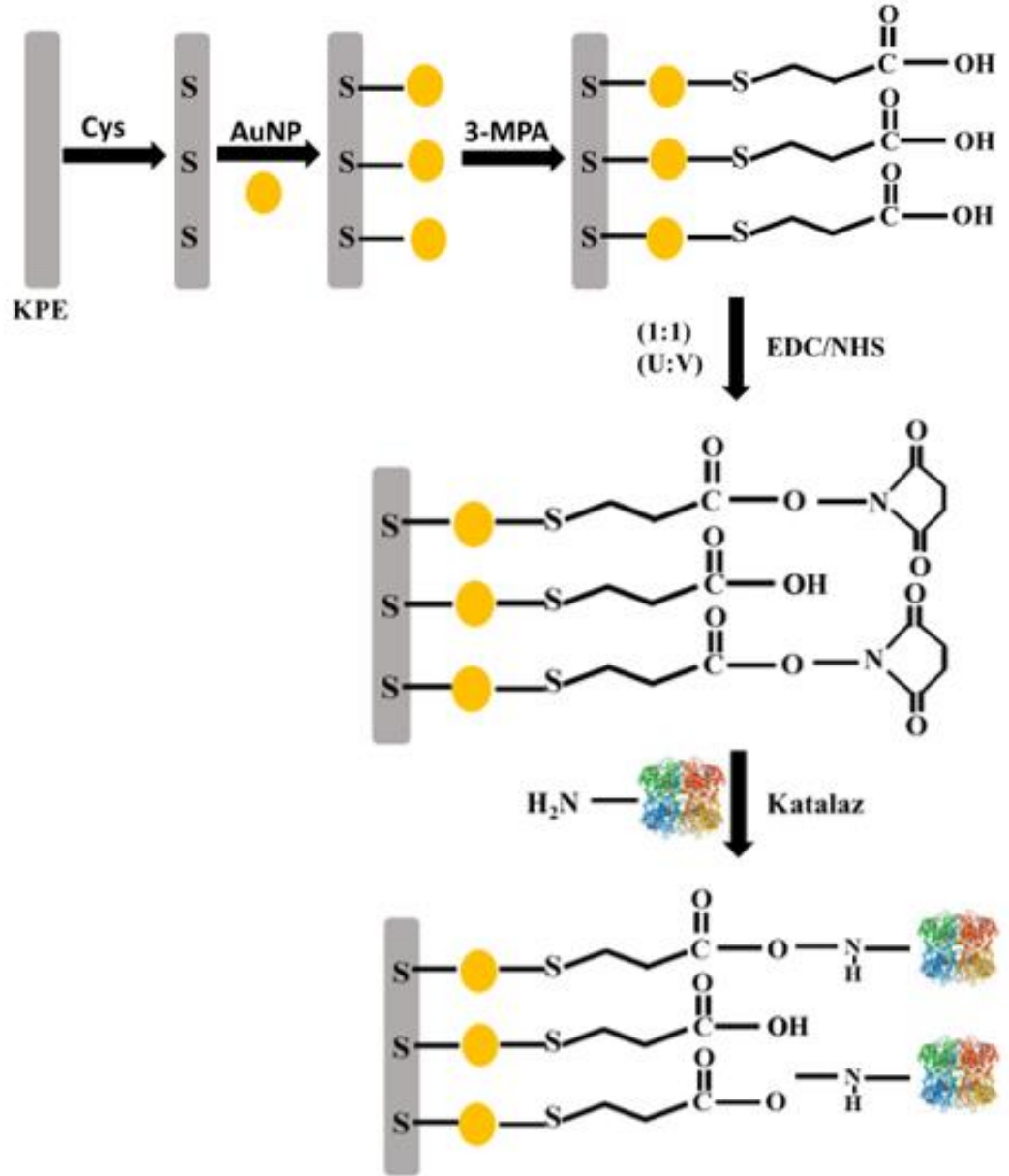
3.2.1.1. Karbon pasta elektrodun hazırlanışı

- ✓ 0,075 gr grafit tozu ve 0,025 gr mineral yağı karıştırılarak cam yüzeyde homojen hale getirilir.
- ✓ Elektrot, hazırlanan pasta ile doldurulur.
- ✓ Temiz bir yüzey kullanılarak elektrot yüzeyi düz ve temiz bir zeminde pürüzsüz hale getirilir.

Biyoaktif Tabakanın Oluşturulması

- ❖ Hazırlanan KPE üzerine % 99'luk etanolde hazırlanan 10 mM'lık sisteamin (Sis) çözeltisinden 10 µl damlatılır. 30 dakika boyunca, oda sıcaklığında kuruması için bekletilir.

- ❖ Sis ile modifiye edilen KPE yüzeyine 5 nm boyutunda AuNP çözeltisinden 10 μ l damlatılır. 30 dakika boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılır.
- ❖ Sis/AuNP ile modifiye KPE yüzeyine, % 99'luk etanolde hazırlanan 10 mM'lık 3-MPA çözeltisinden 10 μ L damlatılarak oda sıcaklığında 2 saat bekletilir. Bağlanmayan 3-MPA bileşiklerin uzaklaştırılması için bidistile suyla yıkanır ve kurutulur.
- ❖ Sis/AuNP/3-MPA modifiye KPE, 50 mM, pH: 6,5 potasyum fosfat tamponunda hazırlanan EDC-NHS çözeltisine daldırılır, 30 dakika boyunca çözelti içinde ve karanlıkta bekletilir. İnkübasyon süresi bittikten sonra bidistile suyla durulanır ve kurutulur.
- ❖ Sis/AuNP/3-MPA modifiye KPE yüzeyine, 50 mM, pH: 7,0 potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 10 mg/mL'lik katalaz (CAT) çözeltisinden 10 μ L damlatılır ve +4 °C'de kurumaya bırakılır.
- ❖ Sis/AuNP/3-MPA/Kat modifiye elektrot kullanılmadığı zamanlarda +4 °C'de bekletilir. Şekil 3.1'de tasarlanan enzim temelli biyosensörün immobilizasyon aşamaları gösterilmektedir.

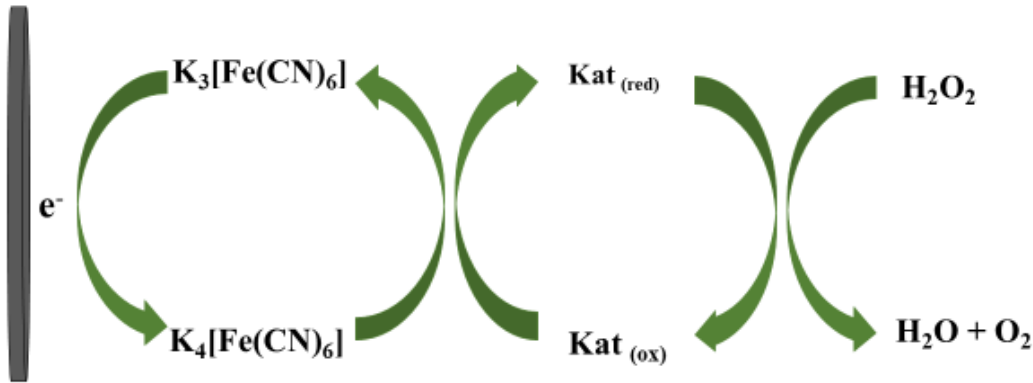


Şekil 3. 1: Enzim temelli biyosensörün immobilizasyon şeması

3.2.2. Biyosensörün Çalışma Prensibi

Sis/AuNP/3-MPA/Kat Modifiye Elektrot

Hazırlanan katalaz enzim biyosensörünün çalışma ilkesi; ortamda bulunan hidrojen peroksidin katalaz enzimi tarafından parçalanması sonucu oluşan yükseltgenmiş hem grubunun rejenerasyonu için kullanılan $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ sistemi yardımıyla elektronların karbon pasta elektrot yüzeyine aktarılmasıyla (-0,15 & +0,95) V potansiyel aralıkta akımın ölçülmesidir. BPA, hidrofobik ve elektrostatik etkileşim yoluyla katalaz enzimine bağlanır ve stereokimyasal yapısını değiştirebilir. BPA'nın katalaz enziminin aktif merkezindeki hidrojen bağları, Van der Waals kuvveti ve hidrofobik etkileşimleri engellemesi, H_2O_2 'ye karşı aktivitesinde azalmaya neden olmaktadır. Bu aktivite azalışı BPA konsantrasyonuyla orantılıdır. BPA'nın katalaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisine dayanarak akım farklanmaları gözlemlenerek konsantrasyon hakkında bilgi sağlanmıştır.



Şekil 3. 2: Tasarlanan enzim temelli biyosensörün çalışma prensibi.

3.3. Çalışmada Tasarlanan Enzim Temelli Biyosensörün Karakterizasyonuna Yönelik Çalışmalar

3.3.1. Sis/AuNP/3-MPA/Kat Biyosensörünün CV Karakterizasyonu

Enzim biyosensörünün yüzey karakterizasyonu çalışması için; immobilizasyondan önce ve her immobilizasyon aşamasından sonra 50 mM, pH: 7,0 potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ çözelti ortamında ve 25 °C sabit sıcaklıkta, -0,5 V & +0,8 V potansiyel aralığında CV yöntemi ile ölçümler alınmıştır. Bu şekilde, her aşamada elektrot yüzeyine immobilize edilen biyoaktif tabaka bileşenlerinin elektrodun davranışını ne ölçüde değiştirdiği belirlenmiştir. Son olarak hazır hale gelen elektrot ile ortamda 500 μ M H_2O_2 ve 0,75 μ M BPA varken meydana gelen akım farklanması ölçülmüştür.

Bu aşamalar aşağıdaki sırayla yapılmıştır:

1. Karbon pasta elektrot hazırlandıktan sonra yalın elektrodun yüzey karakterizasyonu yapıldı.
2. KPE yüzeyine sisteamin immobilize edildi ve yüzey karakterizasyonu yapıldı.
3. KPE/Sis elektroduna AuNP immobilize edildi ve yüzey karakterizasyonu yapıldı.
4. KPE/Sis/AuNP modifiye elektroda 3-MPA immobilize edildi ve yüzey karakterizasyonu yapıldı.
5. KPE/Sis/AuNP/3-MPA elektrodu EDC-NHS ile modifiye edildi ve yüzey karakterizasyonu yapıldı.
6. KPE/Sis/AuNP/3-MPA elektroduna katalaz immobilize edildi ve yüzey karakterizasyonu yapıldı.

7. KPE/Sis/AuNP/3-MPA/Kat elektrodu ile 50 mM, pH: 7,0 potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ çözelti ortamında, -0,15 V & 0,95 V potansiyel aralığında 500 μM H_2O_2 ve 0,75 μM BPA ile ölçüm alındı.

3.3.2. KPE/Sis/AuNP/3-MPA/Kat Biyosensörünün Tarama Hızı Karakterizasyonu

Tasarlanan enzim temelli biyosensörün tarama hızını incelemek amacıyla pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponu içinde hazırlanan 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ ortamında ve 25 °C sabit sıcaklıkta, 0,75 μM BPA ve 500 μM H_2O_2 için -0,5 V & +0,5 V potansiyel aralığında CV yöntemi kullanılarak 10, 25, 50, 75, 100, 150, 250 mV/ s tarama hızında ölçüm alındı.

3.4. KPE/Sis/AuNP/3-MPA/Kat Biyosensörünün Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyonu

3.4.1. Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Katalaz enzim miktarının biyosensör cevabına etkisini incelemek amacıyla 50 mM fosfat tamponunda 5mg/ml, 10 mg/ml ve 20 mg/ml konsantrasyonlarında katalaz enzim çözeltisi hazırlanmıştır. Çalışmalar pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ ortamında, 25 °C sabit sıcaklıkta ve -0,15 V & +0,95 V potansiyel aralığında DPV metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en uygun katalaz enzimi miktarı belirlenmiştir.

3.4.2. AuNP boyutunun biyosensör cevabı üzerine etkisi

AuNP boyutunun biyosensör cevabına etkisini incelemek amacıyla iki farklı AuNP çözeltisi kullanılmıştır. 5 nm ve 10 nm AuNP çözeltilerinden elektrot yüzeyine damlatılmıştır. Çalışmalar pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ ortamında ve 25 °C sabit sıcaklıkta -0,15 V & +0,95 V potansiyel aralığında DPV metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en uygun AuNP boyutu belirlenmiştir.

3.5. Enzim Temelli Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

3.5.1. Tasarlanan enzim temelli biyosensör için optimum pH'ın belirlenmesi

Tasarlanan enzim temelli biyosensörün optimum pH değerinin belirlenmesi için farklı pH'lardaki tampon çözeltileri kullanılarak 0,75 μ M BPA ve 500 μ M H_2O_2 için ölçümler alınmıştır. Denemede kullanılan, pH: 5,0; 5,5 çözeltileri sodyum sitrat ile, 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 çözeltileri potasyum fosfat ile hazırlanmıştır. pH: 8,5; 9,0 çözeltileri ise glisin ile hazırlanmıştır. Bu hazırlanan tampon çözeltileri daha sonra ölçüm alınmak amacıyla 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltileri hazırlanması için kullanılmıştır. Deneysel çalışmalar -0,15 V & +0,95 V potansiyel aralığında DPV yöntemi kullanılarak 25 °C sabit sıcaklıkta yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara bakılarak biyosensör çalışması için en uygun pH belirlenmiştir.

3.5.2. Tasarlanan Enzim Temelli Biyosensör İçin Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Çalışmada hazırlanan enzim temelli biyosensörünün optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla sırasıyla 20, 25, 30, 35 ve 40 °C 'de 0,75 μ M BPA ve 500 μ M H_2O_2 için ölçümler alınarak tasarlanan biyosensörün farklı sıcaklık değerlerine gösterdiği değişimler incelendi. Yapılan sıcaklık denemeleri düşükten yükseğe

doğru olacak şekilde pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ ortamında -0,15 V & +0,95 V potansiyel aralığında DPV metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.5.3. Tasarlanan enzim biyosensörüne farklı tamponların etkisi

Hazırlanan biyosensör üzerine farklı tamponların etkisini incelemek amacıyla 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 50 mM pH: 7,0 olan KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 ve Tris-HCl tamponlarında ölçümler alındı. Denemeler -0,15 V & +0,95 V aralığında DPV yöntemi kullanılarak pH:7,0 ve 25 °C sabit sıcaklıkta yapılmıştır. Çalışmaya en uygun tampon sistemi belirlenmiştir.

3.6. Sis/AuNP/3-MPA/Kat Enzim Temelli Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları

3.6.1. Sis/AuNP/3-MPA/Kat biyosensörünün doğrusal tayin aralığı belirlenmesi

Yapılan denemelerde öncelikle tampon ve (tampon + H_2O_2) için DPV ölçümleri yapıldı ve daha sonra 500 μM H_2O_2 içeren ortamda 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,75; 2,5 μM BPA konsantrasyonlarıyla DPV yöntemi ile ölçümler alınmıştır. Ölçümler 50 mM, pH: 7,0 fosfat tamponunda (10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren) ve 25 °C'de -0,15 V & +0,95 V potansiyel aralığında yapılmıştır.

3.6.2. Sis/AuNP/3-MPA/Kat enzim temelli biyosensörün tekrarlanabilirliğine yönelik denemeler

Hazırlanan enzim temelli biyosensörün tekrarlanabilirliğinin incelenmesi amacıyla 0,75 μM BPA ve 500 μM H_2O_2 için -0,15 V & +0,95 V arasında DPV

yöntemi ile 10 adet ölçüm alındı. Bulunan sonuçlardan yola çıkılarak ortalama değer ($\bar{x}$), standart sapma (S.S.) ve varyasyon katsayısı (% V.K.) belirlenmiştir.

3.6.3. Sis/AuNP/3-MPA/Kat enzim temelli biyosensör için amperometri çalışması

Hazırlanan enzim temelli biyosensör ile amperometri çalışması yapmak için pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda (10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren) ve 25 °C sabit sıcaklıkta, 0,8 V potansiyelinde ve 60 saniyede bir 1 mL BPA şırınga ile çalışma hücreğine eklenmiştir. Bu çalışma için 438 μM 'lık stok BPA çözeltisi 20 kat seyreltilerek elde edilen 21,9 μM 'lık çözelti kullanılmıştır. Her ekleme sonrası ortamdaki BPA konsantrasyonu hesaplanmıştır; 1,46 μM , 2,73 μM , 3,86 μM , 4,86 μM , 5,76 μM , 6,57 μM , 7,3 μM , 7,96 μM , 8,56 μM .

3.6.4. Sis/AuNP/3-MPA/Kat enzim temelli biyosensör için substrat spesifikliğı çalışması

BPA tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün substrat spesifikliğini araştırmak için 0,75 μM konsantrasyonlarda tirozin, glukoz, askorbik asit ve dopaminle ayrı ayrı, pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda (10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren) ve 25 °C sabit sıcaklıkta, 500 μM H_2O_2 içeren ortamda ölçümler alınmıştır. Alınan ölçümler ile BPA'nın verdiği akım değeri % 100 kabul edilerek diğer moleküller için elde edilen akım değerleri ile kıyaslandı.

3.6.5. Sis/AuNP/3-MPA/Kat enzim temelli biyosensör ile örnek tayini

Hazırlanan enzim temelli biyosensör ile örnek tayini yapılması için Şubat 2021'den Ağustos 2021'e kadar bekletilen damacana su kullanıldı. İlk olarak pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda (10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren) ve 500 μM

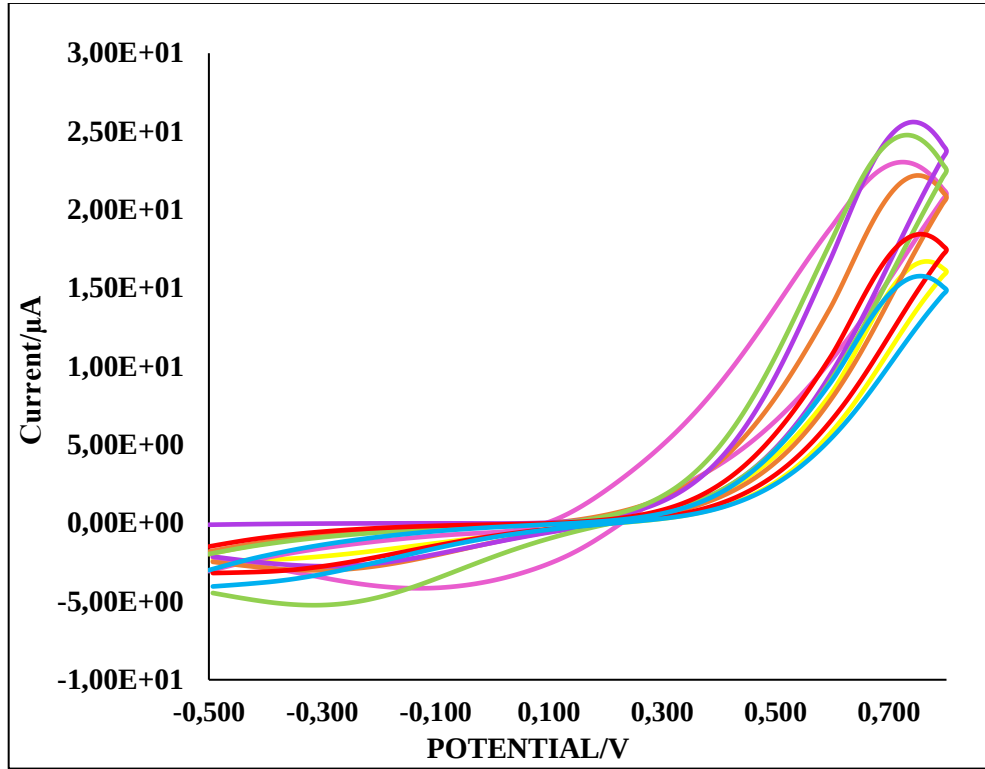
H₂O₂ içeren ortama sadece damacana su katılarak 8 tekrar ölçüm alındı. Ortama katılan damacana suyun miktarı, daha önceki çalışmalarda kullanılan BPA miktarıyla aynıydı. Daha sonra ve 500 µM H₂O₂ içeren ortama eşit miktarda damacana su ve BPA katılarak 10 tekrar ölçüm alındı. Bu veriler -0,15 V & +0,95 V arasında DPV yöntemiyle ve 25 °C sabit sıcaklıkta ölçüm alınarak elde edilmiştir. Bulunan sonuçlardan yola çıkılarak ortalama değer ($\bar{x}$), standart sapma (S.S.) ve varyasyon katsayısı (% V.K.) belirlenmiştir.



4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Sis/AuNP/3-MPA/Kat Enzim Temelli Biyosensörünün CV Karakterizasyonuna İlişkin Olarak Yapılan Deneylerde Elde Edilen Sonuçlar

Çalışmadaki enzim temelli biyosensörün immobilizasyonunun her bir aşamasında CV karakterizasyonu için; pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponu içinde hazırlanan 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ ortamında -0,5 V & +0,8 V potansiyel aralığında ve 25 °C sabit sıcaklıkta döngüsel voltammogram ile ölçümler alındı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Sisteamin immobilizasyonu sonrası akım pikinde yalın elektroda göre artış gözlemlenmiştir. AuNP beklenildiği gibi iletkenliği arttırarak akımda artışı sağlamıştır. 3-MPA immobilizasyonu ve EDC-NHS muamelesi sonrası piklerde azalma görülmüştür. Bunun nedeni immobilizasyon sonrası yüzeydeki tabakanın kalınlaşması ve elektron transferinin zorlaşmasıdır. Son olarak katalazın immobilize edilmesiyle birlikte iletkenlikte azalma olduğu gözlenmiştir. Immobilizasyon sonrası hazırlanan elektrodun 0,75 μ M BPA ve 500 μ M H_2O_2 ile alınan ölçümde akım piki azalmaktadır. Diferansiyel puls voltammetrisi sonuçları ve döngüsel voltammetri sonuçlarının her ikisinde de BPA’nın akım pikini azalttığı görülmüştür. Bu sonuç immobilizasyon yönteminin efektif olarak çalıştığını göstermektedir.



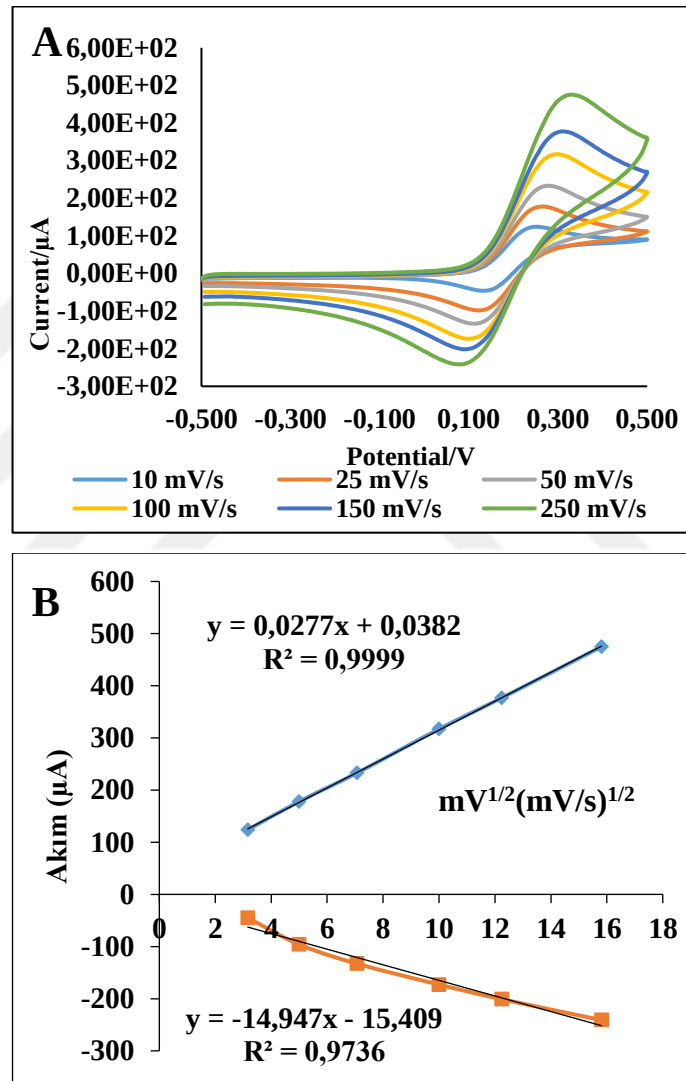
Şekil 4. 1: Tasarlanan enzim biyosensörünün yüzey modifikasyonuna ilişkin CV voltammogramları.

Sarı: Yalın elektrot, **Pembe:** SIS modifiye KPE, **Mor:** SIS/ AuNP modifiye KPE, **Yeşil:** SIS/ AuNP/ 3-MPA modifiye KPE, **Turuncu:** SIS/ AuNP/ 3-MPA/ EDC-NHS modifiye elektrot, **Kırmızı:** SIS/ AuNP/ 3-MPA/ EDC-NHS/ CAT, **Mavi:** SIS/ AuNP/ 3-MPA/ CAT modifiye edilmiş KPE ile BPA ve H₂O₂'li ortamda alınan ölçüm (Ölçümler pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM K₄[Fe(CN)₆] ortamında (-0,5)V & (+0,8)V potansiyel aralığında 25 °C sabit sıcaklıkta alındı.)

4.1.1. Sis/AuNP/3-MPA/Kat biyosensörünün tarama hızı kontrolüne ilişkin yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar

Tasarlanan enzim temelli biyosensörün tarama hızını incelemek amacıyla pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponu içinde hazırlanan 10 mM K₄[Fe(CN)₆] ortamında, 25 ° C sabit sıcaklıkta ve -0,5 V & +0,5 V potansiyelleri arasında döngüsel voltammogram ile ölçümler alındı. Elde edilen veriler Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Voltammetrik yöntemlerle ölçüm yaparken akımın difüzyon veya adrospsiyon kontrollü olduğunu belirlemek önemlidir. Difüzyon kontrollü ise

normal voltammetrik yöntemler iyi sonuç verir. Ancak adsorpsiyon kontrollü ise sıyırma yöntemleri seçilmelidir. Bunu belirlemek için de döngüsel voltammetri ile farklı tarama hızlarında ölçüm alınarak akım değişimi incelenebilir (Yılmaz, 2012). Bu çalışmada akım ve tarama hızı doğrusal bir şekilde artmıştır yani tarama hızının artmasıyla elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektron difüzyonun orantılı bir şekilde arttığı görülmektedir. Bu nedenle DPV yöntemi tercih edilebilmektedir.

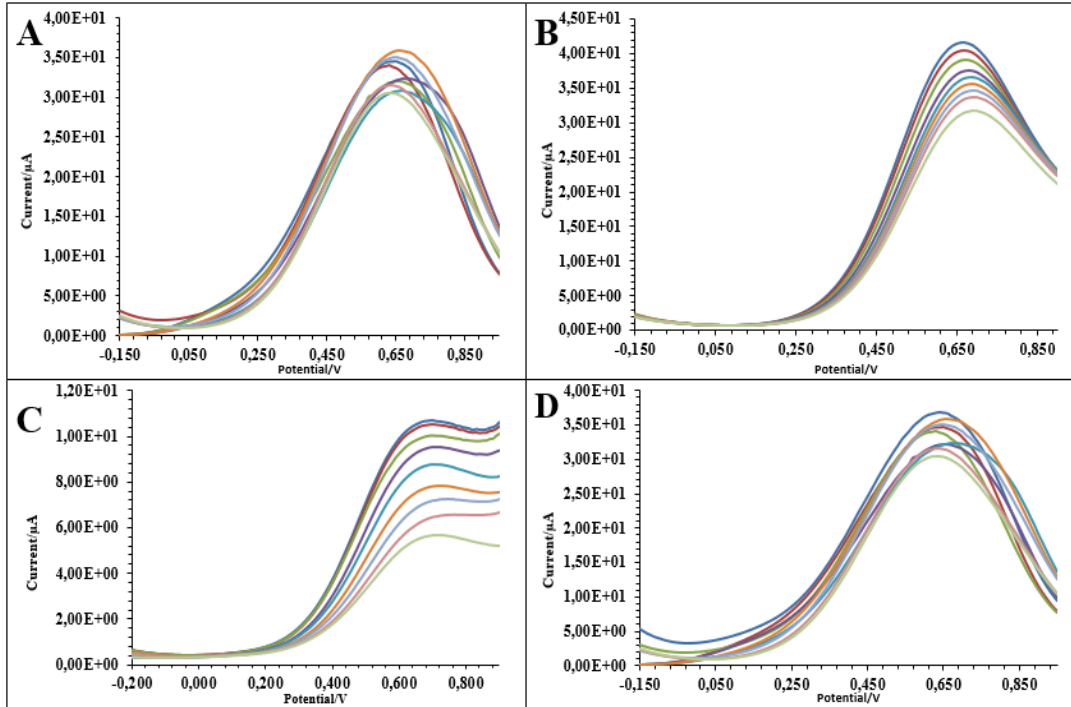


Şekil 4.2: Tarama hızının biyosensör cevabı üzerine etkisi. A: Tarama hızlarına ait döngüsel voltammogram sonuçları. B: Döngüsel voltammogramdan elde edilen sonuçların anodik ve katodik yöndeki doğrusal tayin grafikleri. Ölçümler pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ ortamında -0,5 V & +0,5 V potansiyelleri arasında alınan döngüsel voltammogramları ile 25 ° C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

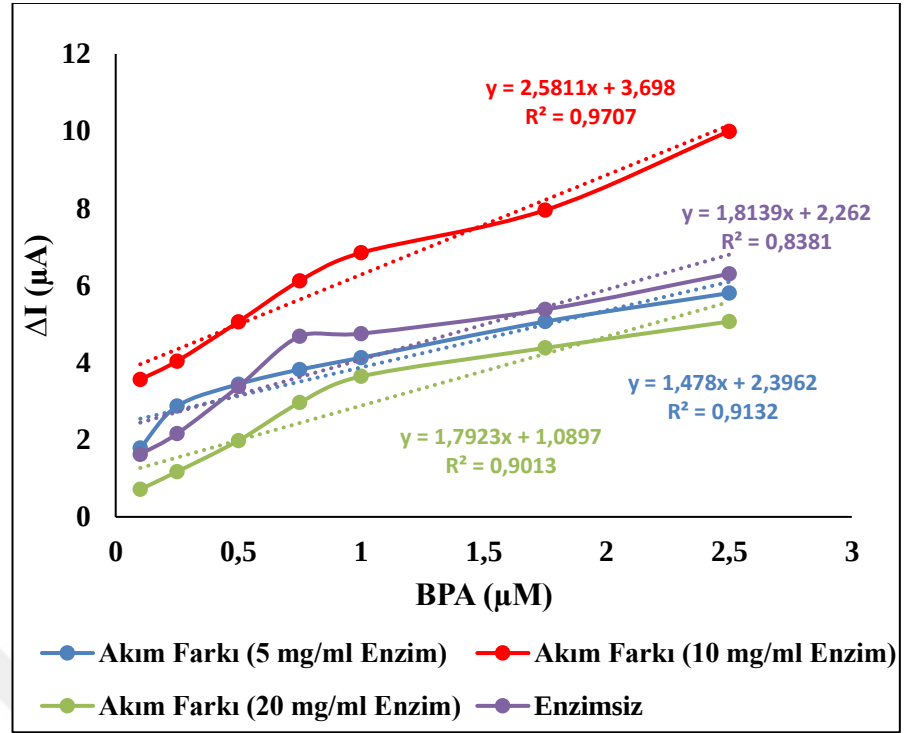
4.2. Sis/AuNP/3-MPA/Kat Enzim Temelli Biyosensörün Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyon Çalışmalarında Elde Edilen Sonuçlar

4.2.1. Katalaz enzimi miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin sonuçları

BPA tayini amacıyla hazırlanan katalaz biyosensöründe, enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışmadan elde edilen grafik Şekil 4.3' te verilmiştir. Bu çalışma sonrası alınan sonuçlara göre 10 mg/ mL enzim miktarının uygun değer olduğu görülmüştür.



Şekil 4.3: Enzim biyosensörünün farklı enzim miktarı ile çalışmalarından elde edilen DPV sonuçları. 5 mg/mL Katalaz enzimi ile hazırlanan elektrot (A), 10 mg/mL Katalaz enzimi ile hazırlanan elektrot (B), 20 mg/mL Katalaz enzimi ile hazırlanan elektrot (C) Enzimsiz biyosensör (D). Ölçümler 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 50 mM tamponda ve pH 7,0; 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.



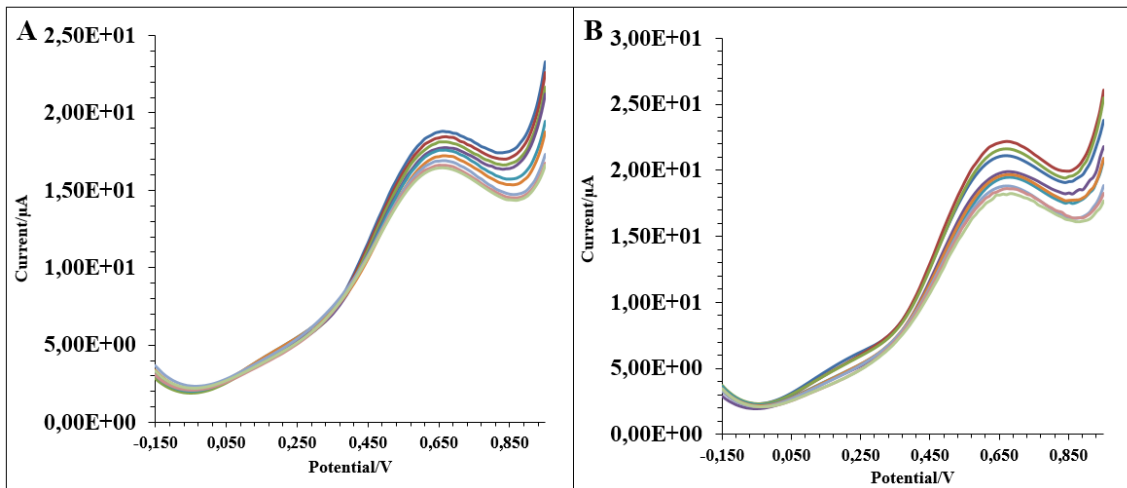
Şekil 4. 4: Enzim miktarı optimizasyon grafiği. Kırmızı: 10 mg/mL enzim kullanılarak hazırlanan biyosensör, Mor: Enzimsiz hazırlanan biyosensör, Mavi: 5 mg/mL enzim kullanılarak hazırlanan biyosensör, Yeşil: 20mg/mL enzim kullanılarak hazırlanan biyosensör. Ölçümler 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 50 mM tamponda ve pH 7,0; 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

10 mg/mL enzim ile hazırlanan elektrotla alınan sonuca bakıldığında en yüksek akım farklanmalarının bu elektrotta olduğu ve substrat için en doğrusal sonucun elde edildiği görülmektedir. Enzim miktarı yarıya düşürüldüğünde ve iki katına çıkarıldığında zaman biyosensör cevabında düşüş gözlenmiş ve grafiklerin eğimi yatay düzleme yaklaşmıştır. 5 mg/mL enzim ile hazırlanan biyosensörün cevabının düşük olmasının nedeni, enzim miktarının düşük olmasıyla enzimin aynı miktardaki BPA moleküllerince daha çok etkilenmesi olarak düşünülmüştür. Ayrıca bu miktardaki enzimle alınan sonuç doğrusal değildir. 20 mg/mL enzim ile hazırlanan elektrotta akım farklanması oldukça düşüktür. Nedeni ise daha fazla enzimin bağlanmış olmasının BPA'nın etkinliğini sınırlandırması olarak değerlendirilmiştir. Enzimsiz elektrotla alınan ölçümde doğrusallık beklenildiği gibi düşük çıkmıştır. Buradaki akım değerleri BPA'nın 0,65 V civarlarında

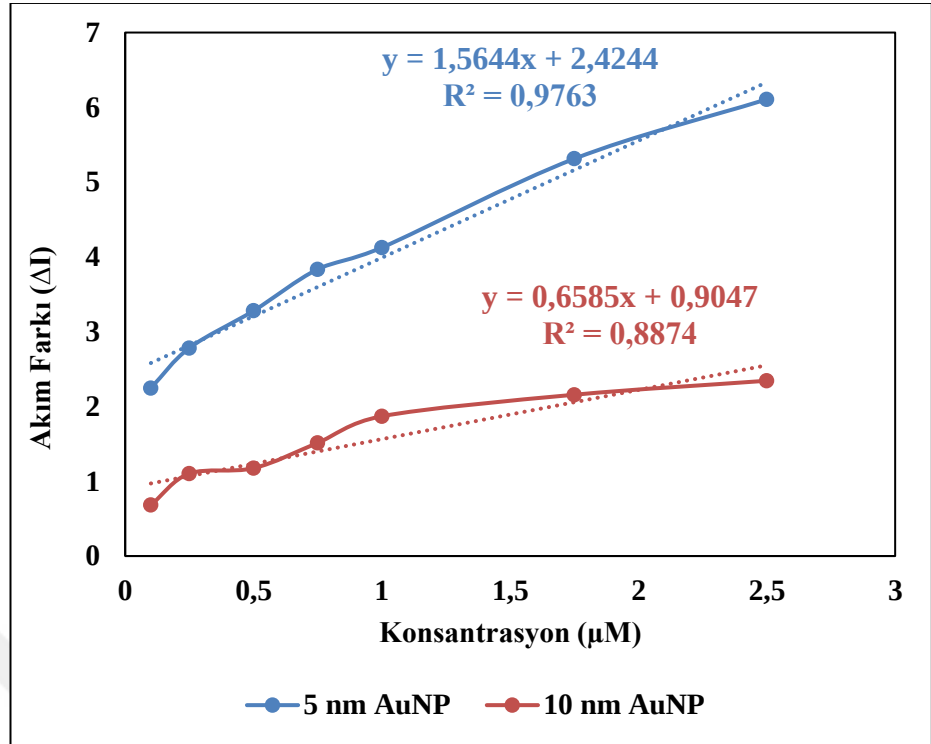
elektrooksidasyona dayalı pikler vermesinden kaynaklanmaktadır. Bu çalışma BPA'nın katalaz enzimi üzerine net etkisini göstermektedir.

4.2.2. AuNP boyutunun biyosensör cevabı üzerine etkisinin sonuçları

AuNP boyutunun biyosensör cevabına etkisini incelemek amacıyla yapılan çalışmadan elde edilen veriler Şekil 4.5 ve Şekil 4.6' da gösterilmektedir. Yüksek akım farkı ve doğrusallık göze alındığında 5 nm boyutundaki AuNP ile çalışılmasına karar verilmiştir. 10 nm boyutundaki AuNP ile çalışmada doğrusal bir grafik elde edilememiştir, ayrıca akım farkları daha düşüktür.



Şekil 4. 5: Farklı boyutlardaki AuNP ile hazırlanan biyosensörler ile elde edilen DPV sonuçları. 5 nm AuNP (A), 10 nm AuNP (B). Ölçümler 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 50 mM tamponda ve pH 7,0; 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.



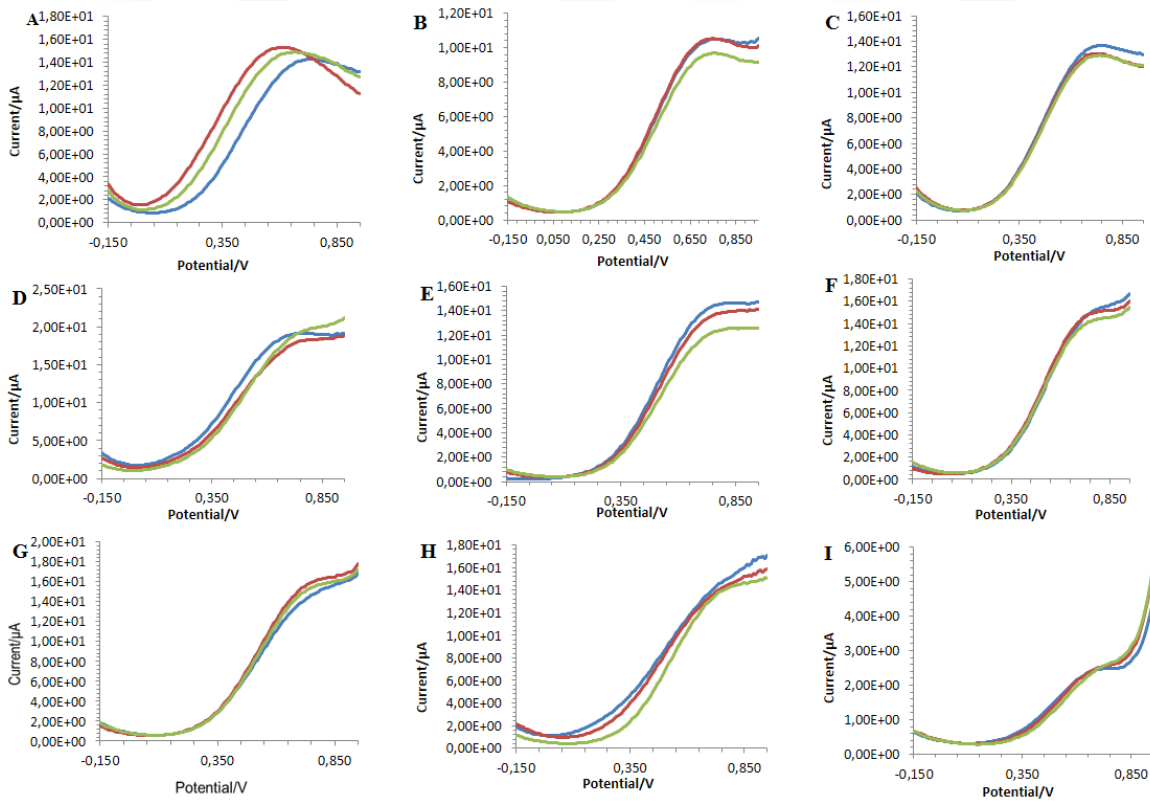
Şekil 4. 6: AuNP boyutu optimizasyon grafiği. Ölçümler 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 50 mM tamponda ve pH 7,0; 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada AuNP kullanılmasının en önemli amacı elektrodun iletkenliğini arttırmak ve ayrıca katalaz immobilizasyonu için sisteamin ve 3-MPA arasındaki bağlantıyı oluşturmaktır. Ayrıca AuNP, sisteaminin içerdiği tiyol grubuna kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar halinde bağlanarak immobilize edilir. Küçük boyuttaki AuNP'ler yüksek yüzey-hacim oranına sahiptir (Güney ve Küçüksarıyıldız, 2019). Bu özellik bağlanma kapasitesini artırır. Bu nedenle 5 nm boyutundaki AuNP immobilizasyon açısından daha avantajlıdır.

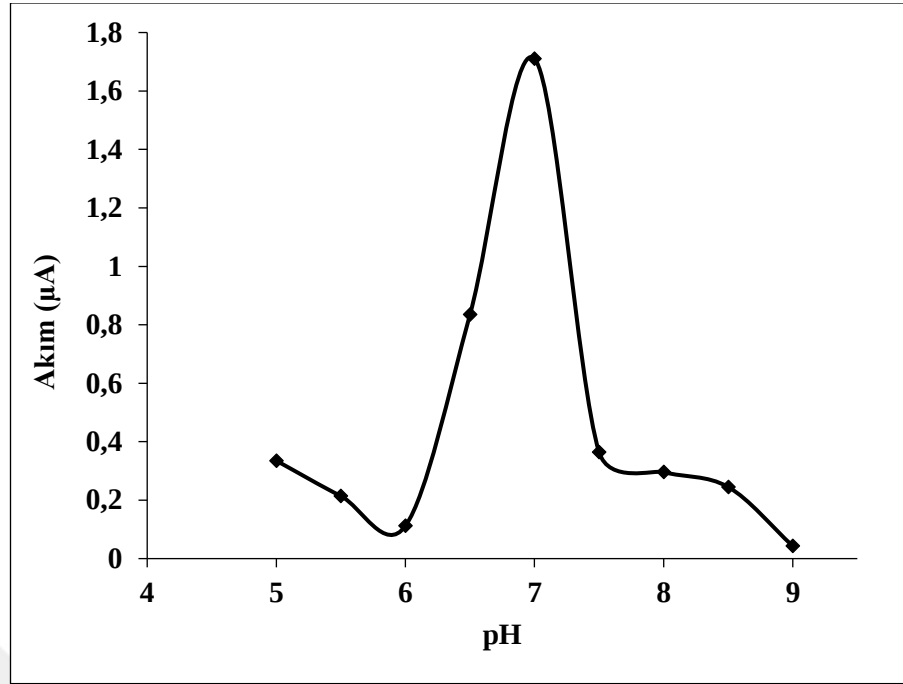
4.3. Sis/AuNP/3-MPA/Kat Enzim Temelli Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyon Çalışmalarından Elde Edilen Sonuçlar

4.3.1. Enzim temelli biyosensörün optimum pH değerine ilişkin deney sonuçları

Biyosensörün optimum pH değerinin belirlenmesi için yapılan deneylerden elde edilen veriler Şekil 4,7 ve Şekil 4,8'deki gibidir. Deney sonuçlarına göre katalaz enzim biyosensörünün optimum pH değeri 7,0 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4. 7: Enzim biyosensörü optimum pH çalışması için DPV sonuçları. A) pH: 5,0, B) pH: 5,5, C) pH: 6,0, D) pH: 6,5, E) pH: 7,0, F) pH: 7,5, G) pH: 8,0, H) pH: 8,5, I) pH: 9,0. Ölçümler 10 mM $K_4Fe(CN)_6$ mediatörlü, 50 mM fosfat tamponunda ve -0,15 V / +0,95 V potansiyelleri arasında alınan DP ölçümleri ile gerçekleştirildi.



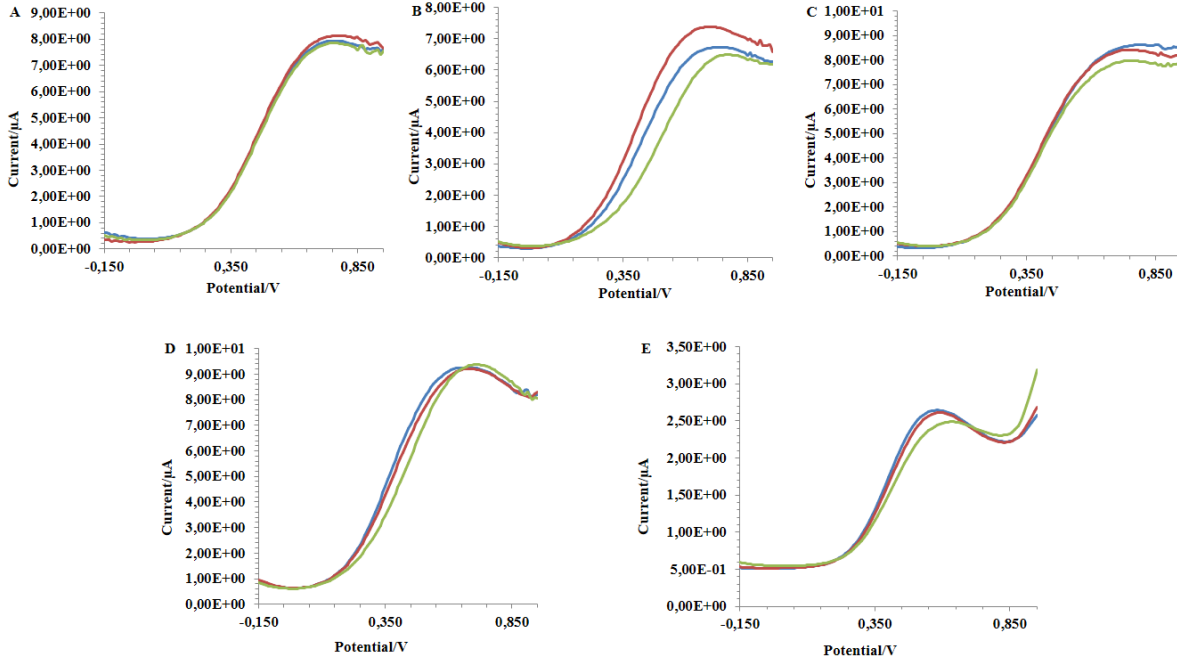
Şekil 4 8: Enzim biyosensörü için optimum pH grafiği. Ölçümler 10 mM $K_4Fe(CN)_6$ mediatörlü, 50 mM fosfat tamponunda ve -0,15 V / +0,95 V potansiyelleri arasında alınan DP ölçümleri ile gerçekleştirildi.

Grafikte de görüldüğü gibi pH:7,0'den daha düşük pH değerlerinde enzim aktivitesi optimuma göre düşüş gösterirken, pH:7,0'ye gelindiğinde aktivite en yüksek düzeye ulaşmaktadır; fakat pH:7,0'den daha yüksek değerlerde aktivitede hızlı bir düşüş gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde de katalaz enziminin optimum pH değerinin 7,0 olduğu görülmektedir (Maehly and Chanc; 1954, Çetinuz and Öztop, 2000).

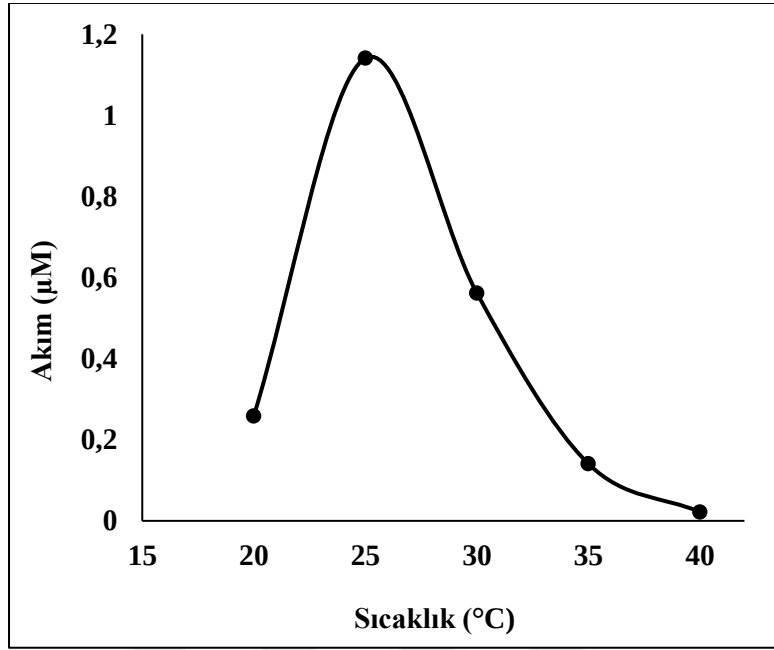
4.3.2. Enzim temelli biyosensörün optimum sıcaklığına ilişkin deney sonuçları

Biyosensör sistemlerinde optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Yüzey modifikasyonlarının bozulmaması ve biyoaktif bileşenin yüksek aktivite gösterebilmesi açısından optimum sıcaklıkta çalışmak gerekir. Bu çalışmada katalaz enzimi ile hazırlanan ve sırasıyla 20, 25, 30, 35, 40 ° C'de DPV

ile ölçüm alınan biyosensörün optimum sıcaklığı 25 ° C olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.8’de gösterilmektedir. Katalaz enziminin optimum sıcaklığı birçok çalışmada 37 ° C olarak belirlenmiştir ancak bazı çalışmalarda 25 ° C’de de yüksek aktivite gösterdiği görülmektedir. Bu sıcaklık farklanmasına immobilizasyon yönteminin etki ettiği söylenebilir (Aydemir et al., 2003; Çetinuz and Öztop, 2000)



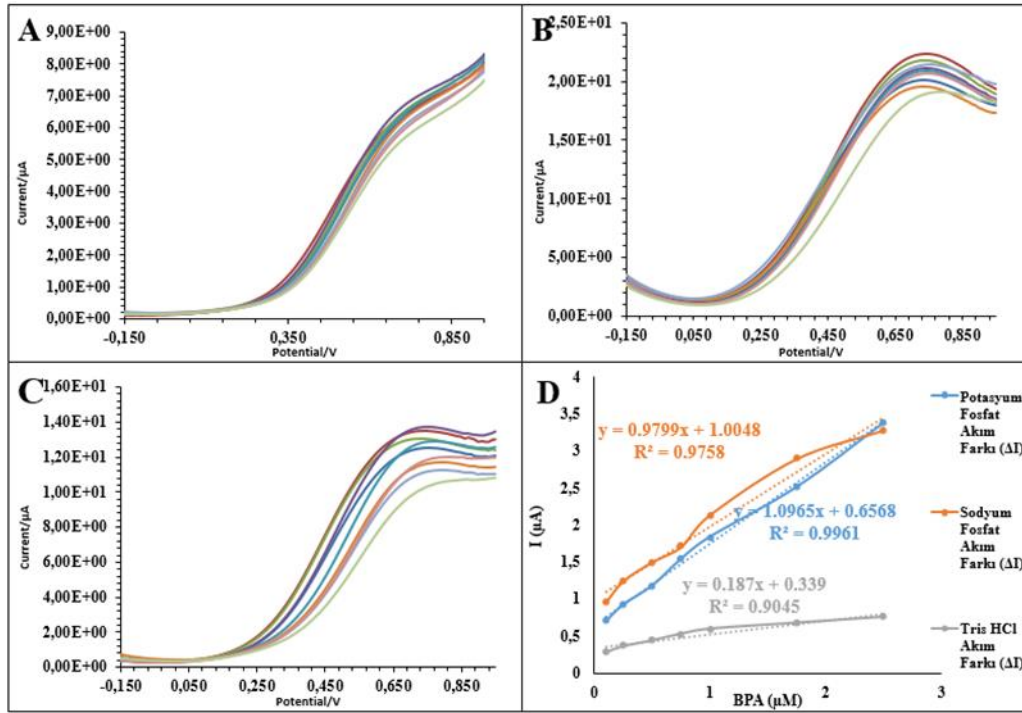
Şekil 4. 9: Enzim biyosensörünün optimum sıcaklık DPV sonuçları. A) 20 ° C, B) 25 ° C, C) 30 ° C, D) 35 ° C, E) 40 ° C. Ölçümler pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ ortamında -0,15 V & +0,95 V potansiyelleri arasında alınan DP yöntemi ile gerçekleştirildi.



Şekil 4. 10: Enzim biyosensörünün optimum sıcaklık grafiği. Ölçümler pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ ortamında -0,15 V & +0,95 V potansiyelleri arasında alınan DP yöntemi ile gerçekleştirildi.

4.3.3. Farklı Tamponlardaki Ölçüm Sonuçları

Tampon türünü belirlemek için aynı konsantrasyonlarda hazırlanan potasyum fosfat, sodyum fosfat ve Tris-HCl tamponları ile $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren ortamlarda DPV yöntemiyle elde edilen ölçüm sonuçları Şekil 4.9'da verilmiştir. Grafikte görüldüğü gibi potasyum fosfat tamponu hem doğrusal olarak artmış hem de yüksek akım değerleri ile cevap vermiştir. Bu nedenle bu çalışmada tampon sistemi olarak potasyum fosfat tamponu seçilmiştir.



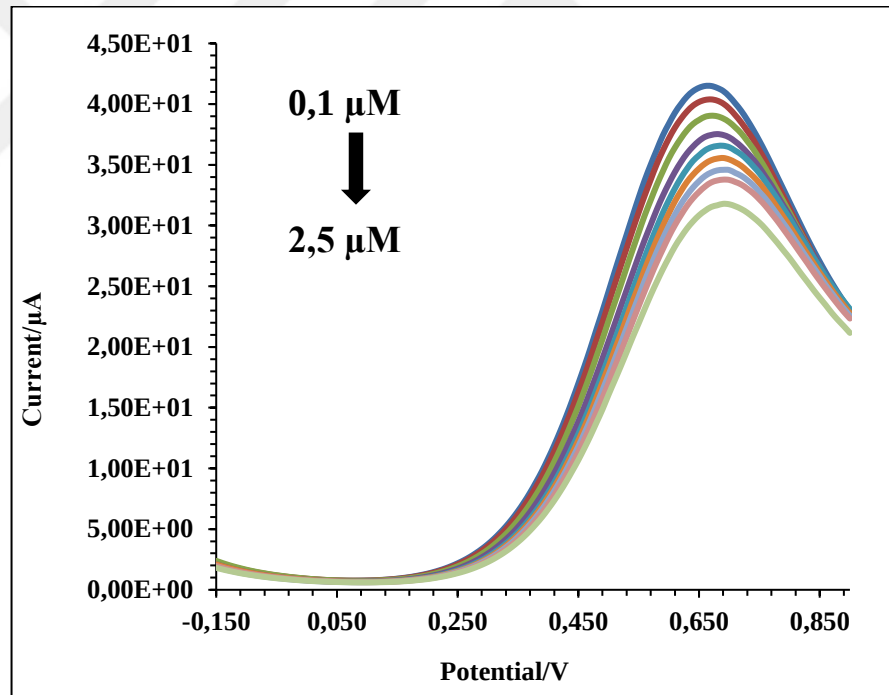
Şekil 4.11: Enzim biyosensörünün farklı tamponlardaki çalışmalarından elde edilen DPV sonuçları ve buna bağlı çizilen standart grafikler. Tris-HCl Tamponu (A), Sodyum Fosfat Tamponu (B), Potasyum fosfat tamponu (C) ve Standart grafikler (D). Ölçüm 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 50 mM tamponda ve pH 7,0; 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

Tampon sistemini seçerken göz önünde bulundurulması gereken birçok faktör vardır. Enzimle çalışırken, enzimin optimum pH'ını, enzim üzerindeki spesifik olmayan tampon etkilerini ve substratlar veya metallerle etkileşimleri göz önünde bulundurmak gerekir. Tris- HCl tamponu organiktir. Fosfat tamponuna göre daha kararlı olması ve enzimatik reaksiyonlarda inert olması gibi önemli avantajları vardır. Ancak oldukça duyarlı bir tampondur ve sıcaklık değişimlerinden etkilenebilir. Yapısında primer amin grubu bulundurduğu için reaktiftir. Ayrıca pH 7,5 altında yapılan çalışmalarda oldukça zayıftır. Fosfat tamponu ise reaktif gruplara sahip değildir, sıcaklık değişimlerinden de kolayca etkilenmez (Stoll and Blanchard, 1990).

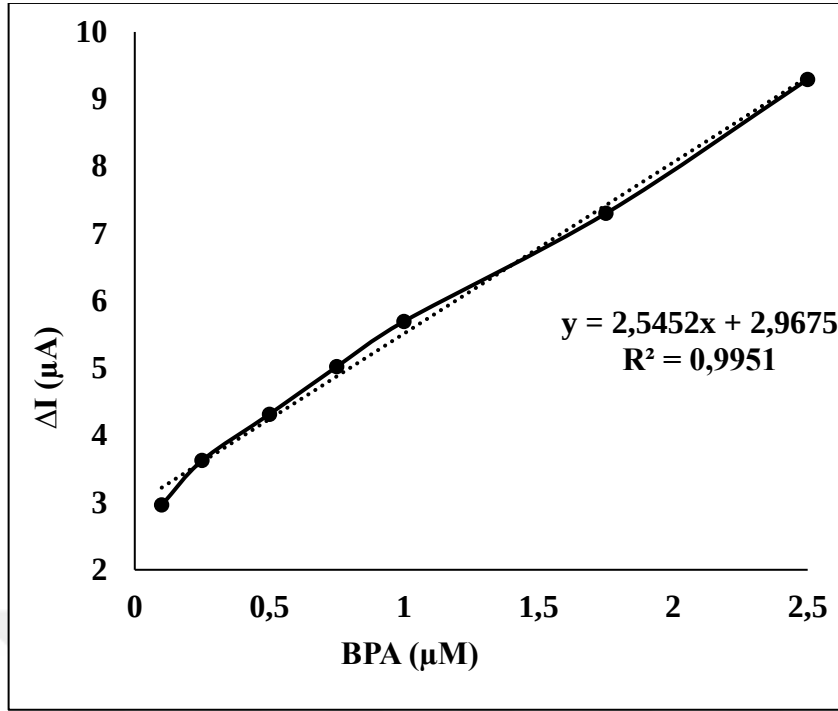
4.4. Sis/AuNP/3-MPA/Kat Enzim Temelli Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmalarına Yönelik Sonuçlar

4.4.1. Sis/AuNP/3-MPA/Kat biyosensörünün doğrusal tayin aralığı sonuçları

Tasarlanan katalaz biyosensörü ile BPA için doğrusal tayin aralığı belirlenmiştir. pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ ortamında -0,15 V & +0,95 V potansiyelleri arasında DP voltammogramları alınmıştır. Bu çalışmalarda elde edilen DP voltammogramları Şekil 4.10 ve standart grafik Şekil 4.11’ de gösterilmiştir. Grafiklerde de görüldüğü üzere BPA için doğrusal tayin aralığı: 0,25- 2,5 μ M olarak bulunmuştur.



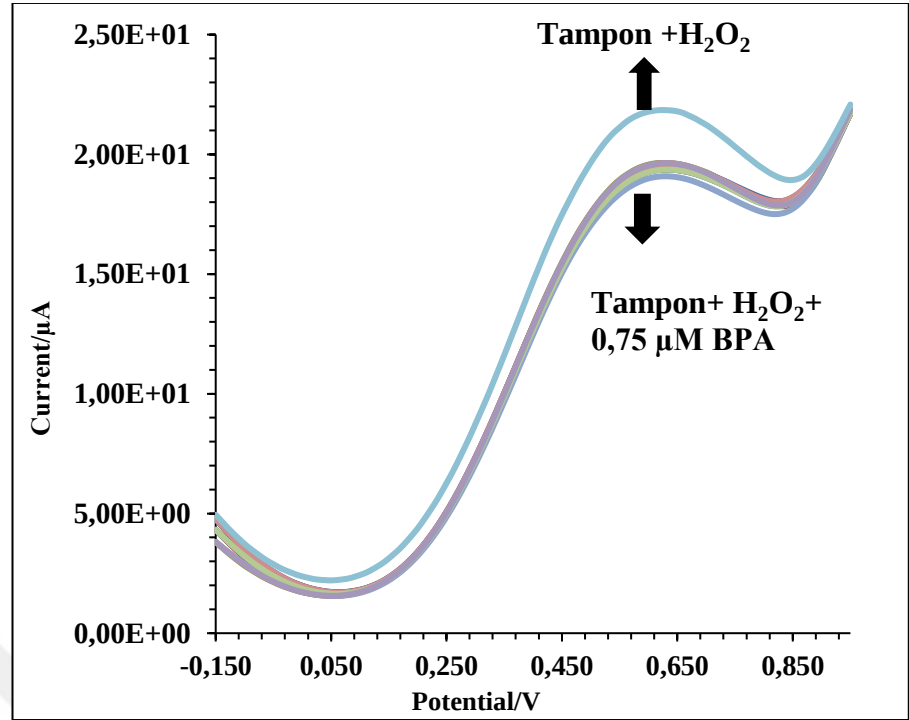
Şekil 4. 12: Enzim temelli biyosensörün doğrusal tayin aralığının belirlenmesi. Bulunan sonuçlar yukarıdan aşağıya; baseline, 0,1 μ M, 0,25 μ M, 0,5 μ M, 0,75 μ M, 1 μ M, 1,75 μ M, 2,5 μ M BPA için pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ ve 500 μ M H_2O_2 içeren ortamda -0,15 V & +0,95 V potansiyelleri arasında 25 °C sabit sıcaklıkta alınmıştır.



Şekil 4. 13: Katalaz enzimi biyosensörünün BPA için doğrusal tayin aralığı. Ölçümler pH: 7,0; 50 mM fosfat tamponunda 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ ortamında - 0,15 V & + 0,95 V potansiyel aralığında ve 25 °C sabit sıcaklıkta alınmıştır.

4.4.2. Sis/AuNP/3-MPA/Kat biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen sonuçlar

Enzim biyosensörünün tekrarlanabilirliğini belirlemek için yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Hazırlanan biyosensör ile 0,75 μM BPA için elde edilen 10 ölçümün ortalaması 0,756 μM, standart sapma $\pm 0,769$ μM ve % varyasyon katsayısı da % 1,31 olarak bulunmuştur. Bulunan sonuçlara bakıldığında varyasyon katsayısının düşük çıkması hazırlanan biyosensörün yüksek tekrarlanabilirlikte olduğunu göstermektedir.



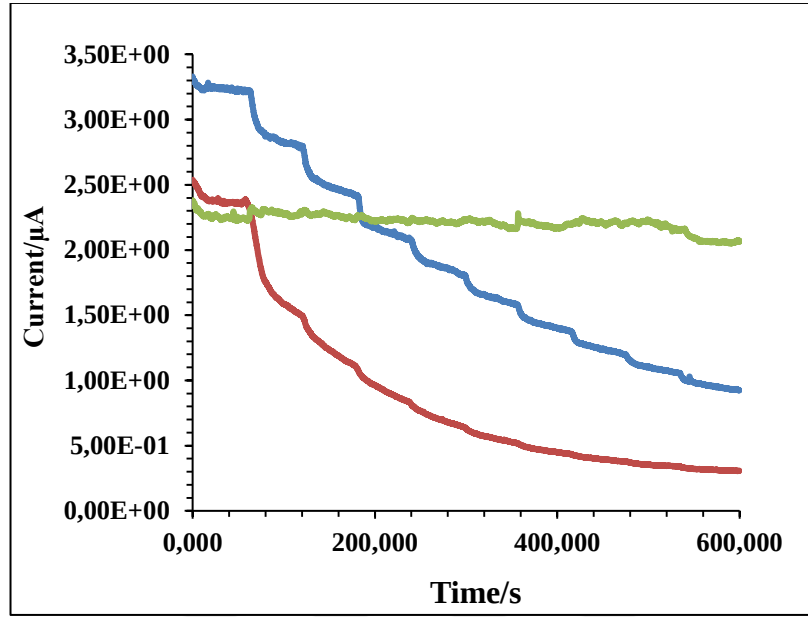
Şekil 4. 14: Enzim biyosensörünün tekrarlanabilirliğinin incelenmesi amacıyla yapılan DPV sonuçları. Ölçümler; pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ ortamında -0,15 V & +0,95 V potansiyel aralığında ve 25 °C sabit sıcaklıkta alınmıştır.

Tablo 4. 1: Tasarlanan biyosensörde BPA ve H_2O_2 için gözlenen tekrarlanabilirlik değerleri.

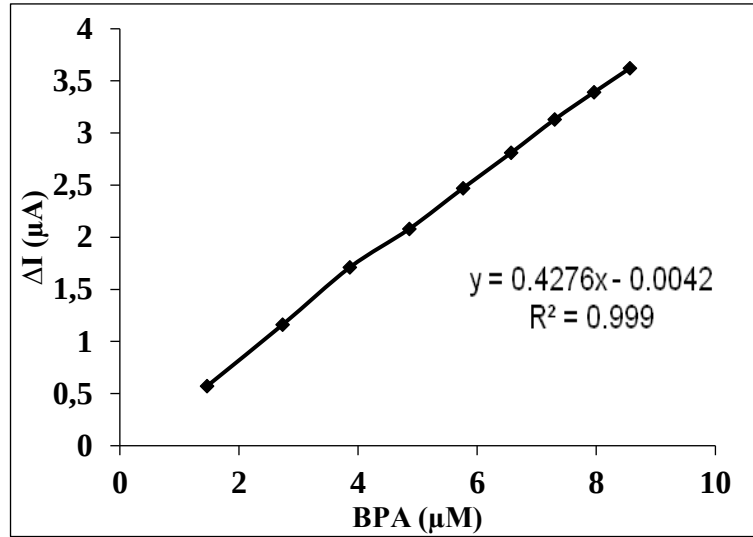
Deneme Sayısı	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Ort. Değ. ($\bar{x}$)	Std. Sapma. ($\pm S.S$)	Var. Kts. (%V.K)
Ölçülen BPA Konsantr. (μM)	0.758	0.769	0.765	0.746	0.749	0.752	0.762	0.757	0.745	0.756	0.756	0.769	1.31

4.4.3. Sis/AuNP/3-MPA/Kat enzim temelli biyosensörünün amperometri sonuçları

Bu çalışmada BPA'nın spesifik tayinini DPV metodu haricinde amperometrik olarak da yapmak amacı ile amperometrik ölçümler gerçekleştirildi. Alternatif bir metot olan amperometri çalışmasıyla elde edilen sonuçlar Şekil 4.13 ve 4.14'te gösterilmiştir. BPA'nın ve H_2O_2 'nin etkilerini gözlemlemek için ayrı ayrı ölçümler alınmıştır. H_2O_2 içeren ortama 60 sn'de bir BPA enjekte edildiğinde akım farkının düzenli bir şekilde arttığı görülmektedir. Bu farklanmalarla çizilen standart grafik lineerdir. Sonuçların genelinde bakıldığında, DPV çalışmalarında maksimum akım değerlerinin 0,65 & 0,85 V potansiyel aralıkta elde edildiği görülmektedir. Bu çalışma 0,8 V sabit potansiyelde yapılmıştır. Sadece tampon içeren çalışma hücresine 60 sn'de bir H_2O_2 enjekte edildiğinde düzensiz ve belirsiz akım farklanmaları olmuştur. H_2O_2 içermeyen ortama 60 sn'de bir BPA enjekte edildiğinde ise beklenildiği gibi akım ilk enjeksiyon sonrası birden düşmüştür. Artan BPA konsantrasyonu ile akım düşüşü devam etmiştir ancak belirgin ve düzenli akım farklanmaları görülmemiştir. Bu çalışma sayesinde H_2O_2 ve BPA arasındaki etkileşim açıkça görülmüştür. Hazırlanan katalaz elektrodu amperometri çalışması için 0,8 V potansiyelde oldukça uygundur.



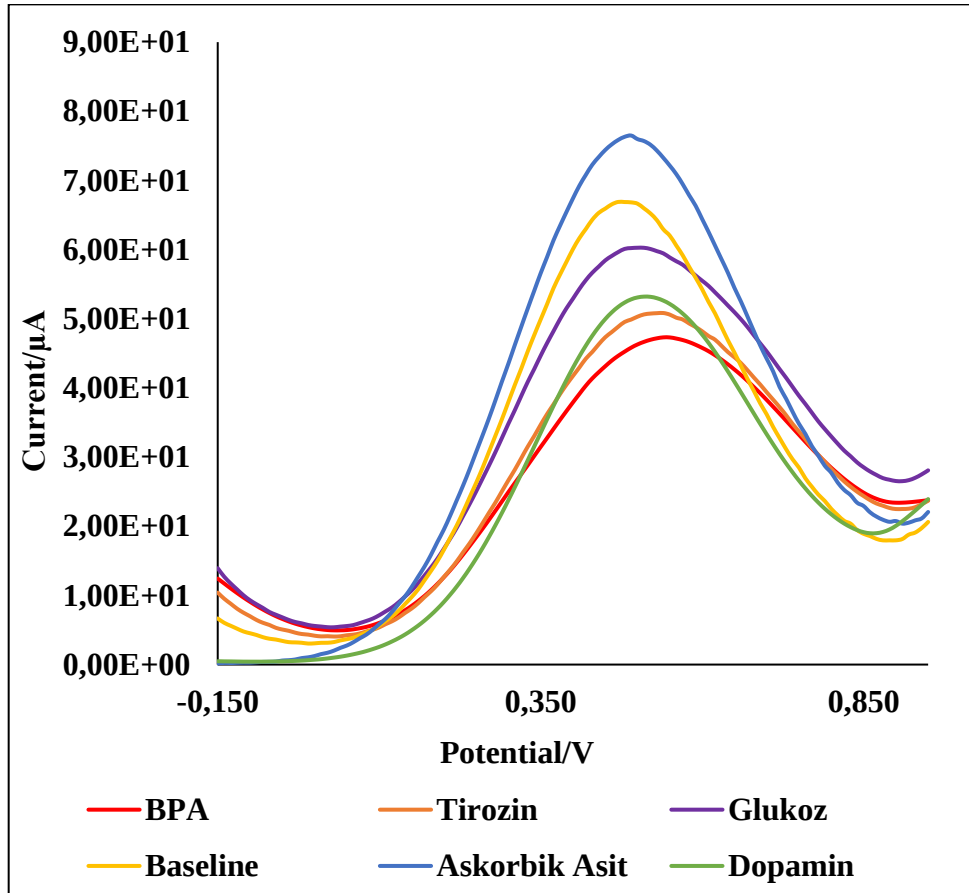
Şekil 4. 15: Enzim biyosensörünün amperometrik ölçüm sonuçları. Ölçümler 0,8 V sabit potansiyelde alınmıştır. Mavi: H_2O_2 içeren ortama 60 sn'de 1 ml BPA eklenerek alınan amperometri sonucu, Kırmızı: H_2O_2 içermeyen ortamda 60 sn'de 1 ml BPA eklenerek alınan sonuç, Yeşil: Sadece tampon içeren ortama 60 sn'de 1 ml H_2O_2 eklenerek alınan sonuç.



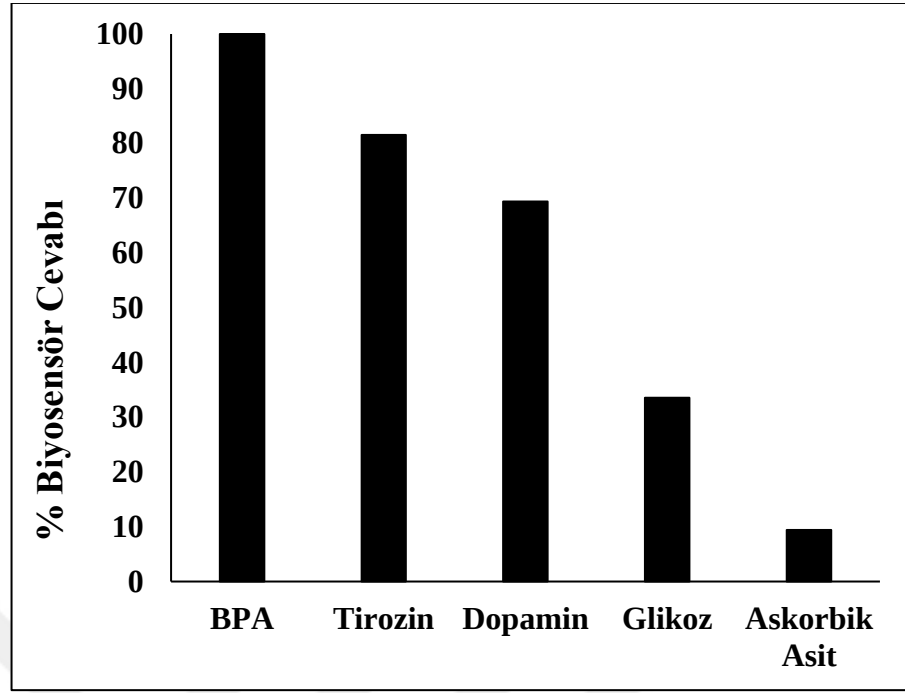
Şekil 4. 16: Enzim biyosensörünün amperometrik ölçüm sonuçları akım farkı-BPA konsantrasyonu standart grafiği. Ölçümler; pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ortamında 0,8 V sabit potansiyelde ve 25 °C sabit sıcaklıkta alınmıştır.

4.4.4. Sis/AuNP/3-MPA/Kat enzim temelli biyosensörünün substrat spesifikliğı sonuçları

Tirozin, glukoz, askorbik asit ve dopamin ile yapılan substrat spesifikliğı sonuçları Şekil 4.14'te verilmiştir. BPA ile elde edilen akım farkı % 100 kabul edilerek tüm çözeltiler için % biyosensör cevabı ile kıyaslanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.16'da gösterilmiştir. Sonuçlara bakıldığında BPA'nın H_2O_2 ve katalaz enzimi ile yapılan çalışmada en yüksek akım farklanmasını gösterdiği görülmektedir.



Şekil 4. 17: Enzim biyosensörüne ait substrat spesifikliğı DPV sonuçları. Ölçümler; pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ ortamında -0,15 V & +0,95 V potansiyel aralığında ve 25 °C sabit sıcaklıkta alınmıştır.



Şekil 4. 18: Katalaz biyosensörüne ait substrat spesifikliğı grafiğı. Ölçümler; pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ ortamında -0,15 V & +0,95 V potansiyel aralığında ve 25 °C sabit sıcaklıkta alınmıştır.

Dopamin ve tirozinin akım farkları birbirine yakın çıkmıştır. Dopamin, tirozin amino asidinden oluşur. Bu maddelerin oksidasyon potansiyelleri birbirine yakındır (Rahman et al., 2015). Moleküler yapı olarak da bu iki molekül BPA'ya benzerlik gösterdikleri için BPA'ya yakın düzeyde bir inhibisyon etkisi göstermişlerdir.

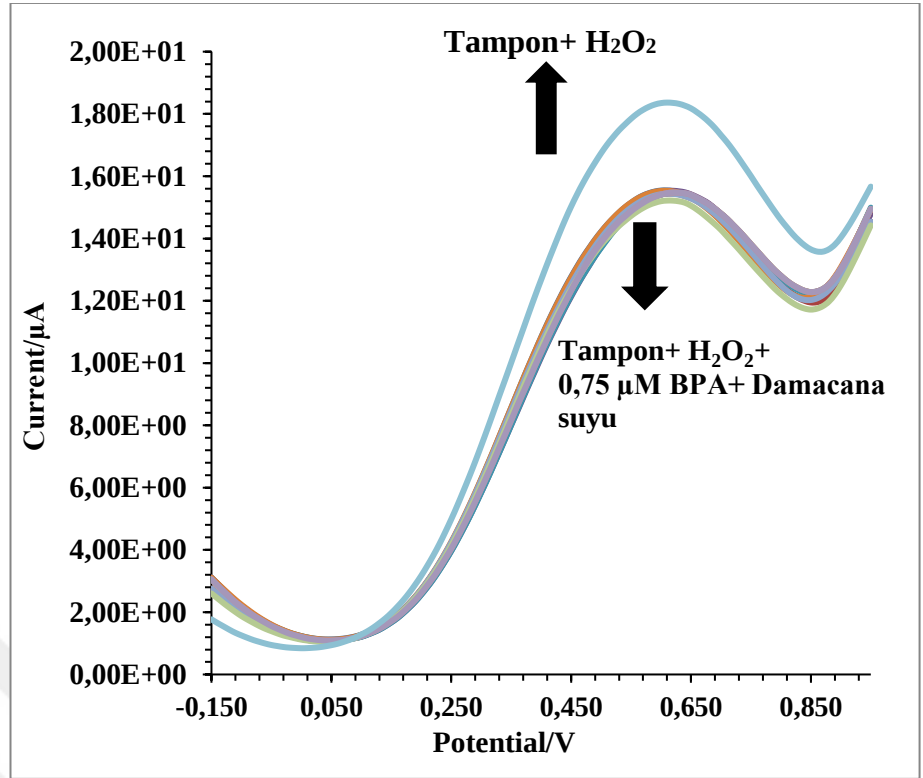
Askorbik asit mükemmel bir indirgeyici ajandır. Serbest radikallerin nötralizasyonunu sağlamasıyla yüksek antioksidan aktivitesine sahip olmasıyla bilinir. Enzim kofaktörü ve antioksidan görevi görür. Hücre metabolizmasında oluşan ve çeşitli doku hasarı ve hastalıkları ile ilişkili olan toksik serbest radikalleri ve diğer reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırma kapasitesine sahiptir. Hücreleri reaktif oksijen türlerinden korur, H_2O_2 'yi parçalar (Gazdik et al., 2008). BPA gibi inhibitör görevi göstermediğı için daha fazla H_2O_2 parçalanmasını sağlamış ve yüksek akım değeri elde edilmiştir.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, glukoz tayini için genellikle glukoz oksidaz enzimi kullanılmıştır. Glukoz oksidaz enzimi glukozu H_2O_2 ve glukonolaktone parçalar. Birçok çalışmada katalaz- glukoz oksidaz birlikte kullanılmıştır. Katalazın bu çalışmalardaki görevi, glukoz oksidaz tarafından açığa çıkarılan H_2O_2 'yi parçalayarak etkisiz hale getirmektir (Tao et al., 2009). Bu çalışmada glukozun akım farkı oldukça yüksektir. Nedeni, katalaz yüksek miktarda H_2O_2 'yi parçalayarak daha fazla elektron açığa çıkmasını sağlayabilmiştir. Sonuca göre bu elektrodun glukoz tayini için uygun olmadığı görülmektedir.

Son olarak görüldüğü gibi BPA en düşük akım pikini vererek en yüksek akım farklanmasına neden olmuştur. Bunun nedeni BPA'nın katalaz enzimi ile hidrojen bağı yaparak inhibitör etkisi göstermesi ve daha az H_2O_2 'nin parçalanmasıdır. Bu çalışma için en belirgin substrat BPA'dır.

4.4.5. Sis/AuNP/3-MPA/Kat biyosensörü ile örnek tayinine yönelik yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar

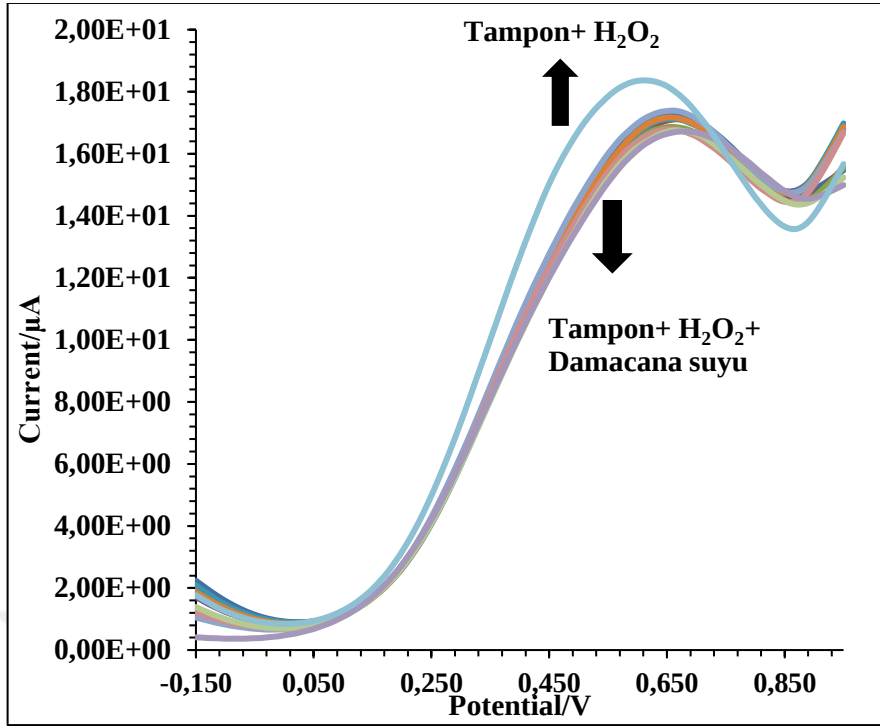
Enzim biyosensörü ile örnek tayini için yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.2'de ve Tablo 4.3'de gösterilmiştir. Hazırlanan biyosensör ile (damacana su, BPA ve 500 μM H_2O_2) için elde edilen 10 ölçümün ortalaması 0,9605 μM , standart sapma $\pm 0,0328$ ve % varyasyon katsayısı da % 3,4215 olarak bulunmuştur. Sadece (damacana su ve 500 μM H_2O_2) için elde edilen 8 ölçümün ortalaması 0,118875 μM , standart sapma $\pm 0,0075487$ ve % varyasyon katsayısı da % 6,350075 olarak bulunmuştur.



Şekil 4. 19: Enzim biyosensörünün damacana suyu ve BPA tayini için tekrarlanabilirliğinin incelenmesi amacıyla yapılan DPV sonuçları. Ölçümler; pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ ortamında +0,15 V & +0,95 V potansiyel aralığında ve 25 °C sabit sıcaklıkta alınmıştır.

Tablo 4. 2: Tasarlanan biyosensörde damacana suyu, BPA ve H_2O_2 için gözlenen tekrarlanabilirlik değerleri.

Deneme Sayısı	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Ort. Değer ($\bar{x}$)	Std. Sapma ($\pm S.S$)	Var. Kat. (%V.K)
Ölçülen BPA Konsant. (μM)	0,925	0,944	0,922	0,926	0,998	0,997	0,987	0,980	0,934	0,992	0,9605	0,0328	3,4215



Şekil 4. 20: Enzim biyosensörünün sadece damacana suyu için tekrarlanabilirliğinin incelenmesi amacıyla yapılan DPV sonuçları. Ölçümler; pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ ortamında +0,15 V & +0,95 V potansiyel aralığında ve 25 °C sabit sıcaklıkta alınmıştır.

Tablo 4. 3: Tasarlanan biyosensörde damacana suyu ve H_2O_2 için gözlenen tekrarlanabilirlik değerleri.

Deneme Sayısı	1	2	3	4	5	6	7	8	Ort. Değer ($\bar{x}$)	Std. Sapma ($\pm S.S$)	Var. Katsayısı (% V.K)
Ölçülen BPA Konsantrasyon (μM)	0,115	0,127	0,109	0,124	0,123	0,115	0,11	0,128	0,118875	0,0075487	6,350075

Damacana suyu ile yapılan çalışmada konsantrasyon değerleri $0,75 \mu M$ 'ın altında çıkmıştır. Damacana suyun etkisini gözlemleyebilmek için damacana suyu ve BPA ile birlikte çalışma yapılmıştır. Bu verilerde konsantrasyon değeri $0,75 \mu M$ 'ın beklenildiği gibi üstünde çıkmıştır. Ortalama 0,9605 çıkan konsantrasyon değerine bakarak damacana suda BPA tayini yapılabildiği görülmüştür.

5. BPA TAYİNİNEYÖNELİK GELİŞTİRİLEN Sis/AuNP/3-MPA/Kat MODİFİYE ENZİM TEMELLİ BİYOSENSÖRÜN BAZI BİYOSENSÖRLERLE KIYASLANMASI

Tablo 5. 1: BPA tayini için geliştirilmiş enzim temelli elektrokimyasal biyosensörlerle ilgili çalışmalar

Enzim	Tayin Limiti	Lineer Aralık	Cevap Süresi	Referans
KPE/Tiyonin/ Tirozinaz	0,15 μM	0,15 - 0,45 μM	200 saniye	Portaccio et al., 2010
PAMAM/Sal/Pt (II)/ Tirozinaz	0,001 μM ,	0,01 μM – 1,0 μM	200 saniye	Koçak, 2020
GCE/SF/MWNT/ CoPc/ Tirozinaz	0,03 μM	0,05 - 3×10^{-4} μM	-	Yin et al., 2010
SPE/NiNPs/SPCE/ Tirozinaz	7,1 μM	0,91 - 48 μM	40 saniye	Alkasir et al., 2010
GCE/Grafen/ Cu/Fe ₃ O ₄ / Lakkaz	1,7 μM	7,2–18 μM	-	Lou et al., 2019
SWCN/Tirozinaz	0,02 μM	0,1–12 μM	6 dakika	Mita et al., 2007
C-SPE/Ag-ZnO NPs/ MWCNTs/Lakkaz	0,08 μM	0,5 – 2,99 μM	-	Kunene, 2018
GCE/Kitosan/Tirozinaz	0,012 μM	0,05 – 0,2 μM	<10 saniye	Wu et al, 2020
SPE/Tiyonin/CB/Lakkaz	0,2 μM	0,5 – 50 μM	-	Portaccio et al., 2013
Sis/AuNP/3-MPA /Katalaz	0,16 μM	0,1 - 2,5 μM	22 saniye	Bu tez çalışması.

6. GENEL DEĞERLENDİRME

Biyosensörlerle ilgili çalışmaların sayısı gittikçe artmaktadır. Güvenilir ve spesifik, tekrarlanabilir sonuçlar almak, az maliyet, düşük tayin aralığı gibi avantajları tercih edilme nedenlerindendir. Genel çalışma prensipleri; biyolojik ve kimyasal sinyalleri dönüştürücü sayesinde ölçülebilir verilere dönüştürmektir.

Bisfenol A insan sağlığı için oldukça tehlikeli bir maddedir. Östrojene benzer kimyasal yapısı nedeniyle vücutta endokrin bozucu özelliği vardır. Günümüzde birçok alanda bu madde kullanılmaktadır. Gıda ambalajları, su şişeleri, damacnalar, tekrar kullanılabilir plastik kaplar başta olmak üzere birçok ürünün yapımında hammadde olarak kullanılmaktadırlar. Vücut için günlük alım limiti 0.05 mg/kg vücut ağırlığı/gündür. Daha fazlası toksik etkilere neden olabilmektedir. Herhangi bir maddeden gıdaya geçişine izin verilen maksimum BPA miktarı ise 0,6 mg/kg olarak belirlenmiştir.

Bisfenol A'nın elektrokimyasal yöntemlerle tayinini gerçekleştirmek amacıyla sisteamin, 3-MPA, AuNP, EDC-NHS, katalaz kullanılarak alternatif bir biyosensör geliştirilmiştir. Karbon pasta elektrot yüzeyine sırasıyla bu kimyasallar immobilize edilmiş ve Sis/AuNP/3-MPA/Kat enzim temelli biyosensörü elde edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, BPA'nın katalaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi ile H_2O_2 içeren ortamda yapılan çalışmalardaki akım farklanmaları sayesinde BPA tayini yapılmıştır. BPA konsantrasyonu arttırıldığında akım farkının da arttığı görülmüştür. Çalışmalar için DPV yöntemiyle -0,15 V & +0,95 V potansiyel aralıkta, 25 °C sıcaklıkta ve pH 7,0 potasyum fosfat tamponunda ölçüm yapılmıştır.

Sonuç olarak, BPA için doğrusal tayin aralığı 0,25 - 2,5 μM 'dır. Tekrarlanabilirlik çalışmaları sonrası 0,75 μM BPA için yapılan 10 ölçüm ile ortalama değer ($\bar{x}$)= 0,756 μM , standart sapma (S.S.)= $\pm 0,769 \mu\text{M}$ ve % varyasyon katsayısı (%V.K.)= % 1,31 olarak bulunmuştur. Biyosensörün cevap süresi potansiyel aralık (mV)/ saniye (s) formülü ile hesaplanarak 22 saniye olarak bulunmuştur. Diferansiyel puls voltammetrisi ile yapılan çalışmanın tayin limiti 0,16 μM ve amperometri çalışmasının tayin limiti 0,45 μM 'dir. Son olarak 6 ay boyunca bekletilmiş damaca suda BPA tayini için hazırlanan enzim temelli elektrotla ölçüm yapılmıştır. Ayrıca alternatif bir yöntemle çalışabilmek için kronoamperometri metoduyla 0,8 V sabit potansiyelde 60 saniyede bir çalışma hücresine BPA enjekte edilerek ölçüm alınmıştır.

Endüstride kullanımı oldukça yüksek olan ve endokrin bozucu bir molekül olan BPA'nın katalaz enzimi üzerine yaptığı inhibisyon etkisinden yararlanılarak duyarlı ve tekrarlanabilir düzeyde tayinleri gerçekleştirilmiştir. BPA tayinine yönelik olarak ilk defa geliştirilen bu biyosensör çalışması; gerek kullanılan immobilizasyon yöntemi, gerekse amaç, kapsam ve elde edilen sonuçları açısından orijinal olup bu alanda yapılacak çalışmalara yeni bilimsel bir bakış açısı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ali, I., Wakeel, A., Upreti, S., Liu, D., Azizullah, A., Jan, M., Ullah, W., Liu, B., Ali, A., Daud, M. K., Gan, Y.,** 2018, Effect of Bisphenol A-induced Oxidative Stress on the Ultra Structure and Antioxidant Defence System of *Arabidopsis thaliana* Leaves, *Pol. J. Environ. Stud.* Vol. 27, No. 3, 967-978 pp. 10.15244/pjoes/76038
- Alkasir, R., Ganesana, M., Won, Y., Stanciu, L., Andreescu, S.,** 2010, Enzyme functionalized nanoparticles for electrochemical biosensors: A comparative study with applications for the detection of bisphenol A, *Biosensors and Bioelectronics* Volume 26, Issue 1, 43-49 pp, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.05.001>
- Amjad, S., Rahman, M. S., Pang, M. G.,** 2020, Role of Antioxidants in Alleviating Bisphenol A Toxicity, *Biomolecules*, 10(8), 1105. <https://doi.org/10.3390/biom10081105>
- Arıksoysal, D.,** 2006, DNA’da meydana gelen bazı mutasyonların ve hibridizasyonun tayinine yönelik elektrokimyasal dna biyosensörlerin tasarımı, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Aydemir, T., Kuru, K., Çınar, S.,** 2003, Purification and Partial Characterisation of Catalase from Chicken Liver and the Inhibition Effects of Some Chemicals on the Enzyme Activity, *S.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi* Sayı 21 63-74 pp.
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., Estrela, P.,** 2016, Introduction to biosensors, *Essays Biochem.* 60(1): 1–8. 10.1042/EBC20150001
- Bhattarai, P., Hameed, S.,** 2020, Basics of Biosensors and Nanobiosensors, *Nanobiosensors: From Design to Applications*, First Edition.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chen, L. C., Wang, E., Tai, C. S., Chiu, C. Y., Li, W. C., Lin, Y. R., Lee, T. H., Huang, C. W., Chen, J. C., Chen, W. L.,** 2020, Improving the reproducibility, accuracy, and stability of an electrochemical biosensor platform for point-of-care use, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 155. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112111>
- Chen, X., Li, Q.W. and Wang, X. M.,** 2014, Gold nanostructures for bioimaging, drug delivery and therapeutics, 163-176 pp. 10.1533/9780857099051.2.163
- Chevion, S., Roberts, M. A., Chevion, M.,** 2000, The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity, *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 28, Issue 6, 860-870 pp. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00178-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00178-7)
- Cho, H., Kim, D. H., Pak, S.,** 2020, Electrochemical biosensors: perspective on functional nanomaterials for on-site analysis, *Biomater Res* 24, 6. <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0181-y>
- Çetinuz, Ş. A., Öztop, H.N.,** 2000, Immobilization of catalase on chitosan film, *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 26, Issue 7, 497-501 pp.
- D. Mita, A. Attanasio, F. Arduini, N. Diano, V. Grano, U. Bencivenga, S. Rossi, A. Amine, D.,** 2007, Enzymatic determination of BPA by means of tyrosinase immobilized on different carbon carriers, *Biosensors & Bioelectronics*, 23(1):60-65. DOI: 10.1016/j.bios.2007.03.010
- Erdem, Y. K.,** 2012, Migration of Bisphenol-A into the Natural Spring Water Packaged in Polycarbonate Carboys, *International Journal of Applied Science and Technology* Vol. 2 No. 1.
- Gagne, F.,** 2014, Oxidative Stress, *Biochemical Ecotoxicology*, 103-115 pp. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411604-7.00006-4>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Voros, J., Reimhult, E.,** 2008, Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures, 7;8(3):1400-1458. 10.3390/s80314000.
- Guy, O. J., Walker, K. A. D.,** 2016, Graphene Functionalization for Biosensor Applications, Silicon Carbide Biotechnology, 85-141 pp. 10.1016/B978-0-12-802993-0.00004-6
- Guzik, U, Hupert-Kocurek, K, Wojcieszynska, D.,** 2014, Immobilization as a strategy for improving enzyme properties-application to oxidoreductases, 19(7):8995-9018. 10.3390/molecules19078995
- Güney, B., Küçüksarıyıldız, H.,** 2019, Nano Altın Partikülleri ve Bazı Kullanım Alanlarına Genel Bir Bakış, *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7 1824-1833. 10.29130/dubited.561973
- Haleem, A., Jayaid, M., Singh, R. P., Suman, R., Rab, S.,** 2021, Biosensors applications in medical field: A brief review, *Sensors International*, Volume 2, 100100. <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2021.100100>
- Halliwell, B., Clement, M. V., Long, H. L.,** 2000, Hydrogen peroxide in the human body, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02197-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02197-9)
- Hsine, Z., Mlika, R.,** 2021, Novel Sensor Based on Nanocarbon Transducer Functionalized by Iron (III) Porphyrin for the Impedimetric Detection of Bisphenol A, 10.5772/intechopen.98560
- Industry Expert,** 2016, “Bisphenol-A – A Global Market Overview”, <https://industry-experts.com/verticals/chemicals-and-materials/bisphenol-a-a-global-market-overview> (Erişim tarihi 22 Ekim 2021)
- İyigündoğdu, İ., Üstündağ, A., Duydu, Y.,** 2020, Toxicological Evaluation of Bisphenol A and its Analogues, *Turk J Pharm Sci* 17(4):457-462. 10.4274/tjps.galenos.2019.58219

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jans, H., Hou, Q.,** 2011, Gold nanoparticle-enabled biological and chemical detection and analysis, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41, 2849–2866. 10.1039/c1cs15280g
- Jones, C. W.,** 1999, Applications of Hydrogen Peroxide and Derivatives, Cambridge, Chapter 1. 1-36 p.
- Kandahar, E., Smith, E. J., Goeltz, J. C.,** 2021, Beyond the Textbook: Introducing Undergraduates to Practical Electrochemistry, *J. Chem. Educ.*, 98, 10, 3263–3268. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.1c00155>
- Kang, J. H., Kondo, F., Katayama, Y.,** 2006, Human exposure to bisphenol A, *Toxicology*, 79–89 pp. doi:10.1016/j.tox.2006.06.009
- Karunakaran, C., Madasamy, T., Sethy. N. K.,** 2015, Enzymatic Biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 978-0-12-803100-1. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803100-1.00003-7>
- Kaushal, J., Mehandia, S., Singh, S., Raina, A., Arya, S. K.,** 2018, Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry, 192-199 pp. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.035>.
- Koçak, H.,** 2020, Bisfenol-A Tayini İçin Bir Biyosensör Hazırlanması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı (Yayımlanmamış).
- Korotkaya, E. V.,** 2014, Biosensors: Design, Classification, and Applications in The Food Industry, *Foods and Raw Materials* Vol. 2, No. 2. 10.12737/5476
- Krishnan, A.V., Stathis, P., Permuth, S.F., Tokes, L., Feldman, D.,** 1993, Bisphenol A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132 p, 2279–2286.
- Kunene, W. K.,** 2018, Fabrication Of Electrochemical Biosensors For The Determination of Phenolic Compounds By Experimental and Computational Methods, MSc Thesis, Applied Science in Chemistry in the Faculty of Applied Sciences at the Durban University of Technology (unpublished).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liu, X., Kokare, C.,** 2017, Chapter 11 - Microbial Enzymes of Use in Industry, *Biotechnology of Microbial Enzymes Production, Biocatalysis and Industrial Applications*, 267-298 pp. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X>
- Lou, C., Jing, T., Tian, J., Zheng, Y., Zhang, J., Dong, M., Wang, C., Hou, C., Fan, j., Guo, Z.,** 2019, 3-Dimensional graphene/Cu/Fe₃O₄ composites: Immobilized laccase electrodes for detecting bisphenol A, *Journal of Materials Research*, 34 (17), 2964-2975. doi:10.1557/jmr.2019.248
- Mabbott, G. A.,** 1983, An introduction to cyclic voltammetry, *J. Chem. Educ.*, 60, 9, 697. <https://doi.org/10.1021/ed060p697>
- Maehly, A. C ., Chanc, B.,** The Assay Of Catalases And Peroxidases, 1954, *Methods of Biochemical Analysis*, Volume1
- Marken F., Neudeck A., Bond A.M.,** 2010, Cyclic Voltammetry. In: Scholz F. et al. (eds) *Electroanalytical Methods*, Springer, Berlin, Heidelberg 57-106 pp. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02915-8_4
- Mehrotra, P.,** 2016, Biosensors and their applications – A review, *J Oral Biol Craniofac Res.* 6(2): 153–159. 10.1016/j.jobcr.2015.12.002
- Metz, C. M.,** 2016, Bisphenol A: Understanding the Controversy, Volume: 64 issue: 1, 28-36 pp. <https://doi.org/10.1177/2165079915623790>
- Michalowicz, J.,** 2013, Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation, 738-758 pp. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2014.02.003>
- Molina, A., Eduardo Laborda, E, Martinez-Ortiz, F., Bradley, D. F., Schiffrin, D. J., Compton, R. G.,** 2011, Comparison between double pulse and multipulse differential techniques, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Volume 659, Issue 1, 12-24 pp. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2011.04.012>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Monosik, R., Stredansky, M., Tkac, J.,** 2012, Application of Enzyme Biosensors in Analysis of Food and Beverages. *Food Anal. Methods* 5, 40–53 pp. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9222-4>
- Nguyen, H. H., Lee, S. H., Lee, U. J., Fermin, C. D., Kim, M.,** 2019. Immobilized Enzymes in Biosensor Applications. *Materials (Basel, Switzerland)*, 12(1), 121 p. <https://doi.org/10.3390/ma12010121>
- Otmer, K.,** 1981, Encyclopedia of Chemical Technology, Hydrogen-Ion Activity to Laminated Materials, Glass, Volume 13 Edition
- Öksüz, T., Özdal, T., Sahin-Yesilçubuk, N., Nilüfer-Erdil, N.,** 2012, Gıdalara Bisfenol A (BPA) Migrasyonu ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri, Akademik Gıda 10(3) 93-98.
- Pedziwiatr, P., Mikolajczyk, F., Zawadzki, D., Mikolajczyk, K., Bedka, A.,** 2018, Decomposition of hydrogen peroxide - kinetics and review of chosen catalysts, no. 26: 45-52 .45. [10.32933/ActaInnovations.26.5](https://doi.org/10.32933/ActaInnovations.26.5)
- Piao, X., Lu, Z., Li, Y., Yao, D., Sun, L., Wang, B., Ma, Y., Wang, L., Zhang, Y.,** 2019, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 221-117149. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117149>
- Pingarron, J. M., Yanez-Sedeno, P. and Gonzalez-Cortes, A.,** 2008, Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors, *Electrochimica Acta*, 53(19), 5848-5866. [10.1016/j.electacta.2008.03.005](https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.03.005)
- Pohanka, M., Skladal, P.,** 2008, Electrochemical biosensors – principles and applications, *J. Appl. Biomed.* 6: 57–64, ISSN 1214-0287.
- Portaccio, M., Tuoro, D.D., Arduini, F., Lepore, M., Mita, D.G., Diano, N., Mita, L., Moscone, D.,** 2010. A thionine-modified carbon paste amperometric biosensor for catechol and bisphenol A determination. *Biosensors Bioelectronics*, Volume 25, Issue 9.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Portaccio, M., Tuoro, D.D., Arduini, F., Moscone, D., Cammarota, M., Mita, D.G., Lepore, M.,** 2013. Laccase biosensor based on screen-printed electrode modified with thionine–carbon black nanocomposite, for bisphenol A detection. *Electrochim. Acta* 109, 340–347.
- Radwan, S.H., Azzazy, H.,** 2009, Gold nanoparticles for molecular diagnostics, *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 9:5, 511-524, 10.1586/erm.09.33
- Rahman, M. M., Lopa, N. S., Kim, K., Lee, J. J.,** 2015, Selective detection of l-tyrosine in the presence of ascorbic acid, dopamine, and uric acid at poly(thionine)-modified glassy carbon electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Volume 754, 87-93 pp. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2015.06.018>.
- Rocchitta, G., Spanu, A., Babudieri, S., Latte, G., Madeddu, G., Galleri, G., Nuvoli, S., Bagella, P., Demartis, M. I., Fiore, V., Manetti, R., Serra, P. A.,** 2016, Enzyme Biosensors for Biomedical Applications: Strategies for Safeguarding Analytical Performances in Biological Fluids, *Sensors (Basel)*. 16(6): 780. 10.3390/s16060780
- Sarkar, A., Sarkar, D. K., Amrutha, V., Dutta, K.,** 2019, An overview of enzyme-based biosensors for environmental monitoring, *Tools, Techniques and Protocols for Monitoring Environmental Contaminants*, 307-329 pp. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814679-8.00015-7>
- Sharma, I., Ahmad, P.,** 2014, Chapter 4 - Catalase: A Versatile Antioxidant in Plants, *Oxidative Damage to Plants*, 131-148 pp. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00004-6>
- Srivastava, K. R., Awasthi, S., Mishra, K. P., Srivastava, P. K.,** 2020, Chapter 13 - Biosensors/molecular tools for detection of waterborne pathogens, *Waterborne Pathogens Detection and Treatment*, 237-277 pp. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818783-8.00013-X>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Stoll, S., Blanchard, J. S.,** 1990, Buffers: Principles and Practice, Methods In Enzymology, Vol. 182, 24 p.
- Subramanya, N.,** 2007, Biodegradation of Bisphenol A and Ibuprofen by Ammonia Oxidizing Bacteria, MSc Thesis, Civil Engineering, Texas A&M University (unpublished).
- Svancara, I., Hvizdalova, M., Vitras, K., Kalcher, K., Novotny, R.,** 1996, A Microscopic Study On Carbon Paste Electrodes, Electroanalysis, Volume 8 Issue 1, 61-65 pp. <https://doi.org/10.1002/elan.1140080113>
- Svancara, I., Vytras, K., Kalcher, K., Walcarius, A., Wang, J.,** 2008, Carbon Paste Electrodes in Facts, Numbers, and Notes: A Review on the Occasion of the 50-Years Jubilee of Carbon Paste in Electrochemistry and Electroanalysis, *Electroanalysis* 21(1):7 – 28. [10.1002/elan.200804340](https://doi.org/10.1002/elan.200804340)
- Svorc, J., Miertus, S., Katrlík, J., Stredansky, M.,** 1997, Composite transducers for amperometric biosensors. The glucose sensor, *Anal Chem*, 1;69(11):2086-90. [10.1021/ac9609485](https://doi.org/10.1021/ac9609485).
- Tao, Z., Raffel, R. A., Souid, A. K., Goodisman, J.,** 2009, Kinetic Studies on Enzyme-Catalyzed Reactions: Oxidation of Glucose, Decomposition of Hydrogen Peroxide and Their Combination, *Biophysical Journal*, Volume 96, Issue 7, 2977-2988 pp. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.11.071>
- Tetyana, P., Shumbula, P. M., Njengele-Tetyana, Z.,** 2021, Biosensors: Design, Development and Applications, Nanopores, [10.5772/intechopen.97576](https://doi.org/10.5772/intechopen.97576)
- Thevenot, D. R., Toth, K., Richard A. Durst, R. A., Wilson, G. S.,** 2001, Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification, *Biosensors & Bioelectronics* 16 121–131. [S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4)
- Tokuçcu, S.,** 2020, *Aspergillus versicolor*'ın Ağır Metal Tayininde Biyosensör Materyali Olarak Kullanımının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı (Yayımlanmamış).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tothill, I. E., Turner, A. P. F.**, 2003, Biosensors, Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition Second Edition, 489-499 pp. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01374-2>
- Tüylek, Z.**, 2012, Biyosensörler ve Nanoteknolojik Etkileşim, *BEÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 6(2), 71-80.
- Usta, H.**, 2016, Grafting Of Poly(Acrylamide) Onto Crosslinked Poly(Hema-Co-Mma) Resin For Removal Of Phenol And Bisphenol A, MSc Thesis, Istanbul Technical University, Science Engineering And Technology, 38 s (unpublished).
- Veal, E.A., Day, A. M. and Morgan, A. M.**, Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling, 2007, Volume 26, Issue 1. 10.1016/j.molcel.2007.03.016
- Vitras, K., Svancara, I., Metelka, R.**, 2009, Carbon paste electrodes in electroanalytical chemistry, *J. Serb. Chem. Soc.* 74 (10) 1021–1033 JSCS–3896. 10.2298/JSC0910021V
- Wang, H., W., Bringans, C., Hickey, A. J. R., Windsor, J.A., Kilmartin, P.A., Phillips, A. R. J.**, 2021, Cyclic Voltammetry in Biological Samples: A Systematic Review of Methods and Techniques Applicable to Clinical Settings, *Signals* 2, no. 1: 138-158. <https://doi.org/10.3390/signals2010012>
- Wang, s., Tian, J.**, 2016, Recent advances in counter electrodes of quantum dot-sensitized solar cells, RSC Advances, China
- Wu, L., Lu, X., Niu, K., Dhanjai, 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* Volume 165, 112407, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112407>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wu, Q.S., Zou, Z. N., Abd-Allah, E. F.,** 2014, Mycorrhizal Association and ROS in Plants, *Oxidative Damage to Plants*, 453-475 pp.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00015-0>
- Yılmaz, S.,** 2012, Uygulama örnekleriyle Elektro Analitik Kimya, Kriter Yayınları, 2. Baskı, İstanbul
- Yin, H., Zhoua, Y., Xua, J., Ai, S., Cui, L., Zhu, L.,** 2010, Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized onto multiwalled carbon nanotubes-cobalt phthalocyanine-silk fibroin film and its application to determine bisphenol A, *Analytica Chimica Acta* 659 144–150.
- Yu, X., Jiao, Y. And Chai, Q.,** 2016, Applications of Gold Nanoparticles in Biosensors, *Nano LIFE*, Vol. 06, No. 02, 1642001.
<https://doi.org/10.1142/S1793984416420010>
- Zhang, J. L., Wang, Y H., Huang, K., Huang, K. J., Jiang, H., Wang, X. M.,** 2021, Enzyme-based biofuel cells for biosensors and in vivo power supply, *Nano Energy*, Volume 84, 105853.
<https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2021.105853>
- Zhang, X.,** 2015, Gold Nanoparticles: Recent Advances in the Biomedical Applications, 72(3):771-5. 10.1007/s12013-015-0529-4

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen, her konuda yardımcı olan, verimli bir şekilde eğitimimi tamamlamamı sağlayan saygı değer hocam Sayın Prof. Dr. Erol AKYILMAZ'a, deneyler sırasında her türlü zorluğu aşmama yardım eden, gece gündüz her sorumu yanıtlayan ve desteğini asla esirgemeyen çalışma arkadaşım Asude ŞENOLSUN'a araştırma görevlileri Sayın Umut MENGÜLLÜOĞLU ve Sayın Çağrı ALTUĞ'a teşekkürlerimi borç bilirim. Ayrıca her zaman yanımda olan sevgili aileme desteklerinden dolayı teşekkür ederim.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı SOYADI: Hatice Cansu TEMEL

Eğitim Bilgileri

- 2019/2021 Ege Üniversitesi, Biyoteknoloji (Yüksek Lisans)
- 2013/ 2018-Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Biyomühendislik (İngilizce)
- 2009/ 2013-Izmir Anadolu Lisesi

Staj ve İş Deneyimleri

- Mart 2019/Kasım 2019-Serox GmbH İlaç Makine Kimya Endüstrisi (Biyomühendis)
- Ekim 2018/Mart 2019-CND Ar-Ge Danışmanlık Sanayi Ticaret Limited Şirketi (Ar-Ge Mühendisi)
- Temmuz-Ağustos 2017-Anadolu Efes Bira Fabrikası (Stajyer Mühendis)
- Ağustos 2016-İstanbul Göztepe Medical Park Hastanesi Tüp Bebek Merkezi (Stajyer)
- Haziran-Temmuz 2016-Ege Üniversitesi ARGEFAR Biyosidal Laboratuvarı (Stajyer Mühendis)

Sertifikalar

- GMP-İyi Üretim Uygulamaları
- GLP-İyi Laboratuvar Uygulaması
- ISO 9001-Kalite Yönetim Sistemi
- ISO 17025-Test ve Kalibrasyonda Laboratuvar Yeterliliği
- Değişim ve Sürekli İyileştirme KAI-ZEN (Elginkan Vakfı)
- Proje Yönetimi (Elginkan Vakfı)
- Zaman Yönetimi (Elginkan Vakfı)

Yarışmalar

- 15 Ağustos 2018-Türkiye 16. IEEE Öğrenci ve Genç Profesyoneller Kongresi (Finalist Yarışmacı: Kompakt Karbon Macun Elektrot ve Elektrokimyasal Biyosensör Havuzu Tasarımı ve 3D Yazıcı ile Baskısı)
- 24 Şubat 2017-2. Ulusal Yaşam Bilimleri Kongresi (En İyi Bilimsel Çalışma Ödülü)

İlgi Alanları

- IEEE CBU Öğrenci Kolu Kurucu Yönetim Kurulu Üyesi (Ocak 2015- Haziran 2018)
- Tıpta Mühendislik ve Biyoloji Derneği Başkanı (Eylül 2016-2017)
- Mühendislik Topluluğu Üyesi (Eylül 2015-2016)
- TEGV Türk Eğitim Vakfı Gönüllüsü
- Tiyatro Konak Atatürk Kültür Merkezi, Bornova Belediyesi Şehir Tiyatrosu