



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



BİSFENOL-A TAYİNİ İÇİN YENİ BİR NON-ENZİMATİK BİYOSENSÖR SİSTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

Asude ŞENOLSUN

Yüksek Lisans Tezi

Biyokimya Anabilim Dalı

İzmir

2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**BİSFENOL-A TAYİNİ İÇİN YENİ BİR
NON-ENZİMATİK BİYOSENSÖR SİSTEMİ
GELİŞTİRİLMESİ**

Asude ŞENOLSUN

Danışman: Prof. Dr. Erol AKYILMAZ

Biyokimya Anabilim Dalı
Biyokimya Tezli 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 olarak sunduğum “**BİSFENOL-A TAYİNİ İÇİN YENİ BİR NON-ENZİMATİK BİYOSENSÖR SİSTEMİ GELİŞTİRİLMESİ**” 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.

28 / 01 / 2022

Asude ŞENOLSUN

ÖZET**BİSFENOL-A TAYİNİ İÇİN YENİ BİR NON-ENZİMATİK BİYOSENSÖR SİSTEMİ GELİŞTİRİLMESİ**

ŞENOLSUN, Asude

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erol AKYILMAZ

Ocak 2022, 80 sayfa

Bu tez çalışmasının amacı, Bisfenol-A'nın miyoglobindeki Hem grubu üzerine inhibisyon etkisine dayanarak miyoglobin temelli MWCNT içeren yeni bir karbon pasta biyosensörü geliştirmektir.

Karbon pasta elektrot grafit, mineral yağı ve önceden karboksillenen MWCNT ile hazırlandı. MWCNT, hem miyoglobini immobilize etmek hem de elektrot iletkenliğinin artırılması amacıyla kullanıldı.

Miyoglobinin immobilizasyonundan sonra glutaraldehitte çapraz bağlama yapıldı. Bu şekilde hazırlanan CPE/MWCNT/Mb/GA modifiye miyoglobin temelli biyosensörle çalışma koşullarının optimizasyonu amacıyla pH, sıcaklık, tampon türü ve konsantrasyonuna ilişkin optimizasyon çalışmaları yapıldı. Ayrıca miyoglobin ve MWCNT miktarı optimizasyonu yapılarak biyoaktif tabaka bileşenleri ile ilgili parametreler belirlenmiştir.

Biyosensörün karakterizasyonuna yönelik çalışmalarda ise DV karakterizasyonu, tarama hızı, doğrusal tayin aralığı, tekrarlanabilirlik, substrat spesifikliği, ve örnek uygulaması olarak damacana suda BPA tayini ile ilgili sonuçlar elde edilmiştir.

Tasarlanan biyosensör ile diferansiyel puls voltametrisi (DPV) metodu kullanılarak (-0,15) V & (0,65) V potansiyel aralıkta ve $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren ortamda ölçümler alınmıştır. H_2O_2 konsantrasyonu sabit tutulurken BPA konsantrasyonu artırılarak ölçümler yapılmıştır. BPA'nın inhibisyon etkisi

sayesinde azalan yükseltgenme piklerindeki değişikliklerle akım farklanmasına dair sonuçlar elde edilmiştir. Deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar incelendiğinde en iyi çalışma ortamı koşullarının 25 °C’de 50 mM, pH 7,0 potasyum fosfat tamponu olduğu belirlenmiştir.

BPA için doğrusal tayin aralığı ve lineer aralık 100- 1000 µM olarak belirlendi. Cevap süresi 16 sn olarak hesaplandı. Tayin limiti 89 µM olarak belirlendi. Tekrarlanabilirlik çalışmaları sonrası 500 µM BPA için yapılan 10 ölçüm ile ortalama değer (\bar{x})= 511,952 µM, standart sapma (S.S.)= ± 2,76 µM ve % varyasyon katsayısı (%V.K.)= % 0,54 olarak bulunmuştur.

Son olarak 6 ay boyunca bekletilmiş damacana suda BPA tayini için hazırlanan miyoglobin temelli elektrotla ölçüm yapılmıştır.

Anahtar sözcükler: Karbon pasta biyosensör, Bisfenol- A, Hidrojen peroksit, MWCNT, Miyoglobin

ABSTRACT**DEVELOPMENT OF A NEW NON-ENZYMATIC BIOSENSOR SYSTEM
FOR THE DETERMINATION OF BISPHENOL-A**

ŞENOLSUN, Asude

Master of Science Thesis, Department of Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. Erol AKYILMAZ

January 2022, 80 pages

The aim of this thesis study is to develop a new carbon paste biosensor containing myoglobin-based MWCNT based on the inhibition effect of Bisphenol-A on the Hem group in myoglobin.

The carbon paste electrode was prepared with graphite, mineral oil and pre-carboxylated MWCNT. MWCNT was used both to immobilize myoglobin and to increase electrode conductivity.

After immobilization of myoglobin, crosslinking was done with glutaraldehyde. Optimization studies on pH, temperature, buffer type and concentration were carried out in order to optimize the working conditions with the CPE/MWCNT/Mb/GA modified myoglobin-based biosensor prepared in this way. In addition, parameters related to bioactive layer components were determined by optimizing the amount of myoglobin and MWCNT.

In studies for the characterization of the biosensor, results were obtained regarding DV characterization, scanning speed, linear detection range, reproducibility, substrate specificity, and BPA determination in carboy water as sample application. With the designed biosensor, measurements were taken in the potential range of (-0.15) V & (0.65) V using the differential pulse voltammetry (DPV) method and in the medium containing $K_4[Fe(CN)_6]$. While keeping the H_2O_2 concentration constant, the measurements were made by increasing the BPA concentration.

Results on current differentiation with decreasing oxidation peaks due to the inhibition effect of BPA were obtained. When the results obtained from the experimental studies were examined, it was determined that the best working environment conditions were 50 mM, pH 7,0 potassium phosphate buffer at 25 °C.

The linear detection range and linear range for BPA were determined as 100- 1000 μM . Response time was calculated as 16 seconds. The limit of detection was set at 89 μM . After repeatability studies, the mean value (\bar{x})= 511.952 μM , standard deviation (S.S.)= $\pm 2.76 \mu\text{M}$ and % coefficient of variation (%V.K.)= 0.54% with 10 measurements made for 500 μM BPA.

Finally, the measurement was made with the myoglobin-based electrode prepared for the determination of BPA in carboy water that was kept for 6 months.

Keywords: Carbon paste biosensor, Bisphenol- A, Hydrogen peroxide, MWCNT, Myoglobin

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında birçok alanda sıklıkla kullanılan ve çevresel bir endokrin bozucu olan Bisfenol A tayini için alternatif bir biyosensör sistemi geliştirildi. Amacımız bu kimyasalı hayatın her alanında yer alması ve tespitinin çok önemli olmasından dolayı farklı bir immobilizasyon tekniği ile hazırladığımız miyogloblin temelli karbon pasta elektrot sistemiyle belirlemektir.

Çalışma konumun belirlenmesinde ve hazırlanma sürecinin her aşamasında değerli bilgilerini ve zamanını benden esirgmeden her fırsatta çalışmamla yakından ilgilenen, her zaman güleryüze sorularımı cevaplayıp yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Erol AKYILMAZ'a ve her zaman desteğini benden esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Yüksek lisans tezim esnasında TÜBİTAK 2210-A Bursiyeriydim. Bu sebeple bir teşekkürü de Tübitak' a borç bilirim.

İZMİR

28 / 01 / 2022

Asude ŞENOLSUN



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇ KAPAK	ii
KABUL ONAY SAYFASI	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ.....	xi
İÇİNDEKİLER.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xixx
TABLolar DİZİNİ.....	xxiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxiv
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Biyosensörler	3
2.2 Biyosensörlerin Tarihçesi	4
2.3.1 Nitelikli Biyosensörlerin Özellikleri.....	6
2.4 Biyosensörlerin Sınıflandırılması	7

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.4.1 Elektrokimyasal biyosensörler	8
2.5. Enzim Temelli Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemleri.....	10
2.6 Voltammetrik Metod.....	12
2.6.1. Döngüsel Voltammetri (Cyclic voltammetry, DV).....	13
2.6.2 Diferansiyel puls voltammetrisi (DPV)	14
2.6.3 Kronoamperometri (CA).....	15
2.7 Voltametriye Kullanılan Elektrotlar.....	15
2.7.1 Çalışma (İndikatör) Elektrotları	15
2.7.2 Karbon elektrotlar	16
2.7.3 Karşılaştırma (Referans) Elektrot	18
2.7.4 Yardımcı (Karşıt) Elektrot	19
2.8 Karbon Nanotüpler.....	19
2.8.1 CNT temelli biyosensörler	20
2.9 Miyogloblin.....	21
2.10 Hidrojen Peroksit	23
2.10.1 H ₂ O ₂ 'nin Fiziksel ve Kimyasal Yapısı.....	24

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.10.2 Miyoglobinin H ₂ O ₂ ile Etkileşimi	24
2.11 Bisfenol-A(BPA)	25
2.12 Glutaraldehit	28
3. MATERYAL VE METOD	29
3.1. Materyal	29
3.1.1. Cihaz ve diğer ekipmanlar	29
3.1.2. Kimyasalar	29
3.2. Yöntem	30
3.2.1 Çok Duvarlı Karbon Nanotüp(MWCNT) Karboksilasyonu.....	30
3.2.2. Biyosensörün hazırlanması.....	30
3.2.3. Biyosensörün Çalışma Prensibi	32
3.2.4 Miyoglobin temelli H ₂ O ₂ biyosensörünün ölçüm düzeneği	33
3.3 Yalın Karbon Pasta Elektrota Yönelik Çalışma	34
3.4 Çalışmada Tasarlanan Miyoglobin Temelli Biyosensörün Karakterizasyonuna Yönelik Çalışmalar	34
3.4.1 KPE/MWCNT/ Mb/GA Modifiye Biyosensörün DV Karakterizasyonu	34

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

3.4.2 KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye Biyosensörün Tarama Hızı Karakterizasyonu	35
3.5 KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye Biyosensörün Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyonu.....	36
3.5.1 Miyogloblin Miktarının Biyosensör Cevabı Üzerine Etkisi	36
3.5.2 MWCNT Miktarının Biyosensör Cevabı Üzerine Etkisi.....	36
3.6 Miyogloblin Temelli Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonu	36
3.6.1. Tasarlanan Miyogloblin Temelli Biyosensör İçin Optimum pH Belirlenmesi	36
3.6.2 Tasarlanan Miyogloblin Temelli Biyosensör İçin Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	37
3.6.3 Tasarlanan Miyogloblin Biyosensörüne Farklı Tamponların etkisi.....	37
3.6.4 Tasarlanan Miyogloblin Biyosensörüne Farklı Tampon Konsantrasyonlarının Etkisi.....	37
3.7 KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları	38
3.7.1 Bisfenol-A için doğrusal tayin aralığının belirlenmesi	38

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.7.2 Miyogloblin Temelli Biyosensörün Tekrarlanabilirliğine Yönelik Denemeler.....	38
3.7.3 KPE/MWCNT/ Mb/GA Modifiye Biyosensör için Substrat Spesifikliği Çalışması	39
3.7.4 KPE/MWCNT/ Mb/GA Modifiye Biyosensör ile Örnek Tayini	39
4.SONUÇLAR VE TARTIŞMA	40
4.1 Yalın Karbon Pasta Elektrota Yönelik Yapılan DPV Ölçümü Deneyinde Elde Edilen Sonuçlar	40
4.2 KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye Biyosensörün DV Karakterizasyonuna İlişkin Olarak Yapılan Deneylede Elde Edilen Sonuçlar	41
4.2.1 KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye Biyosensörün Tarama Hızı Karakterizasyonu	43
4.3 KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye Biyosensörün Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyonu.....	44
4.3.1 Miyogloblin Miktarının Biyosensör Cevabı Üzerine Etkisi	44
4.3.2 MWCNT Miktarının Biyosensör Cevabı Üzerine Etkisi.....	47
4.4 Miyogloblin Temelli Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonu.....	50

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

4.4.1 Miyogloblin Temelli Biyosensör İçin Optimum pH Belirlenmesi	50
4.4.2 Miyogloblin Temelli Biyosensör İçin Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	52
4.4.3 Miyogloblin Biyosensörüne Farklı Tamponların etkisi	55
4.4.4 Tasarlanan Miyogloblin Biyosensörüne Farklı Tampon Konsantrasyonlarının Etkisi.....	56
4.5 KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları	58
4.5.1 KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye biyosensör için doğrusal tayin aralığı sonuçları.....	58
4.5.2 Miyogloblin Temelli Biyosensörün Tekrarlanabilirliğine Yönelik Denemeler	60
4.5.3 KPE/MWCNT/EDC-NHS/Mb/GA Modifiye Biyosensör Substrat Spesifikliği Çalışması	61
4.5.4 KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye Biyosensör ile Örnek Tayinine Yönelik Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar	63
4.6 BPA Tayinine Yönelik Olarak Geliştirilen KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye Biyosensörün Diğer Bazı Biyosensörlerle Kıyaslanması	66
5. GENEL DEĞERLENDİRME.....	67

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

KAYNAKLAR DİZİNİ.....	70
TEŞEKKÜR	79
ÖZGEÇMİŞ.....	80



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1	Biyosensörlerin Bileşenleri4
2.2	Glukoz tespiti için bir Clark enzim elektrodunun şematik gösterimi.....5
2.3	Biyosensörlerin tarihsel gelişimi6
2.4	Biyosensörlerin Sınıflandırılması.....8
2.5	a) Kondüktometrik, b) amperometrik, c) potansiyometrik biyosensörlerin çalışma prensipleri9
2.6	Enzim temelli biyosensörde immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi.12
2.7	Voltametik bir çalışmada kullanılan elektrotların şematize gösterimi.....13
2.8	Döngüsel voltammetride akım potansiyel eğrisi14
2.9	Kronoamperometride elektroda uygulanan potansiyeldeki değişimin zamana bağlı görüntüsü15
2.10	Voltametride kullanılan çalışma elektrotlarının sınıflandırılması.....16
2.11	Ag/AgCl referans elektrot19
2.12	Miyoglobinin 3 boyutlu yapısı22
2.13	Hidrojen peroksit oluşum ve kataliz yolları23
2.14	Miyoglobinin H ₂ O ₂ ile reaksiyonları.....25

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.15 Bisfenol-A yapısı	27
3.1 Miyoglobin temelli biyosensörün immobilizasyon aşamaları	32
3.2 Tasarlanan miyoglobin temelli biyosensörün ölçüm prensibi	33
4.1 Yalın Karbon Pasta Elektrota Yönelik Yapılan DPV Ölçümleri.....	41
4.2 Tasarlanan miyoglobin temelli biyosensörün yüzey modifikasyonuna ilişkin DV voltammogramları	42
4.3 Tarama hızlarına ait döngüsel voltammogram sonuçları.....	43
4.4 Döngüsel voltammogramdan elde edilen sonuçların anodik ve katodik yöndeki doğrusal grafikleri.....	44
4.5 Miyoglobin temelli biyosensörün farklı miyoglobin miktarı ile çalışmalarından elde edilen DP voltammogramları.....	46
4.6 Miyoglobin miktarı optimizasyon grafiği.....	47
4.7 Miyoglobin temelli biyosensörün farklı MWCNT miktarı ile çalışmalarından elde edilen DP voltammogramları.....	49
4.8 MWCNT miktarı optimizasyon grafiği	50
4.9 Miyoglobin temelli biyosensör için alınan DPV ölçümleri ve optimum pH grafiği	51
4.10 pH-% Biyosensör cevabı grafiği.....	51

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.11 Miyoglobın temelli biyosensör için alınan DPV ölçümleri ve optimum sıcaklık grafiği	53
4.12 Miyoglobın temelli biyosensörün 25 ve 30 °C sıcaklık değerleri için elde edilen DP voltammogramları.....	54
4.13 Miyoglobın temelli biyosensörün farklı tamponlardaki çalışmalarından elde edilen DP voltammogramları ve buna bağlı çizilen standart grafikler.....	55
4.14 Miyoglobın temelli biyosensörün farklı tampon konsantrasyonlarındaki çalışmalarından elde edilen DP voltammogramları ve buna bağlı çizilen standart grafikler	57
4.15 Miyoglobın temelli biyosensörün doğrusal tayin aralığının belirlenmesi.....	59
4.16 Miyoglobın tabanlı biyosensörün doğrusal tayin aralığı standart grafiği	60
4.17 Miyoglobın temelli biyosensöre ait substrat spesifikliği DP voltammogram sonuçları.....	62
4.18 Miyoglobın temelli biyosensöre ait substrat spesifikliği grafiği.....	63
4.19 Miyoglobın temelli biyosensörün damacana su ve BPA tayini için tekrarlanabilirliğinin incelenmesi amacıyla yapılan DP voltammogram sonuçları.....	64

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 CPE'lerin Çalışma Potansiyel Aralıkları.....	18
2.2 Bisfenol-A Genel Özellikleri	28
4.1 Tasarlanan Biyosensörde BPA ve H ₂ O ₂ İçin Gözlenen Tekrarlanabilirlik Değerleri	61
4.2 Tasarlanan Biyosensörde Damacana Su+ BPA İçin Gözlenen Tekrarlanabilirlik Değerleri	64
4.3 BPA Tayinine Yönelik Olarak Geliştirilen KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye Biyosensörün Diğer Bazı Biyosensörlerle Kıyaslanması	66

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
Mb	Miyoglobin
BPA	Bisfenol A
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
MWCNT	Multi Walled Carbon Nanotube (Çok Duvarlı Karbon Nanotüp)
GA	Glutaraldehit
KPE	Karbon Pasta Elektrot
DPV	Diferansiyel puls voltammetri
DV	Döngüsel voltammetri

1.GİRİŞ

Biyosensörler, biyolojik reaksiyonlarda hedef görevi gören ve algılama özelliklerine sahip olan analit maddelerini kontrol etmek için kullanılan aletlerdir. Birbiri içine girmiş biyokimyasal ve elektrokimyasal özelliklere sahip iki anahtar yapıdan oluşurlar. Biyokimyasal kısım analiz edilmesi gereken madde ile etkileşir ve analiti tanınması beklenen tek şeydir (Coulet P.R., 1991).

Günümüz teknolojik gelişmelerinin yardımıyla biyosensörler hızla gelişmektedir. Sensör teknolojisi fen bilimleri ve mühendislik gibi alanlarda da yer almaktadır ve bu disiplinlerde yeni teknolojilerle harmanlanması biyosensörlerin gelişmesinde önemli rol oynamaktadır (Blum L.J., Coulet P.R., 1991).

Bisfenol A (BPA), polikarbonat plastikler ve epoksi reçinelerin monomeri olarak görev alan, endüstride önemli yere sahip sentetik bir organik bileşiktir (Er ve Sarımehtemtoğlu, 2011). BPA, kadınlık hormonuna (östrojen) benzer sentetik bir yapıdan meydana gelmektedir. Son zamanlarda araştırmalar göstermektedir ki, BPA gibi kimyasalların insanlarda hormonal sistemlerde, üreme sisteminde sorunlara yol açmaktadır. Aynı zamanda vücut gelişiminde, ruh sağlığında da etkisi olduğu öne sürülmektedir (Arnich et al. 2011).

Ayrıca, öğrenme azlığı ve hafızada kayıplara neden olabileceği bilinmektedir. Biberonlar, çocuk oyuncakları, gözlükler, lensler, birtakım su şişeleri, damacaneler, CD ve DVD'ler, araçlarda kullanılan bazı parçalar, otomobil farları, tıbbi malzemeler, saklama kapları ve hatta yemeklerin sarıldığı streç filmler de BPA içermektedir (Goodson et al. 2002). Tüm bu nedenlerden dolayı Bisfenol-A'nın duyarlı ve seçimli tayini önemlidir. Hem proteini miyoglobinin çoğu kas dokusunda bulunur. Hemoglobin (Hb) gibi, Mb de Fe(III) formuna (metMb) oksitlenebilen heme bağlı bir Fe(II) kasyonu içerir. Mb ile biyolojik peroksitler (hidrojen peroksit) arasındaki reaksiyon peroksidaz I deki duruma benzer şekilde gerçekleşir. Reaksiyon sonucunda hem merkezli radikal okzoferril ve globin merkezli radikaller oluşur (Hong Liu et al, 2006). Hemoproteinler ve hemoenzimler yaygın prostetik grup olarak fotoporfirin IX (Hem) içerirler. Bu

nedenle miyoglobin peroksidaz, katalaz, nitrik oksit sentaz ve sitokrom P450 gibi bazı hemoenzimlerle çok fazla sayıda fiziksel ve kimyasal benzerliklere sahiptir denilebilir. Buna ek olarak, küçük ligantlar miyoglobinde heminin altıncı kordinasyon bölgesindeki demire bağlanabilmektedirler ve bu durum tüm yapıyı içine alan konformasyonel değişime, sonrasında geometrik yapıda değişime sebep olduğu görülmektedir. Aynı zamanda bu allosterik etkileşim enzimin substratıyla etkileşime girdiğindeki konformasyonel değişimle benzer nitelik taşımaktadır (Hong Liu et al, 2006). BPA tayinine yönelik enzim biyosensörleri kullanılarak yapılan çalışmalar mevcuttur (Portaccio et al., 2013).

Sonuç olarak tezimizde, miyoglobinin bu özelliğine dayanarak, H_2O_2 içeren ortamda, miyoglobindeki Hem gruplarının katalitik özelliğine dayanarak miyoglobin temelli enzimsiz bir karbon pasta elektrot tasarlanmıştır ve ortama eklenen BPA'nın inhibisyon etkisi ile akım farklanmaları incelenmiştir.

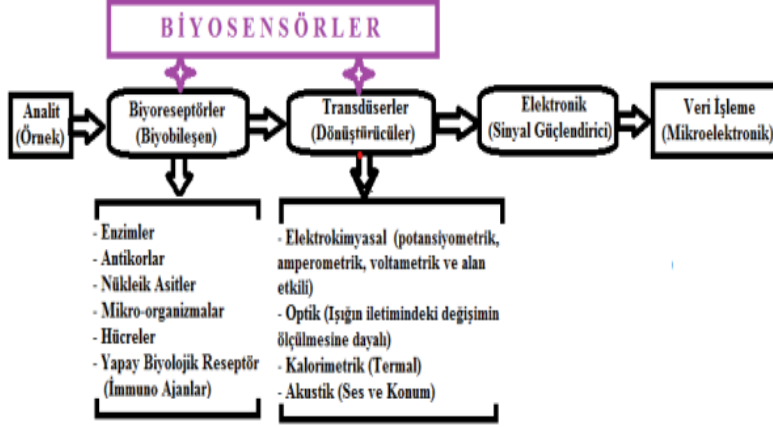
2.GENEL BİLGİLER

2.1. Biyosensörler

Biyosensörler, IUPAC tarafından da tanımlandığı gibi, kimyasal bir bileşimin biyolojik yanıtının optik, termal ya da elektriksel sinyallere cihazlarla dönüştürülmesi ve bu sinyallerin izlenmesini sağlayan analitik cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Bir analitin (veya ilgili analitler grubunun) konsantrasyonunu ölçülebilir bir yanıtla ilişkilendiren, doğrudan bir sinyal dönüştürücüyle arayüzlenen biyolojik bir tanıma elemanından oluşan analitik cihazlardır.

Biyosensörler, iki ana bölümden oluşan cihazlardır: Bir biyoreseptör ve bir dönüştürücü. Reseptörler, biyomoleküler bir yapıda olduğu için biyoreseptör olarak adlandırılır. Biyoreseptör, hedef analiti tanıyan bir biyomoleküldür. “Biyo” elementi, duyarlı olduğu analite karşı özeldir ve diğer analitleri tanımamalıdır (Scott A.M.et al., 2012).

Dönüştürücüler, algılama olayını ölçülebilir bir sinyale dönüştüren bir fizikokimyasal dedektör bileşeni içerir. Biyosensörler, çeşitli biyomedikal, endüstri ve ayrıca askeri uygulamalara sahip olabilir. Enzimler, antikorlar, reseptörler, organeller ve mikroorganizmalar gibi biyomoleküller ile hayvan ve bitki hücreleri veya dokuları biyolojik dedektör bileşenleri olarak kullanılmıştır.



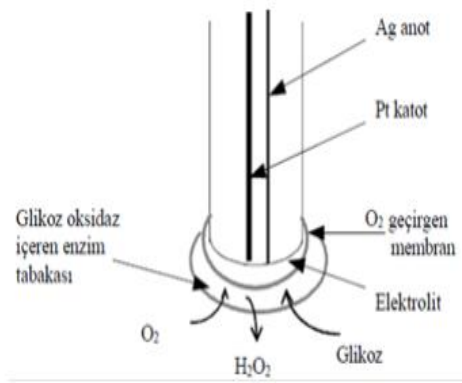
Şekil 2.1. Biyosensörlerin Bileşenleri (TÜYLEK Z., 2017).

2.2 Biyosensörlerin Tarihi

Daha sonra, 1967’de Updike ve Hicks, bir oksijen elektrodu glukoz oksidaz enzimi tutuklanmış polimer jel tabakasıyla kaplanıp bir çalışma elektrodu hazırlanmış ve bu elektrot ilk defa “enzim elektrodu” olarak adlandırılmıştır (Updike, S.J., Hicks, G.P., 1967). 1974 yılında Yellow Springs Instruments firması ilk defa bir biyosensör ürününü satışa başlamıştır. Bu gelişmeden sonra pek çok biyosensör ticari anlamda piyasada satışa başlamıştır. Şekil 2.2’de glukoz tespiti için Clark enzim elektrodunun şematik gösterimi görülmektedir.

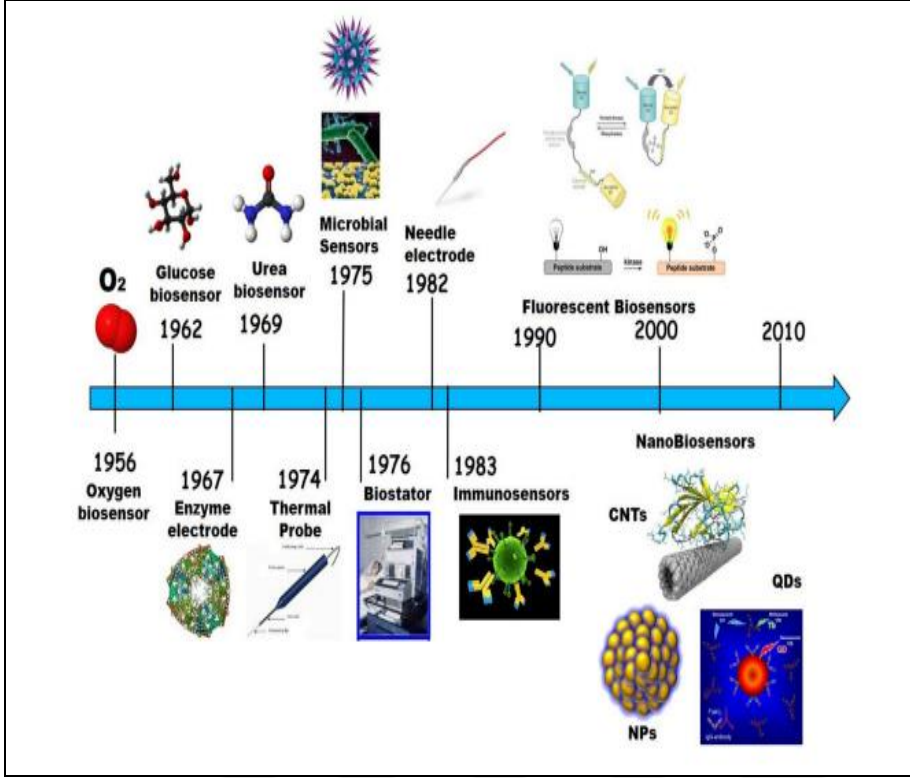


Elektrotta:



Şekil 2.2. Glukoz tespiti için bir Clark enzim elektrodunun şematik gösterimi (Clark, Jr. L. C., and C. Lyons. 1962).

Daha sonra, 1967’de Updike ve Hicks, bir oksijen elektrodu glukoz oksidaz enzimi tutuklanmış polimer jel tabakasıyla kaplanıp bir çalışma elektrodu hazırlanmış ve bu elektrot ilk defa “enzim elektrodu” olarak adlandırılmıştır (Updike, S.J., Hicks, G.P., 1967). 1974 yılında Yellow Springs Instruments firması ilk defa bir biyosensör ürününü satışa başlamıştır. Bu gelişmeden sonra pek çok biyosensör ticari anlamda piyasada satışa başlamıştır.



Şekil 2.3. Biyosensörlerin tarihsel gelişimi (Morris and Tilmaciu, 2015).

2.3.1 Nitelikli Biyosensörlerin Özellikleri

Biyosensörler aşağıdaki bazı özelliklere göre değerlendirilirler:

Seçicilik: Seçicilik, bir biyosensör için bir biyoreseptör seçerken dikkate alınması gereken çok önemli bir özelliktir. Bir biyoreseptör, istenmeyen kirlenmeleri içeren bir numune belirli bir hedef analit molekülünü tespit edebilir.

Duyarlılık: Numune analit izlerinin varlığını doğrulamak için minimum sayıda adımda ve düşük konsantrasyonlarda (ng/mL veya fg/mL) doğru olarak saptanabilen/tanımlanabilen minimum analit miktarıdır.

Doğrusallık: Doğrusallık, ölçülen sonuçların doğruluğuna katkıda bulunur.

Doğrusallık (düz çizgi) ne kadar yüksek olursa, substrat konsantrasyonu algılaması o kadar yüksek olur.

Tepki süresi: Sonuçların yüzde doksan beşinin elde edilmesi için geçen süredir.

Tekrar üretilebilirlik: Tekrar üretilebilirlik, kesinlik (örneğin bir kereden fazla ölçüldüğünde benzer sonucu elde etme durumu) ve doğruluk (numune her seferinde ölçüldüğünde sensörün gerçek değere daha yakın bir ortalama değer üretme yeteneği) ile karakterize edilir. Aynı numune birden fazla ölçüldüğünde biyosensörün aynı sonuçları üretme yeteneğidir.

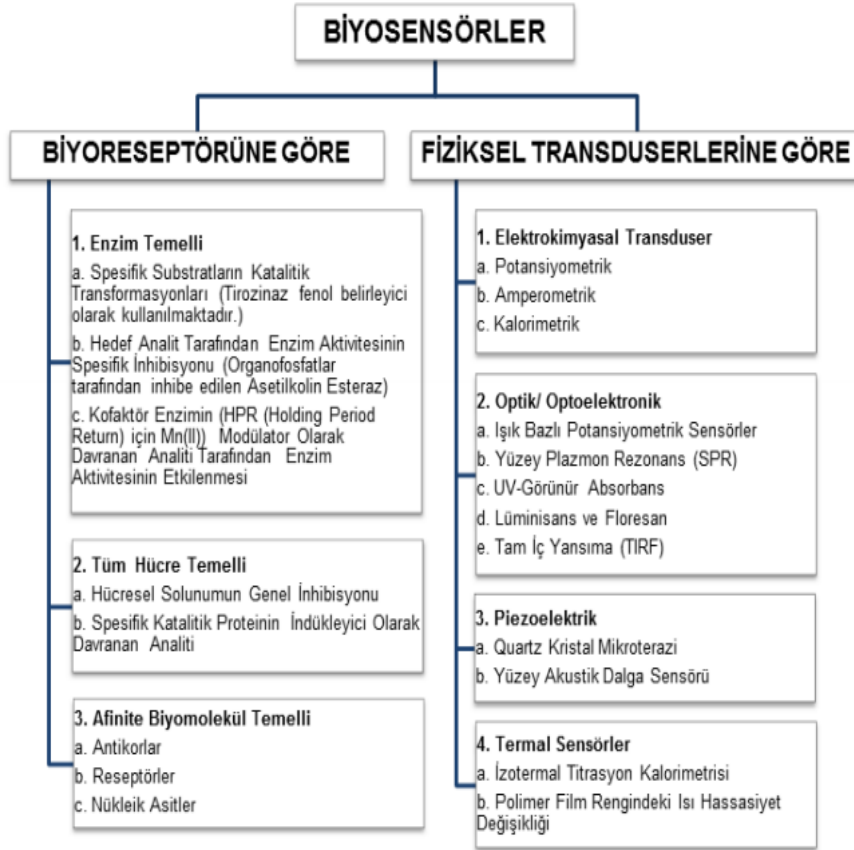
Kararlılık: Kararlılık, sürekli izlemenin gerekli olduğu biyosensör uygulamalarında temel özelliklerden biridir. Kararlılık, biyoalgılama cihazının içindeki ve dışındaki çevresel rahatsızlıklara karşı savunmasızlığın derecesidir (Theavenot, D.R.et.al., 2001; Dincer, C. et.al., 2019; Turner, A.P.F., 2013).

2.4 Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler analizlenmesi gereken analit- biyoaktif madde ilişkisine bağlı olarak biyokatalitik esaslı biyosensörler (mikroorganizma ve enzimler kullanılabilir.) ve biyoafinite esaslı biyosensörler (antikor-antijen ve reseptör-ligand etkileşimleri kullanılır.) olarak ikiye ayrılır.

Biyosensörler ölçüm yöntemleri ve dönüştürücü türüne göre elektrokimyasal esaslı biyosensörler (Amperometri, Potansiyometri), optik esaslı biyosensörler (Fotometri, Fluorometri, Biyoluminesans), piezoelektrik esaslı biyosensörler (Kvartz kristal mikrobalsan, Mikrokantileverlar) ve kalorimetri esaslı biyosensörler (termistörler) olmak üzere dörde ayrılır.

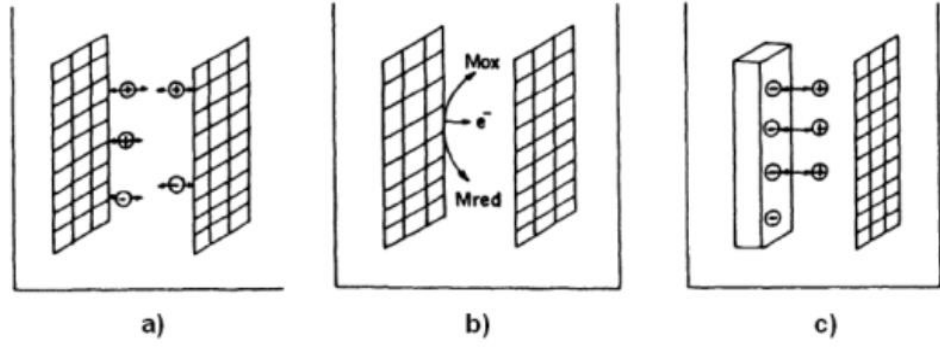
Biyosensörler biyoaktif tabakalarındaki biyoreseptörün türüne göre ise enzim temelli biyosensörler, hücre temelli biyosensörler, DNA temelli biyosensörler ve antikor/antijen temelli biyosensörler olmak üzere dört grupta sınıflandırılırlar (Mohanty ve Kougiános, 2006).



Şekil 2.4. Biyosensörlerin Sınıflandırılması (Thakur ve Ragavan, 2013).

2.4.1 Elektrokimyasal biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörlerin temel ilkesi; immobilize molekül ile analit arasında gerçekleşen reaksiyonda çözeltinin elektriksel özelliğini (örneğin; elektrik akımı veya potansiyeli) etkileyebilen iyonların tüketilmesini veya üretilmesini inceleyebilmektir. Elektrokimyasal biyosensörler elektriksel parametrenin ölçümüne göre sınıflandırılmaktadır ve yaygın şekilde olan çalışma prensipleri Şekil 2.5’de sunulduğu üzere görülmektedir.



Şekil 2.5 (a)Kondüktometrik, (b)amperometrik, (c) potansiyometrik biyosensörlerin çalışma prensipleri (M_{red} : indirgenmiş medyatör, M_{ox} : oksitlenmiş medyatör; Ø: anyon, □: katyon)
(Malhotra ve Turner, 2003)

2.4.1.1 Kondüktometrik elektrokimyasal sensörler

Ölçülmek istenen özellik, çözeltinin elektriksel kondüktansı/direncidir. Genel anlamda dışarıdan akım uygulanarak elektrotlar arası iyon hareketinin iletkenlikte ve dirençte yarattığı değişime bağlı ölçümler yapılır.

2.4.1.2 Potansiyometrik elektrokimyasal sensörler

Bahsedilen türlerdeki sensörlerde genel olarak ölçülmek istenen özellik bir çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel farklanmanın ölçümüdür. En basit potansiyometrik teknik Nernst eşitliği ile açıklanabilir ve aşağıda görüldüğü gibidir.

$$E = E_0 + RT \ln(a)/nF$$

Burada; E_0 : standard redoks potansiyeli, R: ideal gaz sabiti, T: mutlak sıcaklık, F: Faraday Sabiti, n: S maddesinin değişen elektron sayısı, a: S maddesinin aktivitesi. (Malhotra ve Turner, 2003).

2.4.1.3 Amperometrik elektrokimyasal sensörler

Amperometrik biyosensörler, iki veya üç elektrot ile koordine çalışır. Bu sensörler, referans elektrota göre çalışma elektrotuna sabit bir potansiyel uygulandığında, çalışma elektrotunda elektrokimyasal oksidasyon veya elektroaktif türlerin azalması nedeniyle üretilen akımı ölçer. Çalışma elektrodunun yüzeyinde üretilen akım, çözeltide bulunan analitin konsantrasyonu ile orantılıdır (Malhotra, B.D.et.al., 2017; Shanker, A.et.al., 2014; Grieshaber, D.et.al., 2008; Chaubey, A.et.al., 2002).

Potansiyometrik biyosensörlerle karşılaştırıldığında, bu yöntem hassas, hızlı, kesin ve doğrusal tepkiye izin verir, bu da onu seri üretim için daha uygun hale getirir. Ancak zayıf seçicilik ve diğer elektroaktif maddelerden kaynaklanan parazitler bu sensörlerin dezavantajlarıdır (Borgmann, S.et.al., 2011; Alaejos, M.S.et.al., 2004)

2.5 Enzim Temelli Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemleri

Biyosensörlerin düzgün işlev yapabilmesi için, biyolojik bileşen dönüştürücü yüzeyine bazı yollarla bağlanmalıdır. Bu yüzden immobilizasyon yapılmalıdır. İmmobilizasyon, biyomoleküllerin, bazı yöntemlerle dönüştürücü yüzeyine bağlanması demektir. Biyomoleküllerin immobilizasyonu için olan yöntemler aşağıdaki gibidir (Korotkaya, 2014) :

Adsorpsiyon: Adsorpsiyon yöntemi, biyosensöre ekstra bir işlem uygulanmasına gereksinim duymadan sonuç veren en kolay yöntem olarak bilinmektedir. Fiziksel ve kimyasal adsorpsiyon olarak ikiye ayrılır. Fiziksel adsorpsiyonda, biyomolekül van der Waals kuvvetleri, iyonik etkileşimler ya da hidrojen bağları ile yüzeyde tutulmaktadır. Kimyasal adsorpsiyon ise biyomoleküller ve dönüştürücü arasında gerçekleşir. Buradaki amaç fiziksel adsorpsiyona göre daha kuvvetli bir bağlanma olmasıdır (Korotkaya, 2014).

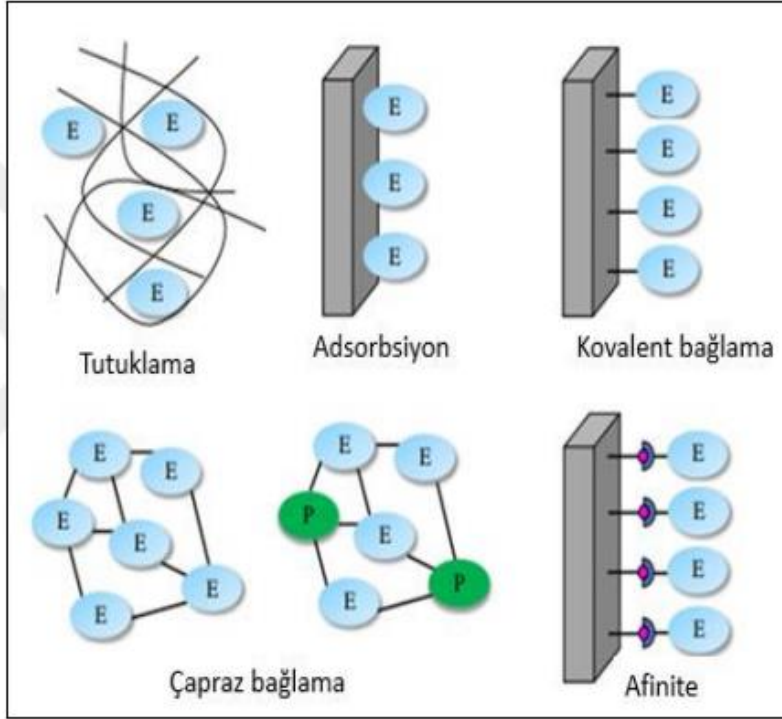
Mikrokapsülleme: Mikroenkapsülasyon tekniği, biyolojik tanıma elemanlarının (enzimler) küresel yarı geçirgen bir zar içine alındığı basit ve ucuz

bir işlemdir. Zar, polimerik, lipoidal, lipoprotein bazlı veya iyonik olmayan olabilir. Mikrokapsülasyonda iki yöntem tercih edilir: İlki Suyula karışmayan sıvı fazlarda enzim mikro damlacıklarının faz ayrımı (koaservasyon) ve diğeri iki karışmaz maddenin ara yüzeyinde bir monomerin polimerizasyonudur (ara yüzey polimerizasyonu). Bu işlem, polimerik zar içindeki enzimin karartır (Arya, A.et al., 2019; Martinkova, P.et.al., 2017; Nguyen, H.H.; Kim, M., 2017; Sassolas, A.et.al., 2012; Sneha, H.P. et.al., 2019).

Çapraz bağlama: Çapraz bağlama mekanizması, biyotanıma elemanları (enzimler) arasında veya biyotanıma elemanları ile işlevsel olarak inert proteinler (örneğin sığır serum albümini) arasında moleküller arası kovalent çapraz bağlantıların yaratılması yoluyla gerçekleşir. Bu işlem, 3 boyutlu çapraz bağlı agregalardaki enzim moleküllerini dönüştürücü yüzeyine bağlamak için bir bağlayıcı görevi gören çok işlevli reaktiflerin yardımıyla gerçekleştirilir. Çapraz bağlanma için gereken optimal koşullar pH, sıcaklık ve iyonik güçtür. Daha kısa tepki süresine, daha güçlü bağlanmaya ve enzimlerin daha yüksek katalitik aktivitesine izin verir. Avantajları, daha az enzim sızıntısı, daha güçlü kimyasal bağlanma ve uygun stabilize edici ajanlar kullanılarak biyolojik tanıma elemanı için çevreyi ayarlama olasılığıdır. Dezavantajları, matris ve protein yerine protein molekülleri arasında kovalent çapraz bağların oluşması ve protein yapısının kısmi denatürasyonunun çapraz bağlama immobilizasyonu uygulamasını sınırlamasıdır (Arya, A. et.al., 2019; Martinkova, P. et.al., 2017; Nguyen, H.H., 2012; Sneha, H.P. et.al., 2019).

Kovalent bağlama: Doğrudan kovalent bağlanma, biyolojik tanıma elemanının ya elektrot/dönüştürücü yüzeyine ya da zarın inert matriksine sıkıca bağlandığı en yaygın kullanılan enzim immobilizasyon tekniğidir. Membran matriksi boyunca immobilizasyon işlemi iki adımı içerir: Fonksiyonel polimerin sentezi ve kovalent immobilizasyon. Bağlanma mekanizması, biyolojik tanıma elemanı ve fonksiyonel protein grupları (genellikle amino asitlerin yan zincirleri) ve dönüştürücü/membran matriks yüzeyinin reaktif grupları arasındaki etkileşime bağlıdır. Doğrudan kovalent bağlanmanın avantajları, çevresel değişikliklere karşı güçlü direnç, biyolojik tanıma elemanının (enzim) az sızıntısı ve biyolojik tanıma elemanı (enzim) ile matriks arasında güçlü bağ oluşumunu içerir. Bu yöntemin

ana dezavantajları, sert kimyasalların kullanılması ve geliştirilen matriksin bir kez kullanıldıktan sonra yeniden üretilmemesidir (Arya, A. et.al., 2019; Martinkova, P. et.al., 2017; Sassolas, A., 2012; Sneha, H.P. et.al., 2019).

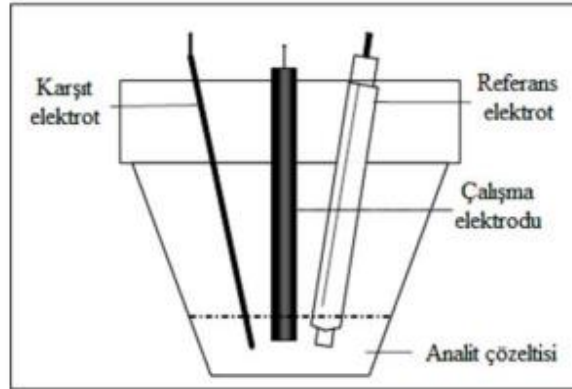


Şekil 2.6. Enzim temelli biyosensörde immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi. E: enzim, P: inert protein (Sassolas et al., 2012).

2.6 Voltammetrik Metod

Voltametri, bir elektrottaki akımın, elektrota uygulanan potansiyelin veya voltajın bir fonksiyonu olarak ölçüldüğü elektrokimyasal tekniktir. Potansiyel sistematik bir şekilde değiştirilir ve elde edilen akım-potansiyel grafiğine voltamogram denir. Voltametrinin en yaygın uygulaması analitik amaçlar içindir. Voltametri, elektroaktif olan, yani oksitlemek veya indirgemek için yapılabilecek herhangi bir biyoaktif bileşiği analizlemek için kullanılabilir. Potansiyel, çözeltideki bir türü bir elektron kazanmaya (redüksiyon) veya bir elektron kaybetmeye (oksidasyon) zorlayan "elektron basıncı" olarak düşünülebilir. Elektrotun potansiyeli daha negatif hale geldikçe, daha güçlü bir şekilde indirgenir. Tersine, potansiyel daha pozitif hale geldikçe, daha güçlü oksitleyici

hale gelir. Bu nedenle elektrot üzerinde meydana gelen redoks reaksiyonu, elektrot potansiyeli kontrol edilerek kontrol edilebilir. Akım ise sadece elektron akışının bir ölçüsüdür. Akım, elektrot yüzeyinde bir oksidasyon veya indirgeme meydana geldiğinde meydana gelen elektron transferinden kaynaklanmaktadır. Bu tür akıma Faradaik denir. Voltametrde, Faradaik akım konsantrasyonla orantılıdır. İndirgeme nedeniyle oluşan akıma (katodik akım) geleneksel olarak pozitif bir işaret verilir. Oksidasyondan kaynaklanan akıma (anodik akım) negatif bir işaret verilir. Bir damlayan cıva elektrotu kullanılarak bir voltametrik ölçüm yapılırsa, teknik polarografi olarak adlandırılır. Bir kılcal damardan akan ve ağızdan sürekli bir dizi cıva damlası olarak çıkan cıvadan oluşan damlayan cıva elektrodu (DME), analitik amaçlar için en kullanışlı elektrot olduğu için bu özel değerlendirmeyi hak ediyor. Bunun nedeni, cıva damlalarının çözeltiliye temiz, tekrarlanabilir bir sabit alan yüzeyini maruz bırakmasıdır (J. Heyrovsky and P. Zuman, 1968).

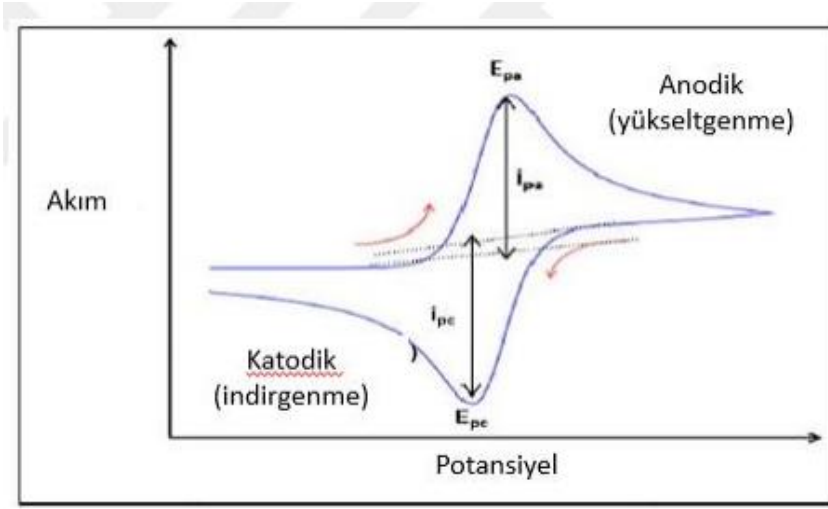


Şekil 2.7. Voltametrik bir çalışmada kullanılan elektrotların şematize gösterimi (Bilgin, 2012).

2.6.1 Döngüsel Voltametri (Cyclic voltammetry, DV)

Döngüsel voltametri (DV), biyosensör çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir elektroanalitik teknik durumuna gelmektedir. Kantitatif tayinler için nadiren kullanılır, ancak redoks reaksiyonlarının sürecinin incelenmesi, reaksiyon

sonucu oluşan ara maddelerin ne olduğunun incelenip anlaşılması ve reaksiyon ürünlerinin ne kadar kararlı ve dayanıklı olduğunun belirlenmesi ve elde edilmesi amacıyla çokça kullanılmaktadır. Bu teknik, akımı izlerken, çalışan bir elektrotta uygulanan potansiyelin hem ileri hem de geri yönlerde (bazı tarama hızlarında) değiştirilmesine dayanır. Örneğin, ilk tarama, anahtarlama potansiyeline göre negatif yönde olabilir. Bu noktada tarama tersine döndürülür ve tarama pozitif yönde izlenir. Analize bağlı olarak, bir tam döngü, bir kısmi döngü veya bir dizi döngü gerçekleştirilebilir.



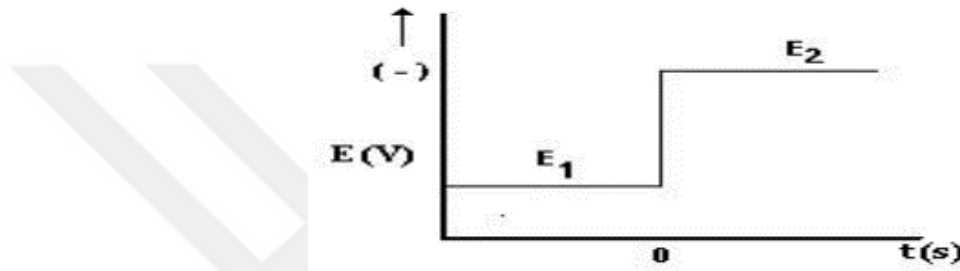
Şekil 2.8 Döngüsel voltammetride akım potansiyel eğrisi (Nordin et al., 2016).

2.6.2 Diferansiyel puls voltammetrisi (DPV)

Bu teknik, potansiyelin bir dizi puls ile taranması bakımından normal puls voltammetrisiyle karşılaştırılabilir. Bununla birlikte, NPV ile birbirlerinden potansiyel pulsun sabit olması, küçük genlikte (10-100 mV) ve yavaş değişen bir taban potansiyeli üzerine bindirilmesi ile ayrılır. Akım, her puls için iki noktada ölçülür, birinci nokta pulsun uygulanmasından hemen önce ve ikincisi pulsun sonunda. Bu örnekleme noktaları, faradaik olmayan (yükleme) akımın azalmasına izin verecek şekilde seçilir. Her puls için bu noktalardaki akım ölçümleri arasındaki fark belirlenir ve baz potansiyele karşı çizilir.

2.6.3 Kronoamperometri (CA)

Kronoamperometri, difüzyon kontrollü elektrokimyasal reaksiyonları ve karmaşık elektrokimyasal mekanizmaları incelemek için kullanılır. Öncesinde Faradaik reaksiyonun meydana gelmediği bir başlangıç potansiyeli uygulanır, ardından potansiyel, istenen elektrokimyasal reaksiyonun meydana geldiği bir değere yükseltilerek gerçekleştirilir. Çözelti genellikle karıştırılmaz ve akım deney boyunca ölçülür.



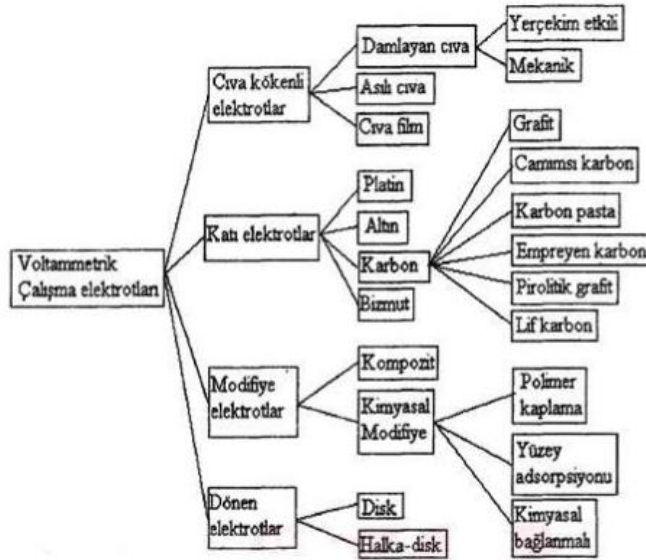
Şekil 2.9. Kronoamperometride elektroda uygulanan potansiyeldeki değişimin zamana bağlı görüntüsü (Skoog et al., 1997).

2.7 Voltametri Kullanan Elektrotlar

2.7.1 Çalışma (İndikatör) Elektrotları

Çalışma elektrodu (ÇE), bir elektrokimyasal hücrenin en önemli bileşenini temsil eder. En çok elektron transferi ÇE ile çözelti arasında gerçekleşir. Bir çalışma elektrotu malzemesinin seçimi, deneysel başarı için çok önemlidir. Birkaç önemli faktör dikkate alınmalıdır. İlk olarak, malzeme elektrot kirlenmesi olmadan ideal olarak hızlı, tekrarlanabilir elektron transferi ile analit ile olumlu redoks davranışı sergilemelidir. İkinci olarak, belirli bir elektrolit solüsyonunda elektrotun üzerinde gerçekleştirdiği potansiyel aralık, en yüksek derecede analit karakterizasyonuna izin vermek için mümkün olduğunca geniş olmalıdır. Ek hususlar, malzemenin maliyetini, işlenebilirliği veya faydalı geometrilere

dönüştürülebilirlik kabiliyetini, bir ölçümden sonra yüzey yenileme kolaylığı ve toksisiteyi içerir. En yaygın olarak kullanılan çalışma elektrotları Şekil 2.10’ da gruplandırılmış olan platin, altın, karbon ve cıvadır. Bunlar arasında platin, iyi elektrokimyasal eylemsizlik ve birçok formda üretim kolaylığı sergileyen muhtemelen favoridir. Platin kullanımının yüksek maliyeti dışında en büyük dezavantajı, elektrolitte az miktarda su veya asit bulunmasının bile oldukça mütevazı negatif potansiyellerde hidrojen iyonunun hidrojen gazı oluşturmak üzere indirgenmesine (hidrojen evrimi) yol açmasıdır. ($E = -0,059 \times \text{pH}$). Bu azalma, herhangi bir yararlı analitik sinyali gizler.



Şekil 2.10. Voltammetride kullanılan çalışma elektrotlarının sınıflandırılması (Tural H., Gökçel H.İ., 2003).

2.7.2 Karbon elektrotlar

Karbon elektrotlar, platin veya altından daha fazla negatif potansiyelin yanı sıra iyi anodik potansiyel aralığının taranmasına izin verir. Karbon elektrotun en yaygın biçimi, nispeten pahalı ve işlenmesi zor olan camsı karbondur. Karbon pasta elektrotları da birçok uygulamada kullanışlıdır. Bu elektrotlar, Nujol gibi bir yağ substratı ile karıştırılmış ince taneli karbon macunundan yapılır. Macun daha

sonra bir inert elektrot gövdesi içindeki bir boşluğa paketlenir. Karbon pasta elektrotları, kullanım sırasında mekanik hasara meyilli olma dezavantajına sahiptir.

2.7.2.1 Karbon pasta elektrotlar (CPE)

Modifiye edilmiş karbon pastaların temeli genellikle toz halinde grafit ve elektrolitik olmayan bağlayıcının bir karışımıdır. Modifiye edici ajan genellikle bir maddedir, ancak pastalar aynı zamanda iki veya daha fazla bileşenle modifiye edilebilir. Pasta içindeki modifiye edicinin miktarı, modifiye edici ajanın karakterine ve modifiye edilmiş pastada yeterli aktif bölge oluşturma kabiliyetine (örneğin, elektrot yüzeyinde veya moleküllerde hareketsizleştirilmiş fonksiyonel gruplar) bağlı olarak genellikle %10 ila %30 (v/v) arasında değişir). Genel olarak, bir elektrotu modifiye etmenin ana nedeni, istenen, genellikle önceden tanımlanmış özelliklere sahip niteliksel olarak yeni sensör elde etmektir. Bununla ilgili olarak, karbon pastalar şüphesiz modifiye elektrotların hazırlanması için en uygun malzemelerden birini temsil etmektedir. Katı substratların nispeten karmaşık modifikasyonlarının aksine, CPE'lerin hazırlanması, tipik olarak çeşitli alternatif prosedürler aracılığıyla çok basittir. Değiştirici doğrudan bağlayıcı içinde çözülebilir veya homojenizasyonu sırasında macuna mekanik olarak karıştırılabilir. Grafit parçacıklarını bir değiştirici çözeltilisiyle ıslatmak ve çözücüyü buharlaştırdıktan sonra emprenye edilmiş karbon tozu kullanmak da mümkündür. Son olarak, önceden hazırlanmış macunlar yerinde değiştirilebilir. Doğrudan modifikasyonlar açıkça tek amaçlı kullanım için özel sensörler sağlarken, yerinde dikkatli yaklaşımlar, farklı ajanlarla tekrarlayan modifikasyonlar için aynı karbon macunu kullanma imkanı sunar. Tablo 2.1'da CPE'lar için literatürde bulunan bazı çalışma aralıkları görülmektedir (Yavaş, A., 2014).

Tablo 2.1 CPE'lerin çalışma potansiyel aralıkları (YAVAŞ A., 2014).

ORTAM	ANODİK SINIR (V)	KATODİK SINIR (V)
1 M KCl	+1.10	-1.10
1 M HCl	+1.02	-0.90
Asetat tamponu pH 4.7	+1.27	
0.1 M H ₂ SO ₄	+1.30	
1 M NaOH		-1.40
1 M NaClO ₄		-1.10
NH ₄ ⁺ /NH ₃		-1.20
NH ₄ ⁺ /NH ₃ (bağlayıcı sıvı TCP)	+2.00	-2.00
Asidik ortam Ag/AgCl elektroda karşı	+1.50	-1.00
Nötr ortam	+1.40	-1.30
Bazik ortam	+1.20	-1.20

2.7.3 Karşılaştırma (Referans) Elektrot

Bir referans elektrot, iyi tanımlanmış ve kararlı bir denge potansiyeline sahiptir. Bir elektrokimyasal hücrede diğer elektrotların potansiyelinin ölçülebildiği bir referans noktası olarak kullanılır. Uygulanan potansiyel bu nedenle tipik olarak belirli bir referansa "karşı" olarak rapor edilir. Hücrede kullanılan elektrolitten bağımsız bir elektrot potansiyeline sahip, yaygın olarak kullanılan (ve genellikle ticari olarak temin edilebilen) birkaç elektrot takımı vardır. Sulu ortamda yaygın olarak kullanılan referans elektrotları; doymuş kalomel elektrotu (SCE), standart hidrojen elektrotu (SHE) ve AgCl/Ag⁺ elektrotlarıdır. Bu referans elektrotlar genellikle çözeltilerden gözenekli bir frit ile ayrılır. Referans bölmesindeki solvent ve elektroliti deneyde kullanılanla eşleştirerek bağlantı potansiyellerini en aza indirmek en iyisidir. Susuz çözücülerde, Ag⁺/Ag çiftine dayalı referans elektrotlar yaygın olarak kullanılır. Bunlar, Ag⁺ tuzu, tipik olarak AgNO₃ içeren bir çözelti içinde gümüş bir telden oluşur. Çeşitli gümüş tuzu, çözücü ve konsantrasyon kombinasyonları için bir Ag⁺/Ag elektrotuyla elde edilen verilerin diğer referans elektrot türlerine referanslanmasını sağlayan dönüşüm tabloları mevcuttur.



Şekil 2.11. Ag/AgCl referans elektrot

(http://bilsenbesergil.blogspot.com/p/blog-page_708.html).

2.7.4 Yardımcı (Karşıt) Elektrot

Çalışma elektroduna, analitin indirgenmesi (veya oksidasyonu) meydana gelebilecek şekilde bir potansiyel uygulandığında, akım akmaya başlar. Karşıt elektrotun amacı elektrik devresini tamamlamaktır. Akım, ÇE ve KE arasında elektron akışı olarak kaydedilir. Karşıt elektrotta meydana gelen reaksiyonun kinetiğinin, çalışma elektrotunda meydana gelenleri engellememesi için, karşıt elektrotun yüzey alanı çalışma elektrotunun yüzey alanından daha büyüktür. Karşıt elektrot olarak tipik olarak platin tel veya disk kullanılır, ancak karbon bazlı karşıt elektrotlar da mevcuttur. ÇE'de bir indirgeme çalışırken, KE'de bir oksidasyon meydana gelir. Bu nedenle, KE mümkün olduğu kadar inert olacak şekilde seçilmelidir. Karşıt elektrotlar deneye bağlı olarak yan ürünler üretebilir, bu nedenle bu elektrotlar bazen fritli bir bölme ile sistemin geri kalanından izole edilebilir. Bir örnek, ÇE'de THF'de indirgeyici bir süreç çalışırken KE'de meydana gelebilecek THF'nin oksidatif polimerizasyonudur.

2.8 Karbon Nanotüpler

Karbon yer küredeki en çok bulunan elementtir. Karbonun formlarından olan grafit 1779 yılında, 1789 yılında ise elmas keşfedilmiştir. Yaklaşık 200 yıl sonra karbonun bir başka formu olan fulleren keşfedilmiştir. İlerleyen yıllarda ise

karbon nanotüpler keşfedilerek ortaya çıkmışlardır. Karbon nanotüpler (CNT) 1991 yılında Sumio Ijima tarafından keşfedilmiştir. Sumio'nun ilk gözleminde elde ettikleri çok tabakalı nanotüplerdir ve sonrasında tek duvarlı nanotüpler keşfedilmiştir (Paradise and Goswami, 2007). Karbon nanotüp adı nanotüplerin birkaç nanometrelik boyutlarından dolayı bu şekilde adlandırılmıştır. Bu tüpler insan saçından 10000 kat daha incedir ve hegzagonlardan meydana gelir (Paradise and Goswami, 2007). CNTler çeliğe göre 100 kat daha çok dirence sahiptir. Saf elmasa göre daha yüksek bir termal iletkenliği vardır. Bakırla aynı elektriksel iletkenliğe ve bakırdan daha yüksek akım taşıma özelliklerine sahip olmaları sebebiyle tercih haline gelmişlerdir (Merkoçi et al., 2005; Antiochia and Gorton, 2007). Tek duvarlı ve çok duvarlı olmak üzere iki farklı karbon nanotüp bulunmaktadır (Yang et al., 2004). Çok duvarlı karbon nanotüpler aralarında 3,4 Å boşluk bulunan pek çok grafit silindirin birbiri içine geçmesi sonucu oluşmuş yapılardır. Çok duvarlı karbon nanotüplerin dış çapları 1–50 nanometre aralığında bulunur ve iç çapları ise bir kaç nanometre civarında değişir (Yao and Shiu, 2007).

2.8.1 CNT temelli biyosensörler

Yaygın olarak amperometrik veya voltametrik çalışmalarda camımsı karbon veya metal elektrotlar tercih edilmektedir. Bu elektrotların duyarlılığı düşük, stabilite ve yeniden üretilebilirliği az, uzun bir yanıt süresine sahip oldukları için ve elektron transfer reaksiyonları için yüksek potansiyelerde kullanılmaları gerektiği için dezavantajlı özelliğe sahiptirler. CNTler hızlı elektron transferi ve yüzey bozunmalarına karşı dayanıklıdırlar, bu nedenle avantajlılığı yüksektir (Balasubramanian and Burghard, 2006). Aynı zamanda aktivite kaybı olmaksızın protein immobilizasyonuna izin vermeleri ve duyarlılığı artırmaları açısından uygun oldukları için karbon nanotüpler yine avantajlı olarak kabul edilir (Paradise and Goswami, 2007). Karbon nanotüpler asitlerle muamele edildiği zaman uçta ve yan duvarlarda oksijen bulunan karboksil grupları başta olmak üzere çeşitli grupların oluşmasını sağlar ve su gibi polar çözügenlerde çözünürlükleri artmış hale gelir (Balasubramanian and Burghard, 2006). Karboksil gruplarının varlığının çok duvarlı karbon nanotüpler arasındaki van der Waals etkileşimlerinin bozulmasına neden olduğu, çok duvarlı karbon nanotüp

demetlerinin ayrışmalarını kolaylaştırdığına dair çalışmalar mevcuttur (Tsai et al., 2006).

Fonksiyonel grupların CNT'lerin yüzeyine kovalent bağlanması, polimerlere yük transferini iyileştirebilir. Nanotüplere bağlanması gereken kimyasal grup, takviye edilecek polimerin doğasına bağlıdır (H.J. Choi et.al., 2005; J.H. Sung et.al., 2004).

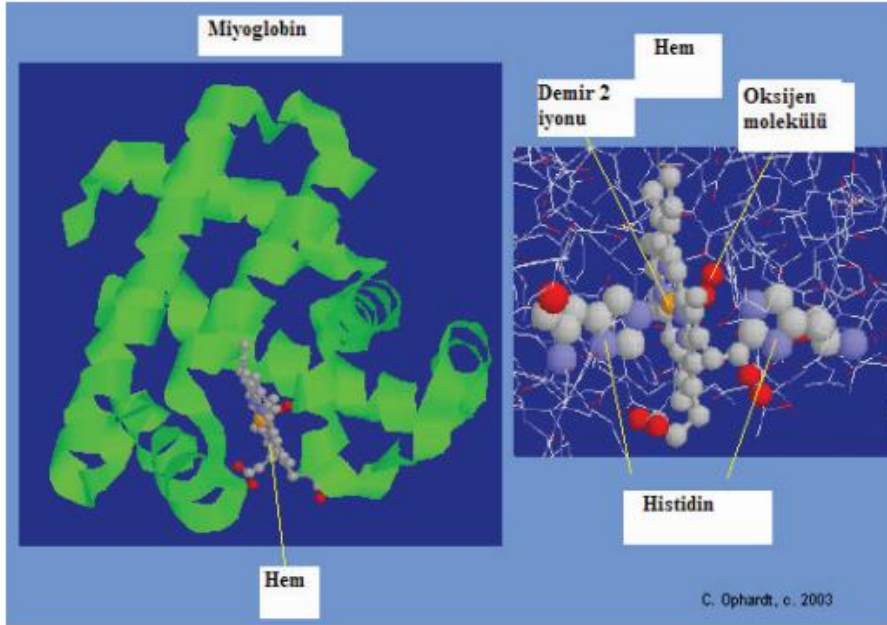
Literatür araştırmasında kullanılan iki yaygın asit işlemi vardır; biri; nanotüpleri bir nitrik asit çözeltisi ile geri akıtıp, diğeri; numuneyi yüksek güçlü sonikasyon altında maksimum 6 saat boyunca bir HNO₃/H₂SO₄ (hacimce 1:3) karışımına maruz bırakmaktır (Y. Lin, M.et.al., 2003; E. Dujardin et.al., 1998 ; D.E. Hill et.al., 2002).

CNT'lerin kimyasal eylemsizliği nedeniyle, moleküllerin herhangi bir kovalent immobilizasyonu, önce yüzeyde reaktif gruplar oluşturmak için kimyasal modifikasyonlar gerektirir.

2.9 Miyogloblin

16700 Da büyüklüğündeki Miyogloblin proteini memelilerde özellikle kas dokusunda bulunan, 153 aminoasitten oluşan, merkezinde hem grubu (demir içeren porfirin) içeren basit bir oksijen bağlama ve taşıma proteinidir. Oksijenin kas içine taşınımını sağlar. Miyogloblin ve biyolojik peroksidlerin arasında meydana gelen reaksiyon (hidrojen peroksid, lipid hidroperoksidler, ve peroksinitrit) peroksidaz I deki duruma benzer hem merkezli radikal okzoferril ile globin merkezli radikallerin oluşmasını sağlar (Hong Liu et al, 2006). Hemoproteinler ve hemoenzimler yaygın prostetik grup olarak fotoporfirin IX (hem) içerirler. Miyogloblinin hem cebinin yakınındaki çıkıntının aksiyal ligand olarak işlevi vardır. Hemin uzak bölgesindeki diğer koordinasyon alanı boş veya hemoenzimlerin yapısına benzeyen oksijen ya da hidrojen peroksid gibi ligandlarla kolaylıkla yer değiştirebilecek suyla bağlı bir haldedir. Bu nedenle miyogloblinin; peroksidaz, katalaz, nitrik oksit sentaz ve sitokrom P450 gibi hemoenzimlerle bir çok fiziksel spektroskopik ve kimyasal benzerlikleri vardır. Bu yüzden bu tezde

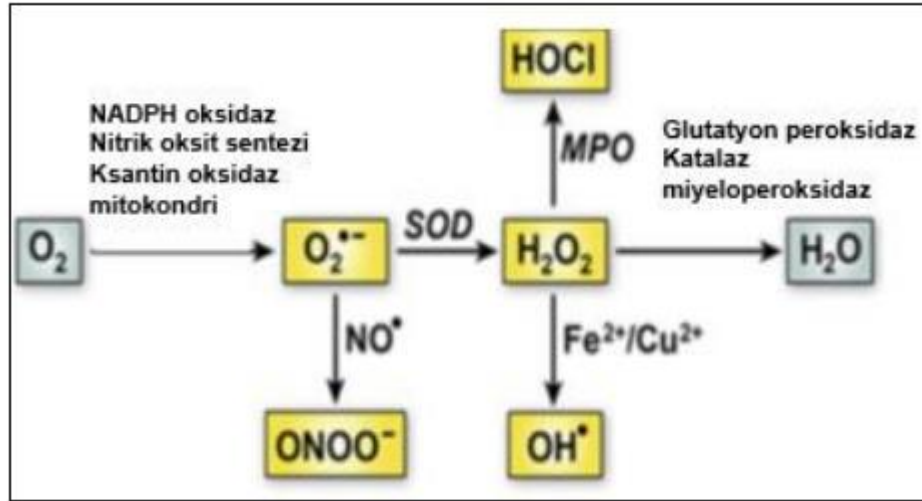
miyoglobinin bu özellikleri göz önünde bulundurularak enzimsiz bir biyosensör tasarlanmıştır. Buna ek olarak, küçük ligantlar miyoglobinde heminin altıncı koordinasyon bölgesindeki demire bağlanabilmektedir ve bu durum tüm yapıda konformasyonel değişime, ardından da geometrik yapıda değişime sebep olur ve miyoglobinin elektronik dağılımı da bu durumdan etkilenir. Ayrıca bu allosterik etkileşim enzim-substrat etkileşiminde oluşan konformasyonel değişimle benzer özellik taşır (Hong Liu et al, 2006). Mb indirgenme, yükseltgenme reaksiyonlarında yer almaktadır. Bu bakış açısıyla, elektrokimyasal metodlar miyoglobinin fizyolojik özelliklerinin çalışılması açısından daha fazla ilgiye sahiptir (Chao Zhao et al, 2003). Miyoglobinin hem grubu ile elektrot yüzeyi arasındaki ilişki engellenmiştir çünkü, hem grubu polipeptid zincir yapısında gömülüdür. Miyoglobin ile elektrot arasındaki elektronların akış hızını arttırmak için de bu tezde MWCNT kullanılmıştır.



Şekil 2.12. Miyoglobinin 3 boyutlu yapısı (Virtual Chembook Charles E. Ophardt, 2003).

2.10 Hidrojen Peroksit

Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Hidrojen peroksiti (H_2O_2) Louis-Jacques Thenard, 1818 yılında baryum peroksiti sülfirik asitle muamele ederken keşfetmiş ve l'eau oxygenee (oksijenli su) ismini vermiştir. H_2O_2 nin atmosferdeki varlığını ilk olarak William Prout öne sürmüştür (Möller, 2009). Renksiz ve aşındırıcı olmaması gibi özellikleri sayesinde tekstil sanayide yaygın bir şekilde ağartıcı olarak kullanılmıştır. Hidrojen peroksit örneğin tekstillerin, kâğıt hamuru, saç, kürk ve gıdaların ağartılması veya kokusunun giderilmesinde, su ve kanalizasyon temizliğinde, tohum dezenfeksiyonunda ve şarap damıtılmasında nötralize edici ajan olarak geniş uygulama alanına sahip bir oksitleyici ajandır. Hidrojen peroksit, yapısı gereği su ve oksijene dönüştüğünden tam bir çevre dostudur. Farklı enzimler tarafından katalizlenen hidrojen peroksit özellikle nötrofil hücrelerinde bulunan miyeloperoksidazlar tarafından katalizlendiğinde önemli bir antimikrobiyal ajan olan hipoklorik asite dönüşmektedir. Hidrojen peroksit oluşum ve kataliz yolları Şekil 2.13' de gösterilmiştir.



Şekil 2.13. Hidrojen peroksit oluşum ve kataliz yolları (Gu et al., 2018).

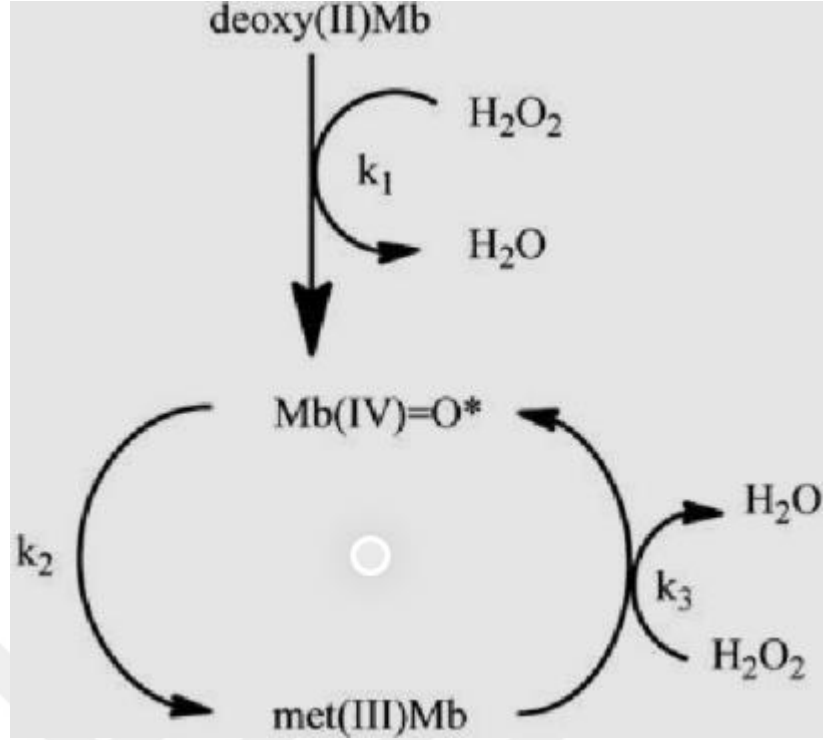
Süperoksitten farklı olarak hidrojen peroksit, yüksüz ve yarı ömrü oldukça uzun olan bir moleküldür. Bu sayede hücre membranlarında kolay yayılım gösterir ve hücre içi sinyalinde önemli bir molekül olarak görev alır.

2.10.1 H₂O₂'nin Fiziksel ve Kimyasal Yapısı

Hidrojen peroksitin çok işlevliliği kimyasıyla ilişkilidir. H₂O₂ nin ara yükseltgenme numarası -1 olan oksijen atomları hem indirgenme hem de yükseltgenme özelliklerini açıklamaktadır. Termodinamik nedenlerden H₂O₂ nin öncelikli olarak doğrusal veya trans planar konformasyonda olması beklenir. Bu şekilde iki hidrojen atomu elektronların simetrik dağılımdan dolayı polar olmayan her bir düzenlenmeden yeterince uzak olacaktır. Bu nedenle H₂O₂ gerçekten doğadaki en küçük kiral moleküllerden birini temsil eder ve her iki enantiyomerin eşit miktarını içeren rasemik karışımla oluşur. Yaklaşık 11 ve 16 olan iki pKa değeri ile fizyolojik pH'da yüksüz ve protonlanmıştır. Kimyasal olarak hidrojen peroksit reaktif oksijen türü olmasına rağmen su ile şaşırtıcı bir biçimde birçok fiziksel özelliği benzer nitelik taşır (Bienert et al., 2006).

2.10.2 Miyoglobinin H₂O₂ ile Etkileşimi

Deoksi(II)Mb, hidrojen peroksit (H₂O₂) ile reaksiyona girerek bir Mb(IV)=O ve su açığa çıkarır. Mb(IV)=O, Met(III)Mb'ye otomatik indirgemeye maruz kalır. Met(III)Mb, ek bir H₂O₂ molekülü ile reaksiyona girerek Mb(IV)=O*'nın rejenerasyonu ile sonuçlanır. Met(III)Mb'nin H₂O₂ ile reaksiyonundan sonra Mb(IV)=O oluşumu, genellikle bir porfirin veya protein ferril Mb radikalinin oluşumu ile bağlantılı olarak tanımlanır (Mark P Richards, 2013).



Şekil 2.14. Miyoglobinin H₂O₂ ile reaksiyonları (Mark P Richards, 2013).

2.11 Bisfenol-A(BPA)

Bisfenol A (BPA), epoksi reçineler ve polikarbonat plastiklerin üretiminde kullanılan hacmi yüksek olan bir endüstriyel kimyasaldır. Polikarbonat plastiklere başta yiyecek ve içecek kapları olmak üzere pek çok üründe rastlanabilirken, epoksi reçineler, metalik yiyecek ve içecek kaplarının iç astarları olarak korozyonu önlemek için sıklıkla kullanılmaktadır. Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu (EFSA: European Food Safety Authority) tarafından yapılan çalışmaların sonucuna göre, bir insan vücudunun günlük kaldırabileceği ve zehir etkisi oluşturmayan BPA([2,2-bis(-hidroksifenil)] propan) miktarı, vücut ağırlığının her kilogramı için 0,05 mg olarak hesaplanmıştır. Yetmiş kilogram da üç buçuk miligram BPA'yla etkileşen bir insanın sağlığı için, özellikle bebek gelişimi sürecinde yan etkileri olabileceği ve yetişkin insanlar için bazı sağlık problemleri oluşturabileceği düşünülmektedir (Fernandez M.F. et.al., 2007). BPA, kadınlık hormonu olan östrojene çok benzeyen ksenöstrojen içeren sentetik bir yapıdan meydana gelmiştir. BPA'nın gıda ile temas eden malzemelerde

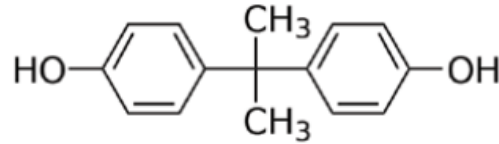
kullanımı ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından düzenlenmektedir. BPA ayrıca genellikle yazar kasalardan, otomatik vezne makinelerinden ve diğer benzer cihazlardan makbuz olarak kullanılan bazı termal kağıt türleri üzerinde bir kaplama görevi görür. Polivinil klorür (PVC) endüstrilerinde ve ayrıca döküm ve kalıp yapımında kullanıldığı metal dökümhanelerinde kullanılır. İnsanların BPA'ya maruz kalmasının birincil yolunun, BPA'nın yiyecek ve içecek kaplarından göç ettiği zaman diyet yoluyla olduğuna inanılmaktadır (Schechter,A.,et.al., 2010; Vandenberg et.al., 2007). Göçün kap ısıtıldığında veya yıkandığında meydana gelmesi daha olasıdır (L.N. et.al., 2007; Le et.al., 2008). BPA maruziyetinin diğer olası kaynakları arasında hava, toz, su ve dış macunları bulunur (Vandenberg, L.N. et.al., 2007) Biyoizleme çalışmaları, test edilen idrar numunelerinin %93'ünde saptanabilir BPA seviyeleri ile BPA maruziyetinin Amerika Birleşik Devletleri'nde yaygın olduğunu göstermektedir (Calafat, A.M. et.al., 2008). BPA vücutta hızla metabolize edildiğinden yüksek tespit sıklığı, maruziyetlerin ABD nüfusu içinde düzenli olarak meydana geldiğini gösterir (Völkel, W. et.al., 2002). Bebeklerin ve 6 yaşına kadar olan çocukların BPA'ya maruz kalmalarının, daha büyük çocuklar ve yetişkinlerde BPA maruziyetlerinden daha fazla olduğu tahmin edilmektedir. BPA'ya olan bilimsel ilginin çoğu, BPA'nın endokrin bozucu bir kimyasal olabileceğini öne süren yayınlanmış araştırmalarla ilgilidir (Diamanti-Kandarakis et.al., 2009; Vom Saal et al., 2007). Endokrin bozucular, doğal olarak oluşan hormonların biyosentezine, salgılanmasına, etkisine veya metabolizmasına müdahale ederek etki eder (Diamanti-Kandarakis et al., 1996). Hormonların insan fizyolojisindeki önemi göz önüne alındığında, endokrin bozucuların çocukların sağlığını, özellikle üreme, erken ve ergen gelişimi ve davranışları üzerinde olumsuz etkileme potansiyeli konusunda bilim camiasında endişeler vardır (Diamanti-Kandarakis et.al., 2009). BPA'nın gelişimsel etkilerine yönelik son zamanlardaki ilgi, birkaç laboratuvar çalışmasına ve BPA'nın östrojenik etki uyguladığı mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına dayanmaktadır (Vom Saal et al., 2007; Golub, M.S. et.al., 2010; Welshons, W.V. et.al., 2003; Wetherill, Y.B. et.al., 2007).

Hayvan çalışmalarında, hamilelik veya emzirme döneminde yüksek düzeyde BPA'ya maruz kalma, doğum ağırlığının azalmasına, büyümenin yavaşlamasına, hayatta kalma süresinin azalmasına ve yavrularda ergenliğin

başlamasına kadar geçen sürenin gecikmesine neden oldu (Tyl, R. et al., 2002; Tyl, R.W. et al., 2008; Morrissey, R.E. et.al., 1987; Kim, J.C. et.al., 2001).

Hayvan çalışmaları ayrıca düşük doz BPA maruziyetinin insülin direnci ile ilişkili olduğunu bulmuştur (Alonso-Magdalena et.al., 2006; Batista, T.M. et.al., 2012). Ek olarak, bir çalışma, hamile hayvanlarda düşük doz BPA maruziyetinin gestasyonel diyabete benzer semptomlarla ilişkili olduğunu bulmuştur, bu da BPA maruziyetlerinin hamile kadınlarda olumsuz etkileri olabileceğini düşündürmektedir (Alonso-Magdalena et.al., 2010). Diğer çalışmalar, doğum öncesi veya erken yaşamda BPA maruziyeti ile nörolojik etkilerin yanı sıra yetişkin hayvanlarda meme ve prostat kanseri gelişimi arasında ilişkiler bulmuştur (Ho, S.M. et.al., 2006; Soto, A.M. et.al., 2008; Weber Lozada, K. et.al., 2011).

Laboratuvar hayvanlarında düşük dozda BPA'ya maruz kalmanın etkileri bilim camiasında tartışılmaktadır, bazı araştırmacılar gelişimsel bir etki bulmazken, diğerleri davranışsal ve sinirsel etkiler, anormal idrar yolu gelişimi, prostat bezinde lezyon gelişimi ve kadınlarda erken ergenlik başlangıcı gibi yan etkiler gözlemişlerdir. Düşük ve yüksek doz çalışmaları arasında puberte zamanlamasına ilişkin bildirilen sonuçlardaki farklılıklar, doz farklılıklarının, çalışma tasarımının veya hayvan türlerinin bir sonucu olabilir.



Şekil 2.15. Bisfenol-A yapısı(https://tr.wikipedia.org/wiki/Bisfenol_A).

Tablo 2.2 Bisfenol A'nın genel özellikleri (ECB, (European Chemicals Bureau), 2003).

IUPAC adlandırması	2,2-bis(4-hidroksifenil) propan
CAS numarası	80-05-7
Kimyasal formülü	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Yapısal formülü	(CH ₃) ₂ -C - (C ₆ H ₄ -OH) ₂
Moleküler ağırlığı	228.9
Erime sıcaklığı	153-156°C
Kaynama sıcaklığı	220°C (0.5 kPa)
Alevlenme sıcaklığı	270°C
Uçuculuğu	193°C (1 atm basınçta)
Log kow	3.32
Log Pow	3.32
Sudaki çözünürlüğü (25°C)	120 mgL ⁻¹

2.12 Glutaraldehit

Glutaraldehit (GA), yapısında bulunan Schiff bazları aracılığıyla enzim immobilizasyonunda en yaygın kullanılan amin çapraz bağlanma reaktifidir (Shi et al., 2011). Glutaraldehit sulu çözeltilerde kolaylıkla çözünebilir, beş karbonludur ve doymuş bir aldehittir. Glutaraldehit, ışığa karşı dayanıklı olmasına karşın hava ile temas edildiğinde kolaylıkla oksitlenebilir ve zehirlidir. Solunulması özellikle tehlikelidir. Sulu çözeltilerinde stabilitesi ortamın sıcaklığından ve pH parametrelerinden etkilenmektedir. Artan sıcaklık ve pH glutaraldehit stabilitesini bozar ama özellikle pH 9 üzerinde anlamlı bir aldehit grup kaybı yaşanmaktadır (Smith and Wang, 2006).

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Cihaz ve diğer ekipmanlar

Yapılan çalışmada PalmSens Ins. marka potansiyostat; BASI MF2010 model Karbon Pasta (CPE) çalışma elektrodu, CHI 111 model Ag/AgCl doymun referans elektrodu, BASI MW-1032 model platin yardımcı elektrodu; Eppendorf 20, 50, 100, 1000 ve 5000 mL'lik otomatik pipetleri, Lauda marka soğutmalı sirkülasyonlu termostat, Yellow line manyetik karıştırıcı, Hanna marka pH metre kullanıldı.

3.1.2 Kimyasalar

Grafit, mineral yağ, çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) (200 mg, H₂SO₄/HNO₃ (3:1, 50 ml) karboksilasyon yapıldı.), EDC, NHS, Miyogloblin (at iskelet kası), glutaraldehit, H₂O₂, BPA, etanol, potasyum fosfat monobazik, potasyum klorür, potasyum hidroksit, Sigma Chemical (USA)'dan, H₂O₂ (% 30) Riedel-de Haeg'den temin edilmiştir, potasyum ferrosiyanyür(10 mM K₄[Fe(CN)₆]), sodyum asetat, tris, hidroklorik asit, sodyum hidroksit, sülfürik asit, nitrik asit, sodyum fosfat monobazik, sodyum klorür, askorbik asit, dopamin, tirozin, glukoz.

Deneyisel çalışmalarda kullanılan çözeltiler aşağıda belirtilmiştir:

50 mM Potasyum fosfat tamponları (pH:6,0- 6,5 -7,0 -7,5-8,0)

25, 50 ve 100 mM Potasyum fosfat tamponları (pH: 7,0)

50 mM Glisin tamponları (pH: 8,5-9,0)

50 mM Sitrat tamponları (pH: 5,0-5,5)

50 mM Tris-HCl tamponu (pH: 7,0)

50 mM Sodyum fosfat tamponu (pH: 7,0)

3 M KCl

Miyogloblin(5 mg/ml miyogloblin pH:7,0 Fosfat tamponunda çözüldü.)

H₂O₂ (10 mM 10 ml H₂O₂ 10 mM K₄[Fe(CN)₆]içeren pH:7,0 Fosfat tamponunda hazırlandı)

BPA(100 ppm BPA (10 mg BPA, 5 ml etanol ve 95 ml bidistile suda çözüldü))

Glutaraldehit (%2,5)

EDC (100 mM 1 ml EDC pH 6,5 50 mM Fosfat tamponunda hazırlandı.)

NHS (25 mM 1 ml NHS pH 6,5 50 mM Fosfat tamponunda hazırlandı.)

3.2 Yöntem

3.2.1 Çok Duvarlı Karbon Nanotüp(MWCNT) Karboksilasyonu

200 MWCNT H₂SO₄/HNO₃(3:1, 50 ml) ile muamele edildi.

3 saat 60 °C sonike edildi.

Çökelek bidistile su ile yıkandı, yeniden süspanse edildi ve 30 dakika 9000 rpm'de santrifüjlendi.

Üst faz alındı, çökelek ile işleme devam edildi, bu işleme pH:7,0 olana kadar devam edildi.

100 derecede 1-2 saat etüvde kurutuldu. Oda sıcaklığında saklandı.

MWCNT bu işlemlerin sonunda karboksillenmiş oldu ve kullanıma hazır hale geldi.

3.2.2 Biyosensörün hazırlanması

3.2.2.1 Karbon Pasta Elektrodun Hazırlanması

75 mg grafit tozu, 25 mg mineral yağı ve 10 mg karboksilasyonu yapılmış MWCNT karıştırılarak saat camında iyice homojen hale getirilir.

Elektrot, hazırlanmış olan pasta ile doldurulur.

Beyaz kağıt yardımıyla elektrot yüzeyi pürüzsüz ve parlak hale getirilir.

3.2.2.2 Biyoaktif Tabakanın Oluşturulması

MWCNT modifiye karbon pasta elektrodu COOH aktivasyonu için

EDC/NHS ile muamele edildi;

*100 mM 1 ml EDC pH 6,5 50 mM Fosfat tamponunda hazırlandı.

* 25 mM 1 ml NHS pH 6,5 50 mM Fosfat tamponunda hazırlandı.

EDC'den \Longrightarrow 400 μ L

NHS'den \Longrightarrow 100 μ L olacak şekilde ependorf tüplerine alındı,

elektrotlar EDC-NHS karışımı içeren ependorf tüplerine daldırıldı, 30 dk karanlık ortamda bekletildi. Sonrasında bidistile suyla elektrot yüzeyi durulandı ve kurumaya bırakıldı.

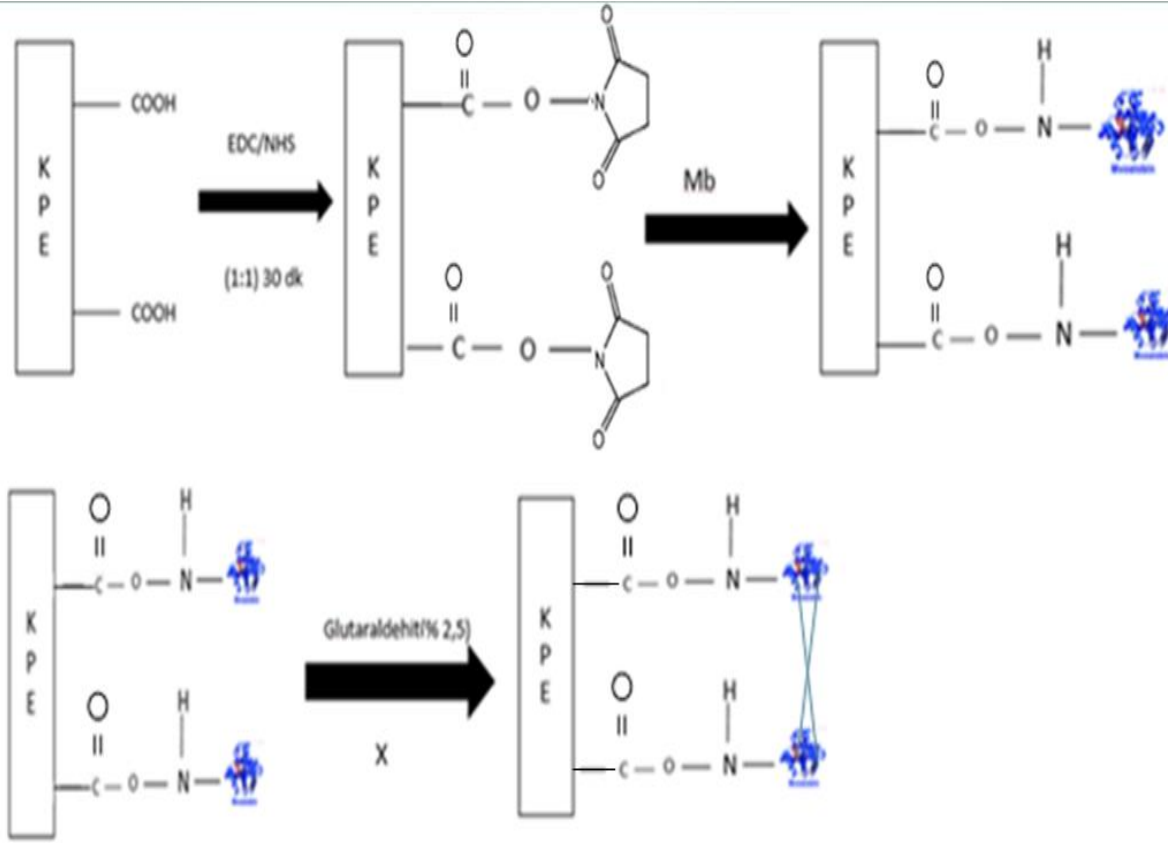
Elektrot yüzeyi kuruduktan sonra, 5 mg/ml Miyoglobin pH: 7,0 Fosfat tamponunda çözülüp, elektrot yüzeyine 50 mikrolitre damlatıldı, oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Aktivasyonu yapılmış MWCNT karboksil uçlarıyla miyoglobin proteinindeki amino grupları kovalent bağlanmış olur.

% 2,5'lük glutaraldehit çözeltisi içeren ependorf tüplerine elektrotlar (pH:7,0 Fosfat tamponunda) 5 dk yavaşça daldırıp çıkarıldı. Hazırlanan biyoaktif tabaka bifonksiyonel reaktif olan glutaraldehit çözeltisi ile çapraz bağlanarak immobilizasyon tamamlanmış olur.

Çapraz bağlanma yapmayan moleküllerin uzaklaştırılması için elektrot yüzeyi bidistile su ile yıkanır ve durulanır, oda sıcaklığında kurumaya bırakılır.

KPE/MWCNT/Mb/GA modifiye elektrot kullanılmadığı zamanlarda +4°C'de saklanır.

Mb temelli biyosensörün immobilizasyon aşamaları Şekil 3.1'de gösterilmektedir.



Şekil 3.1. Miyogloblin temelli biyosensörün immobilizasyon aşamaları.

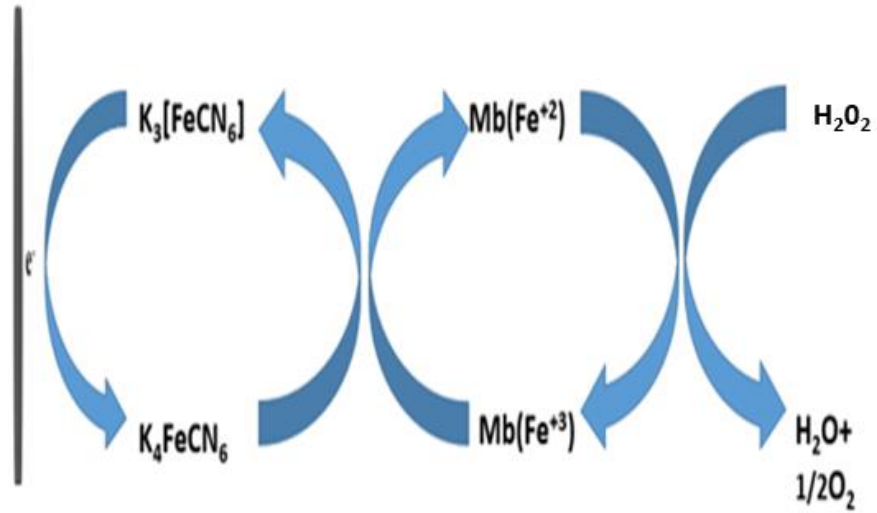
3.2.3 Biyosensörün Çalışma Prensibi

KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye Elektrot

Bu çalışmada miyogloblindeki hem grubunun H_2O_2 ile verdiği tepkimeden yararlanılmıştır. Substrat olarak H_2O_2 kullanıldığı zaman miyogloblinin gerçekleştirdiği tepkimenin net denklemi aşağıda verilmiştir. (Şekil 3.2) Hazırlanan miyogloblin temelli biyosensörün çalışma ilkesi; (0,15 & +0,65) V potansiyel aralıkta hidrojen peroksidin miyogloblindeki hem grubu ile reaksiyonu sonucu oluşan ferrik iyonunun ortamda bulunan $K_4[Fe(CN)_6]$ tarafından ferröz demire indirgenmesi ve bu arada oluşan elektronların karbon pasta elektrot yüzeyine aktarılmasıdır. Meydana gelen tepkime uyarınca H_2O_2 'nin suya indirgenmesi sırasında miyogloblinin porfirin halkasındaki demir atomu Fe^{+2} den Fe^{+3} 'e yükseltgenir. Fe^{+3} 'in Fe^{+2} 'ye indirgenmesi ortamdaki mediatör olan

$K_4[Fe(CN)_6]$ ile sağlanmıştır. Çalışma hücresinde bulunan potasyum fosfat tamponuna $K_4[Fe(CN)_6]$ eklenmiştir. Ortamda bulunan BPA ise miyoglobinle etkileşerek miyoglobinin 3 boyutlu yapısında küçük değişime neden olur. Bu değişim hem grubunu etkileyerek miyoglobinin H_2O_2 etkisini azaltıcı bir etki göstermektedir. Bu nedenle BPA konsantrasyonu arttıkça hem grubu fonksiyonu azaldığı için H_2O_2 yükseltgenmesi de azalır, bu durum biyosensörde akım değerlerinin düşmesi ile sonuçlanır. Tasarlanan biyosensörün ölçüm prensibi Şekil 3.2 de gösterilmiştir.

Kullanılan üçlü elektrot sisteminde gerçekleşen redoks reaksiyonları bir potansiyostat ile akımdaki değişimler olarak gözlenir. Söz konusu potansiyostat bir bilgisayara bağlıdır ve elektrokimyasal tabanlı bir yazılımla çalışmaktadır. Belli derişimdeki hidrojen peroksit ile ölçüm alınır sonrasında belli konsantrasyonlarda Bisfenol-A(BPA) eklenir ve H_2O_2 -BPA'nın akım farklanması üzerinden BPA'nın inhibisyon etkisine dayanarak BPA tayini yapılır.



Şekil 3.2. Tasarlanan miyoglobin temelli biyosensörün ölçüm prensibi.

3.2.4 Miyoglobin temelli H_2O_2 biyosensörünün ölçüm düzeneği

Çalışmadan önce termostat $25^\circ C$ 'ye ayarlanır, çalışma tamponu reaksiyon hücresine konur ve 3'lü elektrot sistemi tampona daldırılarak yaklaşık 10 dakika

elektrotun ortam sıcaklığına uyum sağlaması için beklenir. Elektrotun uyum sağlaması için gereken süre tamamlandığında ölçümün gerçekleştirildiği değerler programda ayarlanarak hazırlanan hidrojen peroksit, BPA ve tampon çözeltileri reaksiyon hücresine eklenerek akımdaki değişim gözlenir ve elde edilen bu cevap bilgisayara kaydedilir. Daha sonra çalışma tamponu dökülerek elektrotlar ve reaksiyon hücresi yeni ölçüm için saf suyla yıkanır. Reaksiyon hücresi tekrar tampon ve hidrojen peroksit ile doldurulur ve substrat konsantrasyonu artırılarak ölçüme devam edilir. Substrat konsantrasyonu arttırıldıkça standartlar için alınan ölçümlerde zamana karşı akımdaki farklanmalar da artar. Ölçüm tamamlandığında elektrot yıkanır ve bir sonraki ölçüme kadar +4°C'de buzdolabında saklanır.

3.3 Yalın Karbon Pasta Elektrota Yönelik Çalışma

KPE Mb ile modifiye edilmeden önce yalın bir şekilde 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 50 mM, pH: 7,0 potasyum fosfat tamponunda ve 25 °C sabit sıcaklıkta, (-0.15) V & (+0.35) V potansiyel aralığında DPV yöntemi ile ölçümler alınmıştır. Ölçümler Baseline, 500 μ M hidrojen peroksit, 500 μ M BPA ve 500 μ M hidrojen peroksit ile 500 μ M BPA birlikte olacak şekilde alınmıştır. Amaç, çıplak elektrotta immobilizasyon yapılmadan H_2O_2 ve BPA'nın nasıl etki ettiğini ve H_2O_2 -BPA akım farkına bağlı modifiye elektrot ile nasıl farklılandığını incelemektir.

3.4 Çalışmada Tasarlanan Miyogloblin Temelli Biyosensörün Karakterizasyonuna Yönelik Çalışmalar

3.4.1 KPE/MWCNT/ Mb/GA Modifiye Biyosensörün DV Karakterizasyonu

Modifiye biyosensörün yüzey karakterizasyonu çalışması için; her immobilizasyon aşamasından sonra 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 50 mM, pH: 7,0 potasyum fosfat tamponunda ve 25 °C sabit sıcaklıkta, (-0.5) V & (+0.8) V potansiyel aralığında DV yöntemi ile ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Tasarlanan miyoglobin temelli biyosensörün DV karakterizasyon aşamaları aşağıdaki gibidir;

- i. Yalın KPE'nin yüzey karakterizasyonunun yapılması
- ii. KPE/MWCNT modifiye elektrodun H_2O_2 ve BPA içeren ortamda yüzey karakterizasyonunun yapılması
- iii. KPE/MWCNT/EDC-NHS sonrası modifiye elektrodun H_2O_2 ve BPA içeren ortamda yüzey karakterizasyonunun yapılması
- iv. KPE/MWCNT/EDC-NHS/Mb modifiye elektrodun H_2O_2 ve BPA içeren ortamda yüzey karakterizasyonunun yapılması
- v. KPE/MWCNT/EDC-NHS/Mb/GA modifiye elektrodun H_2O_2 ve BPA içeren ortamda yüzey karakterizasyonunun yapılması
- vi. Modifikasyon aşamalarının karakterizasyonunun ardından 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 50mM, pH:7,0 potasyum fosfat tamponunda (-0.5) V & (+0.8) V potansiyel aralığında 500 μ M hidrojen peroksit ve 500 μ M BPA içeren ortamda biyosensörün akım farkına bağlı cevabının karakterizasyonu için DV ölçümü alındı. Bulunan verilere göre immobilizasyon aşamalarının karbon pasta elektrot yüzeyinde oluşturduğu değişimler gözlemlendi.

3.4.2 KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye Biyosensörün Tarama Hızı Karakterizasyonu

Hazırlanan biyosensörün tarama hızının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 50 mM, pH:7,0 potasyum fosfat tamponunda 25 °C sabit sıcaklıkta, (-0.7) V & (+0.7) V potansiyel aralığında 500 μ M H_2O_2 ve 500 μ M BPA içeren ortamda DV yöntem kullanılarak 10, 25, 50, 100, 200, 300 mV/s tarama hızında ölçüm alındı.

3.5 KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye Biyosensörün Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyonu

3.5.1 Miyoglobin Miktarının Biyosensör Cevabı Üzerine Etkisi

Miyoglobin miktarının biyosensör cevabını nasıl etkilediğini incelemek amacıyla karbon pasta hazırlarken sırasıyla 2,5; 5 ve 10 mg/ml miyoglobin kullanıldı. Çalışmalar 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren pH: 7,0; 50mM potasyum fosfat tamponunda 500 μM H_2O_2 ve 500 μM H_2O_2 ile birlikte aynı ortamda sırasıyla 100, 250, 500, 750, 1000 μM BPA olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Ölçümler 25 °C sabit sıcaklıkta (-0.15) V & (+0.65) V potansiyel aralığında DPV metodu kullanılarak H_2O_2 -BPA akım farkına bağlı olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçların ışığında en uygun miyoglobin miktarı belirlenmiştir.

3.5.2 MWCNT Miktarının Biyosensör Cevabı Üzerine Etkisi

MWCNT miktarının biyosensör cevabına etkisini incelemek amacıyla karbon pasta içinde 5, 10 ve 20 mg karboksillenmiş MWCNT kullanıldı. Ölçümler, 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda 500 μM H_2O_2 ve 500 μM H_2O_2 ile birlikte aynı ortamda sırasıyla 100, 250, 500, 750, 1000 μM BPA olacak şekilde ve 25 °C sabit sıcaklıkta (-0,15) V & (+0,65) V potansiyel aralığında DPV metodu kullanılarak H_2O_2 -BPA akım farkına bağlı olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçların ışığında en uygun MWCNT miktarı belirlenmiştir.

3.6 Miyoglobin Temelli Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

3.6.1 Tasarlanan Miyoglobin Temelli Biyosensör İçin Optimum pH Belirlenmesi

Tasarlanan miyoglobin temelli biyosensörün optimum pH değerinin belirlenmesi için farklı pH'lardaki tampon çözeltileri kullanılarak 500 μM BPA ve 500 μM H_2O_2 için ölçümler alınmıştır. Denemede kullanılan, pH: 5,0; 5,5 denemeleri için sodyum sitrat tamponu, 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 denemeleri için

potasyum fosfat tamponu ve pH: 8,5; 9,0 denemeleri için glisin tamponu kullanılmıştır. Deneysel çalışmalar (-0,15) V & (+0,65) V potansiyel aralığında DPV yöntemi kullanılarak 25 °C sabit sıcaklıkta H₂O₂-BPA akım farkına bağlı olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara bakılarak biyosensör çalışması için en uygun pH değeri belirlenmiştir.

3.6.2 Tasarlanan Miyoglobin Temelli Biyosensör İçin Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Çalışmada, miyoglobin temelli biyosensörünün optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla sırasıyla 20, 25, 30, 35 ve 40 °C 'de 500 µM BPA ve 500 µM H₂O₂ için ölçümler alınarak tasarlanan biyosensörün farklı sıcaklık değerlerine gösterdiği değişimler incelendi. Yapılan sıcaklık denemeleri düşükten yükseğe doğru olacak şekilde 10 mM K₄[Fe(CN)₆] içeren pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda (0,15) V & (+0,65) V potansiyel aralığında DPV metodu kullanılarak H₂O₂-BPA akım farkına bağlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.6.3 Tasarlanan Miyoglobin Biyosensörüne Farklı Tamponların etkisi

Optimum pH değeri belirlenen biyosensörün bu pH değerine sahip farklı tamponların biyosensör cevabı üzerine etkisini incelemek amacıyla KH₂PO₄, NaH₂PO₄ ve Tris-HCl tamponlarında 500 µM H₂O₂ ve 500 µM H₂O₂ ile birlikte aynı ortamda sırasıyla 100, 250, 500, 750, 1000 µM BPA olacak şekilde ölçümler alındı. Kullanılan tamponların konsantrasyonları aynı olup (10 mM K₄[Fe(CN)₆] içeren 50 mM, pH: 7,0 tamponları) ölçümler (-0,15) V & (+0,65) V aralığında DPV yöntemi kullanılarak 25 °C sabit sıcaklıkta H₂O₂-BPA akım farkına bağlı olarak yapılmıştır. Çalışmayla Mb temelli biyosensör için en uygun tampon sistemi belirlenmiştir.

3.6.4 Tasarlanan Miyoglobin Biyosensörüne Farklı Tampon Konsantrasyonlarının Etkisi

Hazırlanan biyosensör üzerine çalışma tamponunun farklı konsantrasyonlarının nasıl etki ettiğini incelemek amacıyla 25, 50, 100 mM

potasyum fosfat tamponlarında 500 μM H_2O_2 ve 500 μM H_2O_2 ile birlikte aynı ortamda sırasıyla 100, 250, 500, 750, 1000 μM BPA olacak şekilde ölçümler alındı. 10 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ içeren, pH: 7,0 tamponlarında ölçümler (-0,15) V & (+0,65) V aralığında DPV yöntemi kullanılarak 25 °C sabit sıcaklıkta H_2O_2 -BPA akım farkına bağlı yapılmıştır. Bu çalışma ile biyosensör için en uygun tampon konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.7 KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları

3.7.1 Bisfenol-A için doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

3.7.1.1 KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye biyosensörün BPA için doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Yapılan denemelerde 10 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ içeren 50mM, pH:7,0 potasyum fosfat tamponunda 25 °C sabit sıcaklıkta sadece 500 μM H_2O_2 ve 500 μM H_2O_2 ile birlikte aynı ortamda bulunan sırasıyla 100, 250, 500, 750, 1000 μM BPA konsantrasyonları için (-0.15) V & (+0.65) V potansiyel aralıkta DPV yöntemi ile H_2O_2 -BPA akım farkına bağlı ölçümler alınmıştır. Çizilen kalibrasyon grafiğinin yardımıyla miyogloblin temelli biyosensörün BPA için doğrusal tayin aralığı belirlenmiştir.

3.7.2 Miyogloblin Temelli Biyosensörün Tekrarlanabilirliğine Yönelik Denemeler

3.7.2.1 KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye biyosensörün tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi

Hazırlanan biyosensörün tekrarlanabilirliğinin incelenmesi amacıyla 500 μM H_2O_2 ve 500 μM BPA içeren ortamda (-0.15) V & (0.65) V arasında DPV yöntemi ile 10 adet ölçüm alındı ve H_2O_2 -BPA akım farkına bağlı hesaplamalar

gerçekleştirildi. Bulunan sonuçlardan yola çıkılarak ortalama değer (\bar{x}), standart sapma ($\pm S.S.$) ve % varyasyon katsayısı (% V.K.) belirlenmiştir.

3.7.3 KPE/MWCNT/ Mb/GA Modifiye Biyosensör için Substrat Spesifikliği Çalışması

BPA tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün substrat spesifikliğini araştırmak için sadece 500 μM H_2O_2 ile, ve 500 μM H_2O_2 ile aynı ortamda 500 μM konsantrasyonlarda tirozin, glukoz, askorbik asit, dopamin ve BPA bulunan, 10 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ içeren pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda ve 25 °C sabit sıcaklıkta ölçüm alınmıştır. Alınan ölçümlerin sonucunda, H_2O_2 ve BPA'nın verdiği biyosensör cevabı % 100 kabul edilip, diğer substratlar için elde edilen biyosensör cevaplarının yüzdeleri ile kıyaslandı.

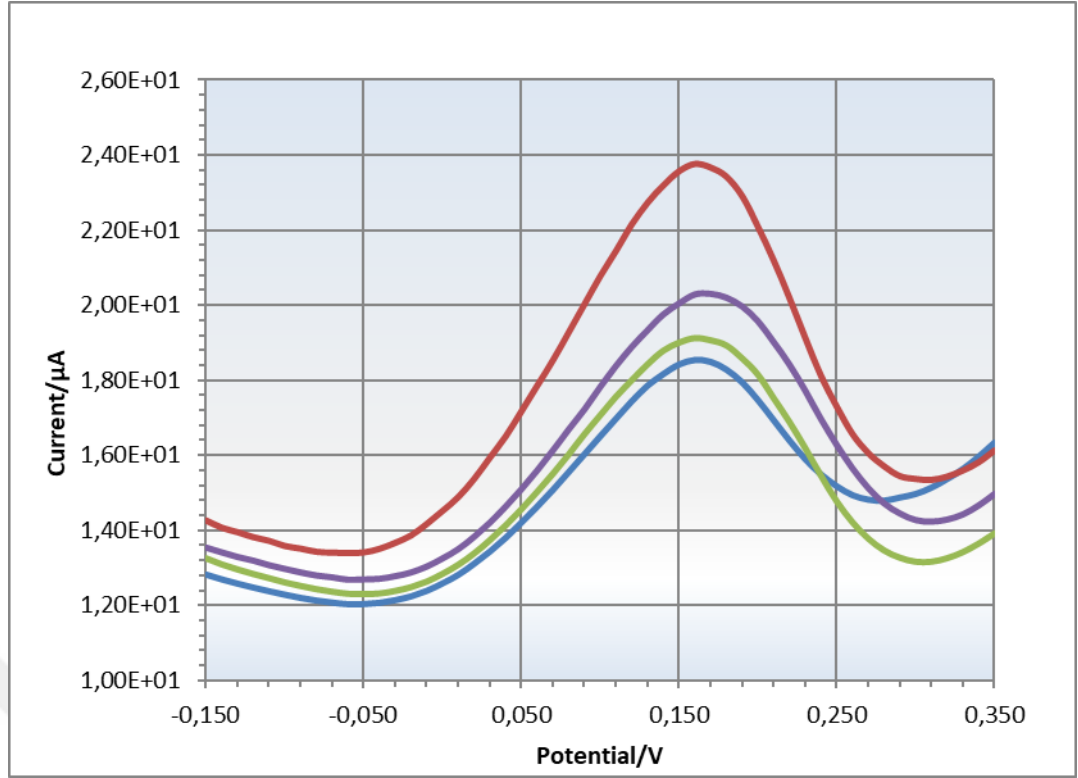
3.7.4 KPE/MWCNT/ Mb/GA Modifiye Biyosensör ile Örnek Tayini

Hazırlanan miyoglobin temelli biyosensör ile örnek tayini yapılması için 6 ay kadar bekletilen damacana su kullanıldı. 10 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ içeren pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda, sadece 500 μM H_2O_2 ve 500 μM H_2O_2 ile birlikte BPA ve Damacana Su katılarak ölçüm alınmıştır. Ölçümler (-0,15) V & (+0,65) V arasında DPV yöntemiyle ve 25 °C sabit sıcaklıkta akım farkına bağlı olarak elde edilmiştir. Bulunan sonuçlardan yola çıkılarak ortalama değer (\bar{x}), standart sapma ($\pm S.S.$) ve % varyasyon katsayısı (% V.K.) belirlenmiştir.

4.SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 Yalın Karbon Pasta Elektrota Yönelik Yapılan DPV Ölçümü Deneyinde Elde Edilen Sonuçlar

Miyoglobin temelli biyosensörün immobilizasyonundan önce yalın elektrodun H_2O_2 ve BPA' ya verdiği cevapları incelemek için bu deney yapılmıştır. 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda (-0.15) V & (+0.35) V potansiyel aralığında ve 25 °C sabit sıcaklıkta DPV ölçümleri alınmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1 'de gösterilmiştir. En yüksek pik 500 μM H_2O_2 varlığında, en düşük pik ise baselineda alınmıştır. Ortamda 500 μM H_2O_2 varken, tampon içindeki mediatör varlığı olsa bile, miyoglobindeki peroksidaz etkisi olmadığı için H_2O_2 nin de H_2O ve O_2 'ye dönüşümü gerçekleşmez, H_2O_2 'in verdiği pik elde edilmiş olur. H_2O_2 ve BPA birlikte aynı ortamda iken ise BPA'nın Mb üzerine göstermiş olduğu etkiye benzer bir etki gözlenmemiştir ve akım farklanmasında azalma gözlenmiştir. Bu sonuç Mb modifiye biyosensör ile alınan sonuçlarla kıyaslandığında BPA'nın miyoglobin üzerine olan net etkisini ve bu etki vasıtasıyla Mb modifiye biyosensör ile BPA tayini yapılabileceğini de göstermiştir.

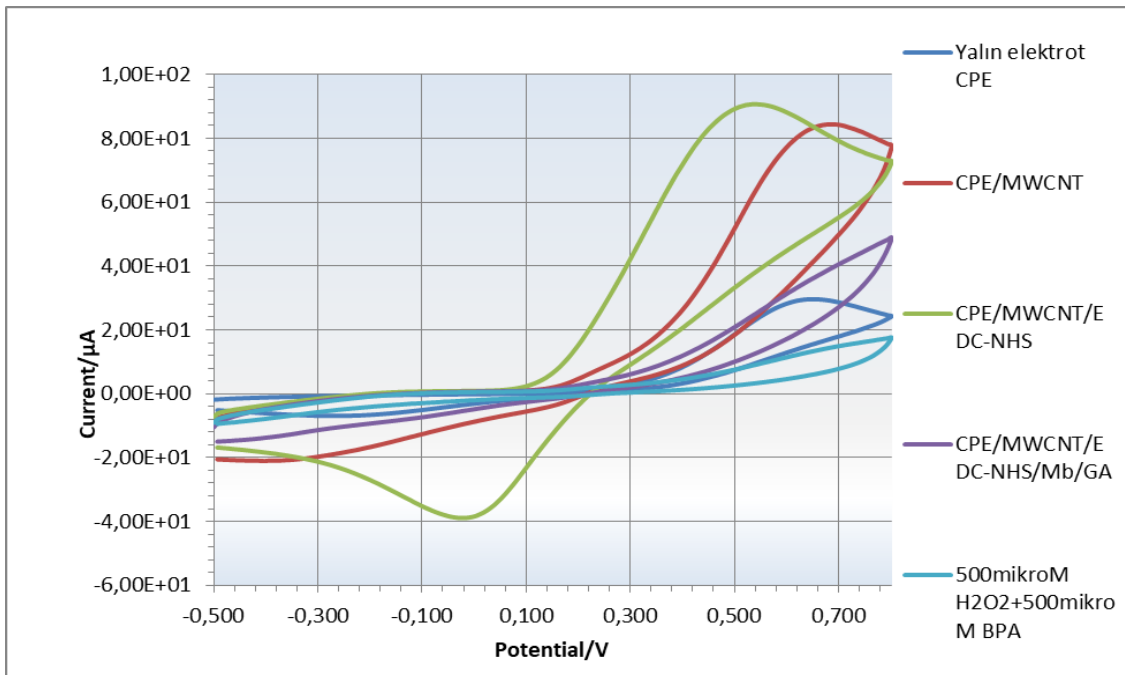


Şekil 4.1. Yalın Karbon Pasta Elektrota Yönelik Yapılan DPV Ölçümleri. Mavi: Baseline Kırmızı: 500 μM H_2O_2 ile alınan DPV ölçümü Yeşil: 500 μM H_2O_2 ve 500 μM BPA ile alınan DPV ölçümü Mor: 500 μM BPA ile alınan DPV ölçümü. Ölçümler pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ortamında (-0,15) V & (+0,35) V potansiyelleri arasında alınan DPV ölçümleri ile 25 ° C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

4.2 KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye Biyosensörün DV Karakterizasyonuna İlişkin Olarak Yapılan Deneylerde Elde Edilen Sonuçlar

Miyoglobin temelli biyosensörün immobilizasyonunun her bir aşamasında DV karakterizasyonu için; 10 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ içeren pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda (-0,5) V & (+0,8) V potansiyel aralığında ve 25 °C sabit sıcaklıkta döngüsel voltammogram ile ölçümler alındı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.2 'de gösterilmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde immobilizasyon öncesi yalın elektroda ait yükseltgenme piklerinin 0,6 V potansiyelinde olduğu gözlenmektedir. MWCNT immobilizasyonu sonrası akım değerinde yalın elektroda göre artış gözlemlenmiştir. MWCNT beklenildiği gibi iletkenliği arttırarak akım artışı sağlamıştır. EDC-NHS muamelesi sonrası çok az bir akım

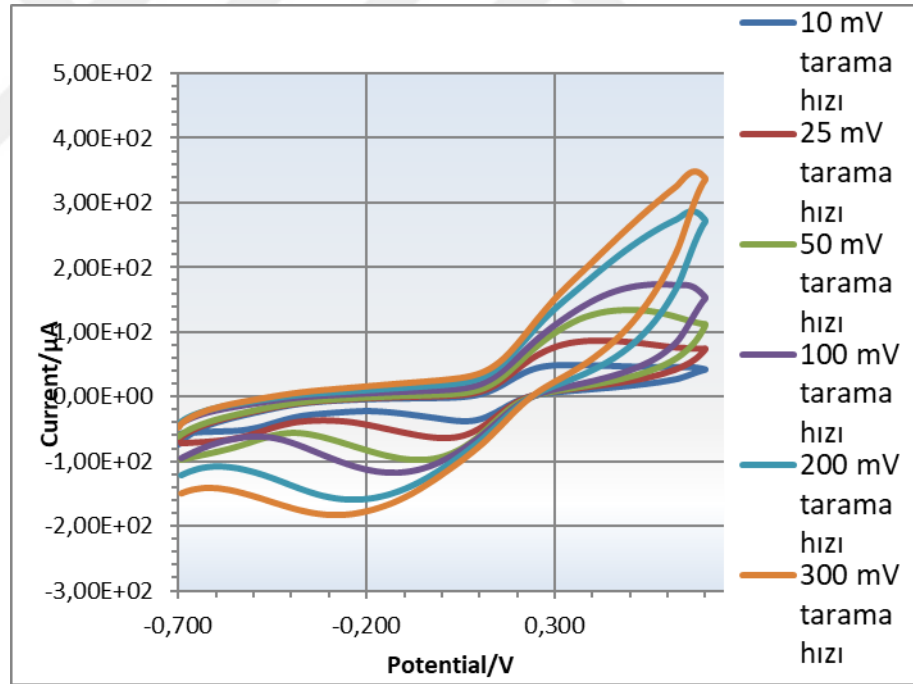
artışı görülmüştür. Burada akım piki potansiyelinin 0,6 V'tan 0,52 V'a kaydığı görüldü. Miyogloblin ve Glutaraldehit immobilizasyonundan sonra pikte azalma gözlenmiştir. Bu durum EDC-NHS aktivasyonu sonrası MWCNT ile miyogloblinin arasında immobilizasyonun gerçekleştiğinin de bir göstergesidir. İmmobilizasyon sonrası hazırlanan elektrodun (500 μ M BPA ve 500 μ M H₂O₂) ile alınan ölçümde akım piki en düşük değerini vermiştir. Bu sonuç BPA'nın Mb üzerine etkisini göstermektedir. Diferansiyel puls voltametri sonuçları ve döngüsel voltametri sonuçlarının her ikisinde de BPA'nın akım değerini azalttığı görülmüştür.



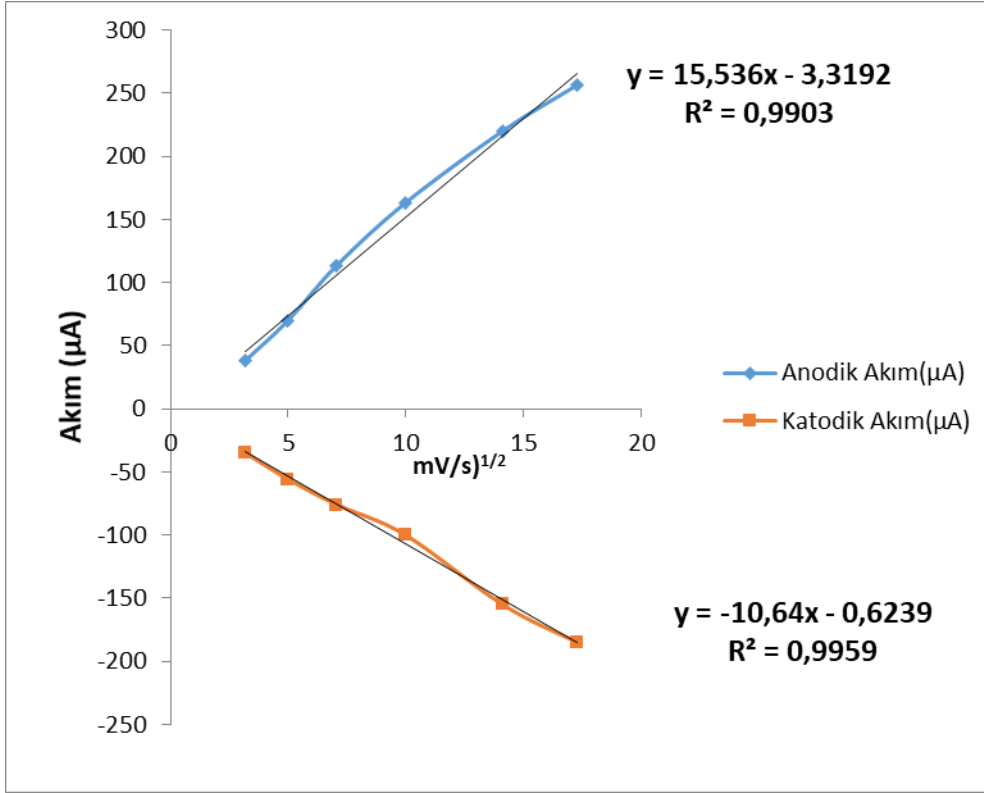
Şekil 4.2. Tasarlanan miyogloblin temelli biyosensörün yüzey modifikasyonuna ilişkin DV voltammogramları. **Koyu mavi:** Yalın CPE, **Kırmızı:** MWCNT modifiye CPE, **Yeşil:** MWCNT/ EDC-NHS modifiye CPE, **Mor:** MWCNT/ EDC-NHS/Mb/GA modifiye CPE, **Açık Mavi:** MWCNT/ EDC-NHS/Mb/GA modifiye CPE ile 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.)

4.2.1 KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye Biyosensörün Tarama Hızı Karakterizasyonu

Tasarlanan miyoglobin temelli biyosensörün cevabı üzerine tarama hızının etkisini incelemek amacıyla 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda (-0,7) V & (+0,7) V potansiyelleri arasında (500 μ M H_2O_2 ve 500 μ M BPA) konsantrasyonunda 10-300 mV aralığında tarama hızlarında döngüsel voltammogram ile ölçümler alındı. Elde edilen veriler Şekil 4.3 ve Şekil 4.4 'de gösterilmiştir. Sonuçlara bakıldığında hazırlanan biyosensör için tarama hızının artmasına bağlı olarak akım değerinin arttığı dolayısıyla elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektron difüzyonun orantılı bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Bu sonuç biyosensör için reaksiyonların difüzyon kontrollü gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 4.3. Tarama hızının biyosensör cevabı üzerine etkisi. Tarama hızlarına ait döngüsel voltammogram sonuçları. Ölçümler pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ ortamında (-0,7) V & (+0,7) V potansiyelleri arasında 25 ° C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.4. Tarama hızının biyosensör cevabı üzerine etkisi. Döngüsel voltammogramdan elde edilen sonuçların anodik ve katodik yöndeki doğrusal grafikleri. Ölçümler pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ ortamında (-0,7) V & (+0,7) V potansiyelleri arasında 25 ° C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

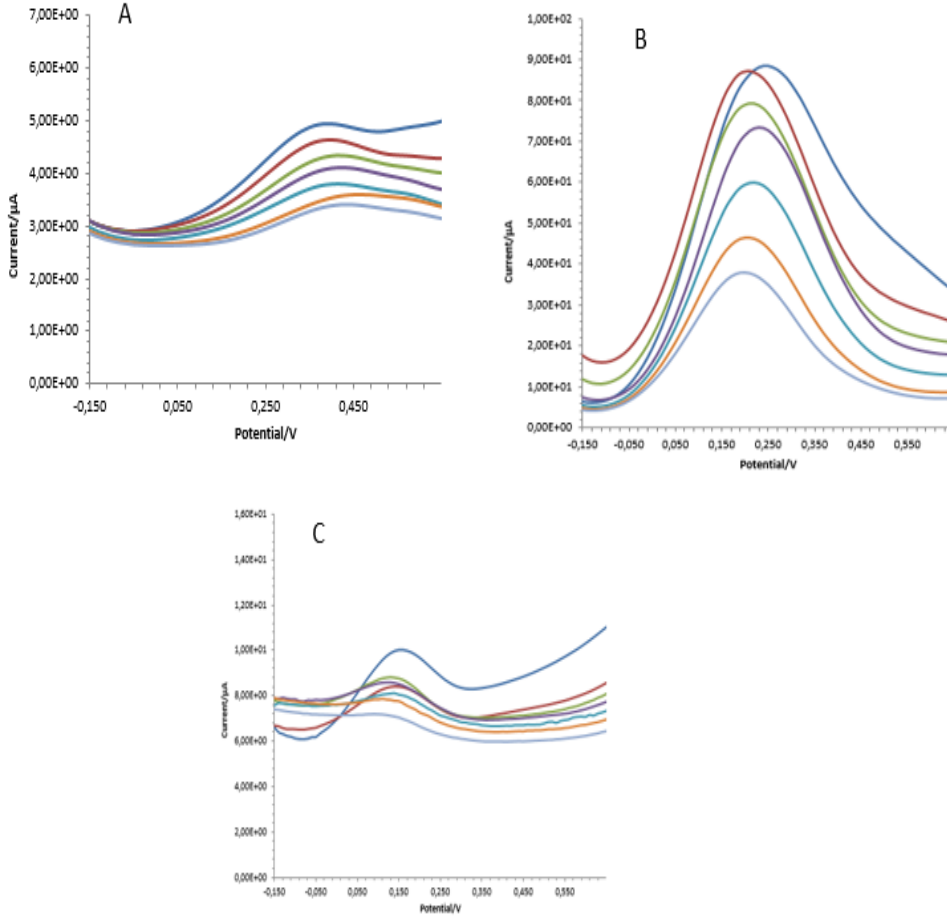
4.3 KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye Biyosensörün Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyonu

4.3.1 Miyoglobin Miktarının Biyosensör Cevabı Üzerine Etkisi

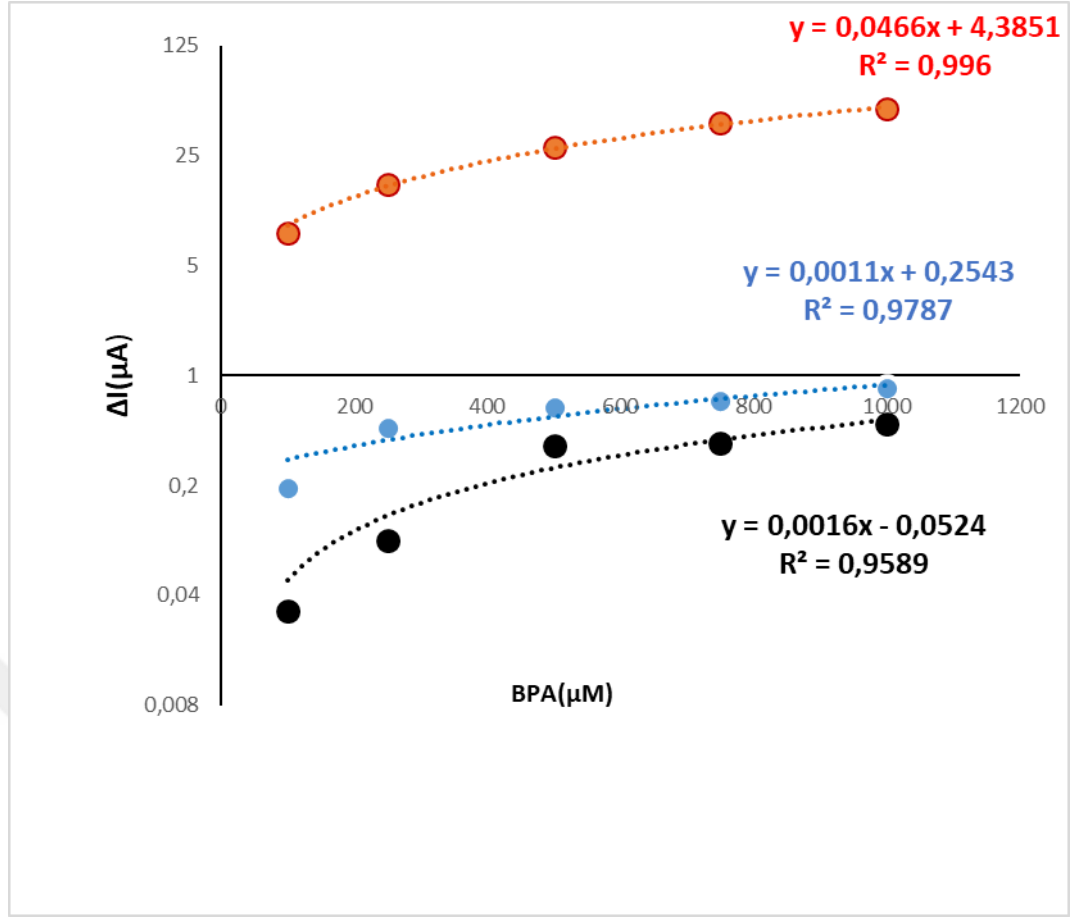
Miyoglobin miktarının biyosensör cevabına etkisini incelemek amacıyla karbon pastayı hazırlarken sırasıyla 2,5; 5; 10 mg/ml miyoglobin ilave edilmiştir. Çalışmalar 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren pH: 7,0; 50mM potasyum fosfat tamponunda ve 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Denemeler , (-0.15)V & (+0.65)V potansiyel aralığında DPV metodu kullanılarak gerçekleştirilmiş olup, elde edilen sonuçlar ile standart grafik çizilmiştir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6). Alınan ölçümler doğrultusunda çizilen standart grafiklerden anlaşılacağı üzere en yüksek

akım farklanması ve en doğrusal grafiğin 5 mg/ml miyoglobin ile hazırlanan elektrot ile alındığı gözlenmektedir. 2,5 mg miyoglobin miktarı ile hazırlanan elektrotun ölçümleri sonucunda azalan miyoglobin miktarına bağlı olarak akım farkı değerinde düşüş gözlenmektedir. Bu durum 2,5 mg/ml miyoglobin miktarının BPA'nın miyoglobin üzerine olan etkinliğinin belirlenebilmesi için yeterli olmadığını göstergesidir. 10 mg/ml miyoglobin miktarı için, artan konsantrasyona bağlı olarak akım değerinde düşüş gözlenmektedir ve sonuçların ideallikten uzaklaştığı görülmektedir. Miyoglobin miktarının idealden fazla olması BPA'nın 2,5 mg/ml ve 5,0 mg/ml miyoglobin ile hazırlanan biyosensörlere nazaran karbon pastada yer alan miyoglobinlerin tamamı ile etkileşime girememesinden olabilir. Sonuç olarak, aynı BPA konsantrasyonları için Mb ile etkileşime girme kapasitesi 2,5 mg/ml Mb ve 10 mg/ml Mb için doğrusal grafikler verecek etkinlikte değildir diyebiliriz.

Şekil 4.5 ve 4.6'dan da anlaşılacağı gibi en ideal sensör cevabı 5 mg/ml Mb çözeltisi ile hazırlanmış olan biyosensörle elde edilmiştir.



Şekil 4.5. Miyogloblin temelli biyosensörün farklı miyogloblin miktarı ile çalışmalarından elde edilen DP voltammogramları. 2,5 mg/ mL miyogloblin ile hazırlanan elektrot (A), 5 mg/ mL miyogloblin ile hazırlanan elektrot (B), 10 mg/ mL miyogloblin ile hazırlanan elektrot (C). Ölçümler 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 50 mM fosfat tamponunda ve pH 7,0; 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.



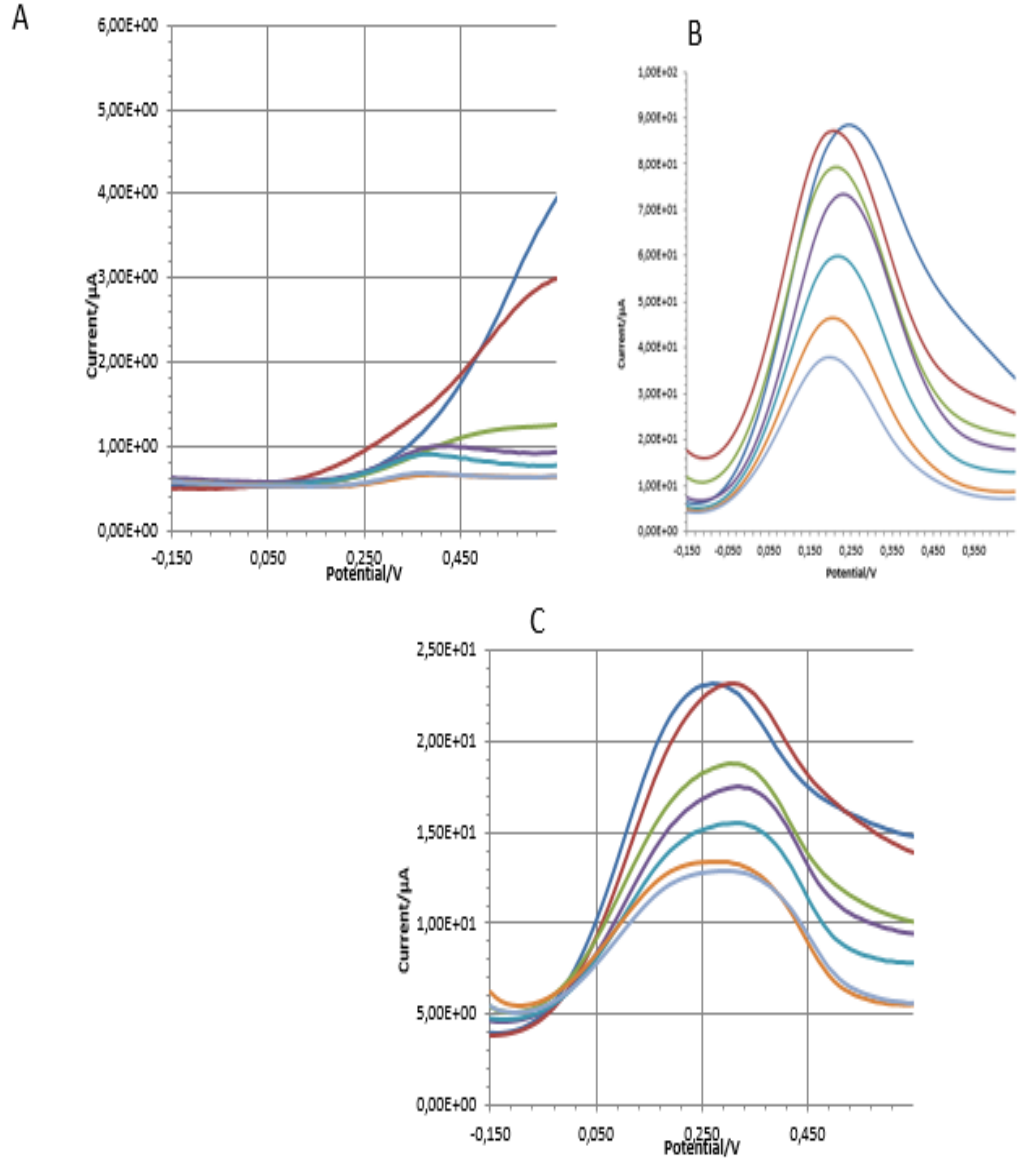
Şekil 4.6. Miyogloblin miktarı optimizasyon grafiği. **Kırmızı:** 5 mg/ mL miyogloblin kullanılarak hazırlanan biyosensör, **Siyah:** 10 mg/ mL miyogloblin kullanılarak hazırlanan biyosensör, **Mavi:** 2,5 mg/ mL miyogloblin kullanılarak hazırlanan biyosensör. Ölçümler 10 mM K₄[Fe(CN)₆] içeren 50 mM Fosfat tamponunda ve pH 7,0; 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

4.3.2 MWCNT Miktarının Biyosensör Cevabı Üzerine Etkisi

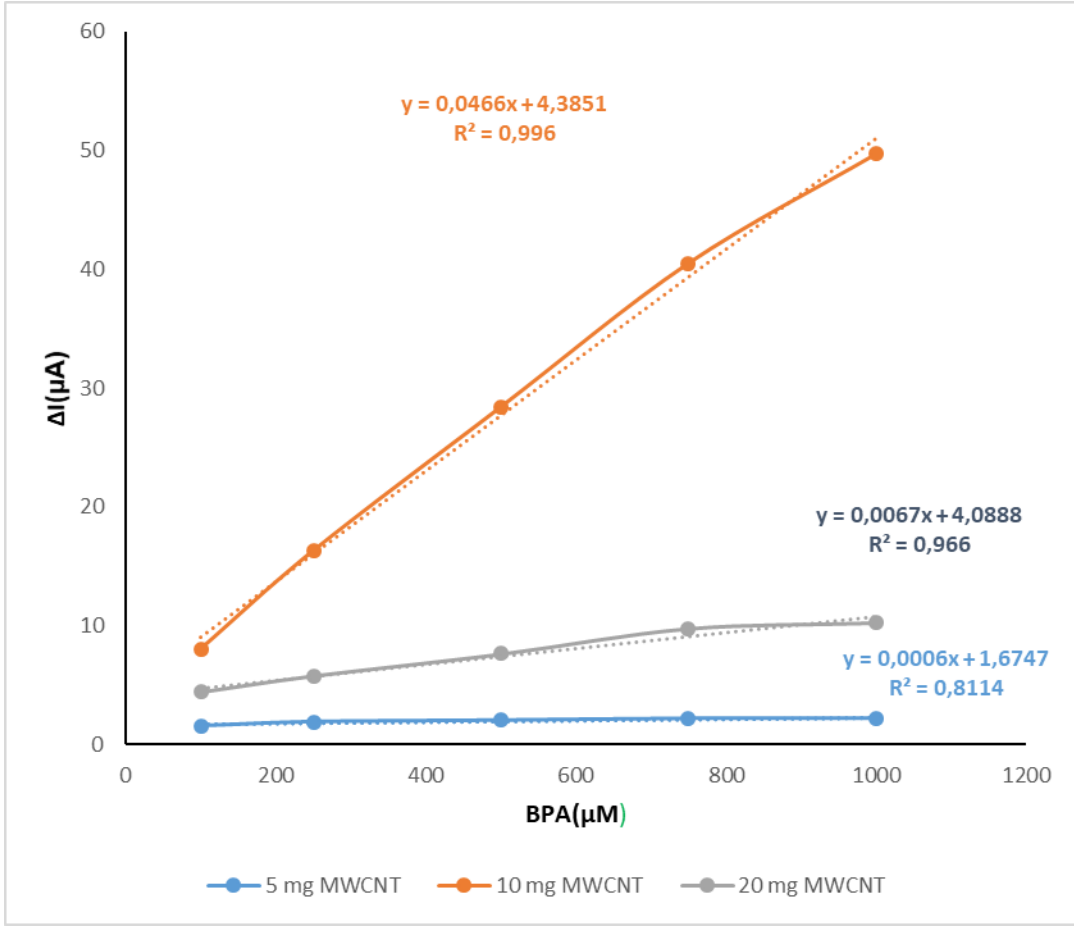
MWCNT miktarının biyosensör cevabına etkisini incelemek amacıyla karbon pastayı hazırlarken sırasıyla 5; 10; 20 mg karboksillenmiş MWCNT ilave edilmiştir. Çalışmalar 10 mM K₄[Fe(CN)₆] içeren pH: 7,0; 50mM potasyum fosfat tamponunda ve 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Denemeler, (-0.15)V & (+0.65)V potansiyel aralığında DPV metodu kullanılarak gerçekleştirilmiş olup, elde edilen sonuçlar ile standart grafikler çizilmiştir (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8). Alınan ölçümler doğrultusunda çizilen standart grafiklerden anlaşılacağı üzere en ideal ve en doğrusal grafiğin 10 mg MWCNT ile hazırlanan elektrot ile alındığı gözlenmektedir. 5 mg MWCNT miktarı ile hazırlanan elektrotun ölçümleri

sonucunda azalan MWCNT miktarına bağı olarak akım farkı değerinde düşüş ve ideal sonuçlardan sapma gözlenmektedir. Bu durum 5 mg MWCNT miktarının Mb immobilizasyonu için yeterli olmadığıın göstergesidir. 20 mg MWCNT ve 10 mg MWCNT karşılaştırıldığında akım farkı değerlerinin 10 mg MWCNT için daha fazla olduğu görülmektedir. Bu da 10 mg MWCNT'in biyosensör için daha ideal olduğunu kanıtlamaktadır. 20 mg MWCNT ile hazırlanan elektrotta akım farkının düşmesinin sebebi; MWCNT miktarı arttıkça karbon nanotüplerin miyoglobin-substrat arasında sterik bir difüzyon bariyeri oluşturmasından kaynaklanmaktadır. 10 mg MWCNT kullanılarak hazırlanan biyosensör hem akım farkının yüksekliği hem de doğrusallığının daha iyi olmasından dolayı tercih edilmiştir.





Şekil 4.7. Miyoglobin temelli biyosensörün farklı MWCNT miktarı ile çalışmalarından elde edilen DP voltammogramları. 5 mg MWCNT ile hazırlanan elektrot (A), 10 mg MWCNT ile hazırlanan elektrot (B), 20 mg MWCNT ile hazırlanan elektrot (C). Ölçümler 10 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ içeren 50 mM fosfat tamponunda ve pH 7,0; 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

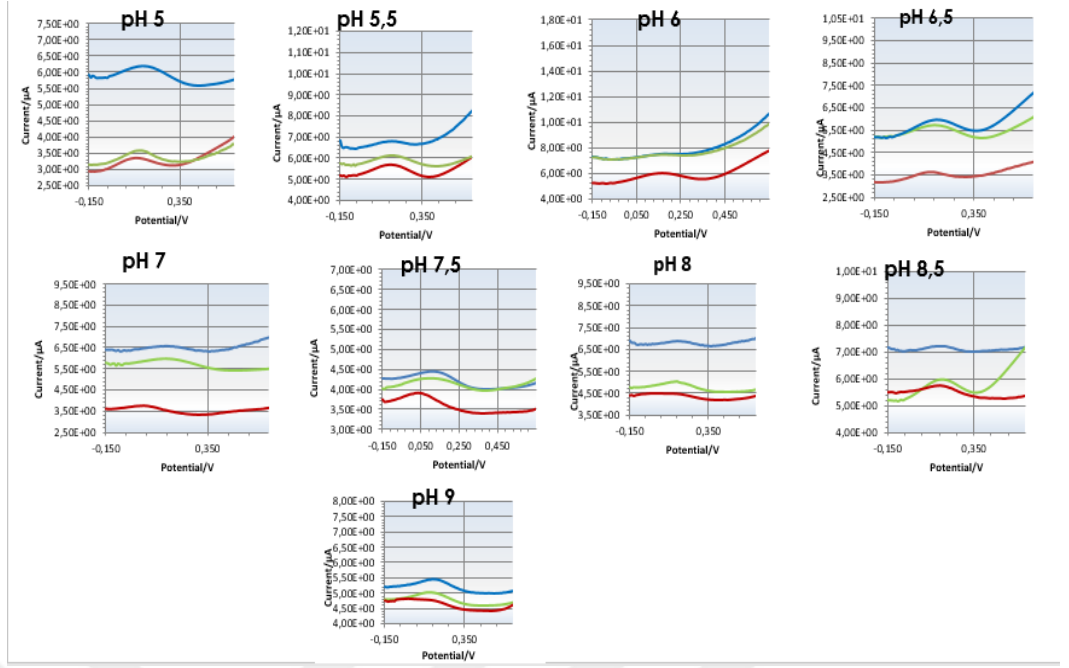


Şekil 4.8. MWCNT miktarı optimizasyon grafiği. **Turuncu:** 10 mg MWCNT kullanılarak hazırlanan biyosensör, **Gri:** 20 mg MWCNT kullanılarak hazırlanan biyosensör, **Mavi:** 5 mg MWCNT kullanılarak hazırlanan biyosensör. Ölçümler 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 50 mM fosfat tamponunda ve pH 7,0; 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

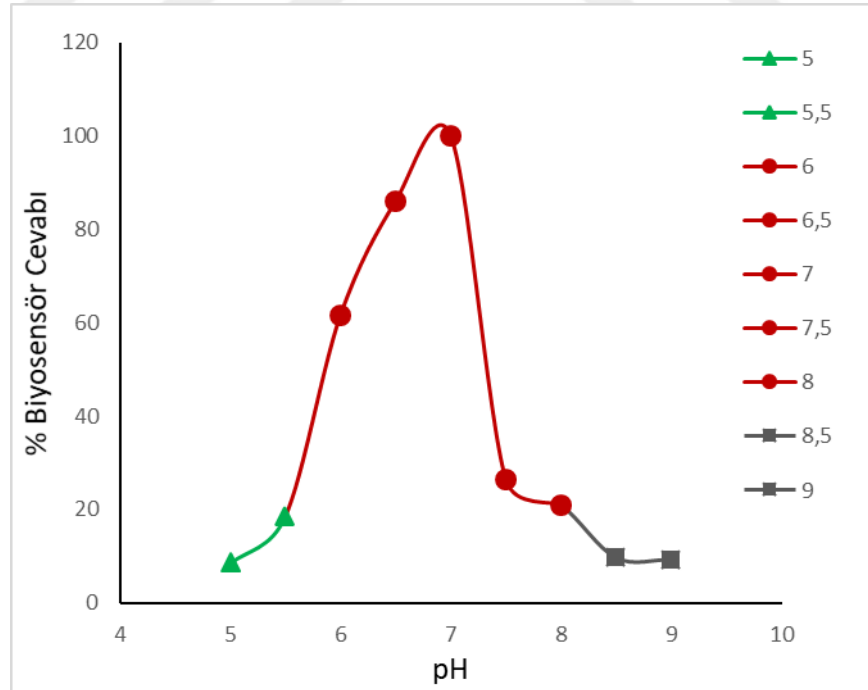
4.4 Miyoglobin Temelli Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

4.4.1 Miyoglobin Temelli Biyosensör İçin Optimum pH Belirlenmesi

Miyoglobin temelli biyosensörün optimum pH değerinin belirlenmesi için yapılan DPV ölçümleri ve % biyosensör cevabı-pH grafiği Şekil 4.9 ve 4.10 'da verilmiştir. Grafikten de anlaşılacağı gibi hazırlanan miyoglobin temelli biyosensör en iyi aktiviteyi pH:7,0'de göstermektedir. pH 5,0 ten 7,0' ye kadar BPA için artan akım farklanmaları elde edilirken, pH 7,0 den 9,0'a gidildikçe azalan akım farklanmaları görüldü. Sonuç olarak BPA'nın Mb üzerinde gösterdiği etkinliğin en iyi gözlemlendiği pH değeri 7,0'dir diyebiliriz.



Şekil 4.9. Miyoglobin temelli biyosensör için alınan DPV ölçüm grafikleri. Ölçümler 10 mM $K_4Fe(CN)_6$ mediatörlü ve (-0,15) V / (+0,65) V potansiyelleri arasında alınan DPV ölçümleri ile gerçekleştirildi. pH: 5-5,5 Sodyum sitrat; pH: 6-6,5-7-7,5-8 Potasyum Fosfat ve pH:8,5-9,0 Glisin tamponu.

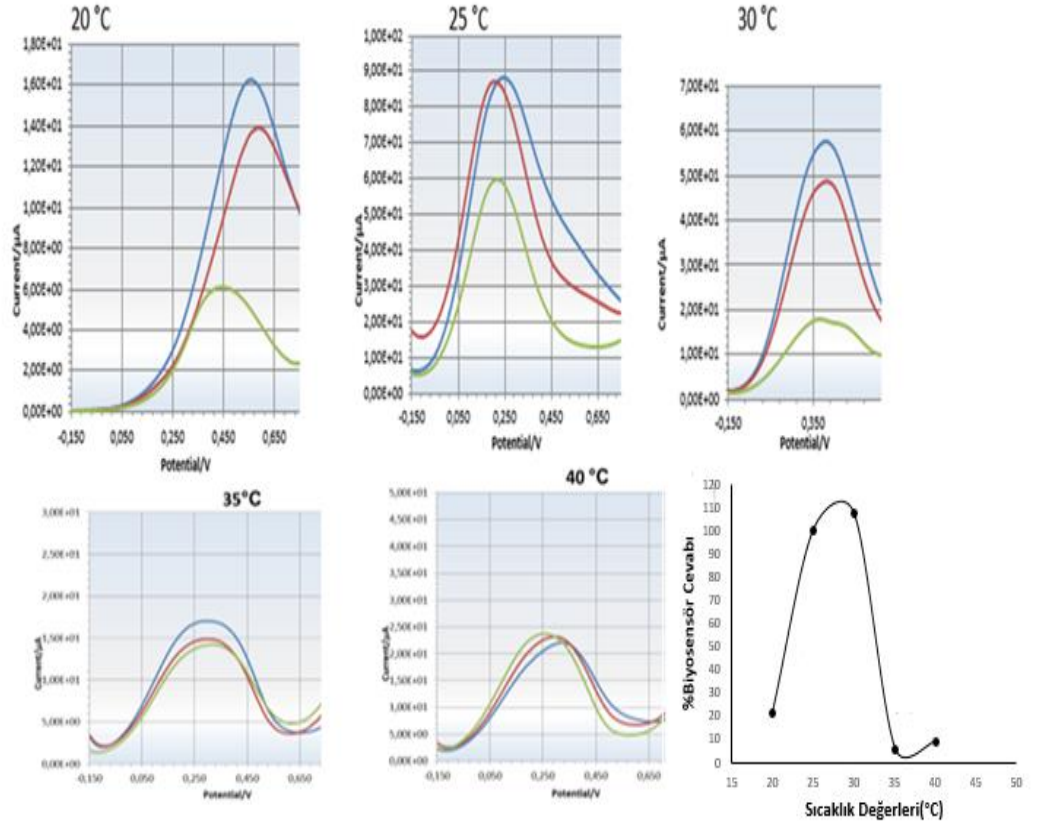


Şekil 4.10. pH-% Biyosensör cevabı grafiği. pH: 5-5,5 Sodyum sitrat; pH: 6-6,5-7-7,5-8 Potasyum Fosfat ve pH:8,5-9,0 Glisin tamponu.

4.4.2 Miyogloblin Temelli Biyosensör İçin Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Miyogloblin temelli biyosensörün optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla sırasıyla 20, 25, 30, 35 ve 40 °C 'de (500 µM BPA ve 500 µM H₂O₂) için DPV ölçümleri alınarak biyosensörün farklı sıcaklık değerlerine gösterdiği değişimler incelendi. Yapılan sıcaklık denemeleri düşükten yükseğe doğru olacak şekilde 10 mM K₄[Fe(CN)₆] içeren pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda (-0,15) V & (+0,65) V potansiyel aralığında DPV metodu kullanılarak H₂O₂-BPA akım farkına bağlı gerçekleştirilmiştir.

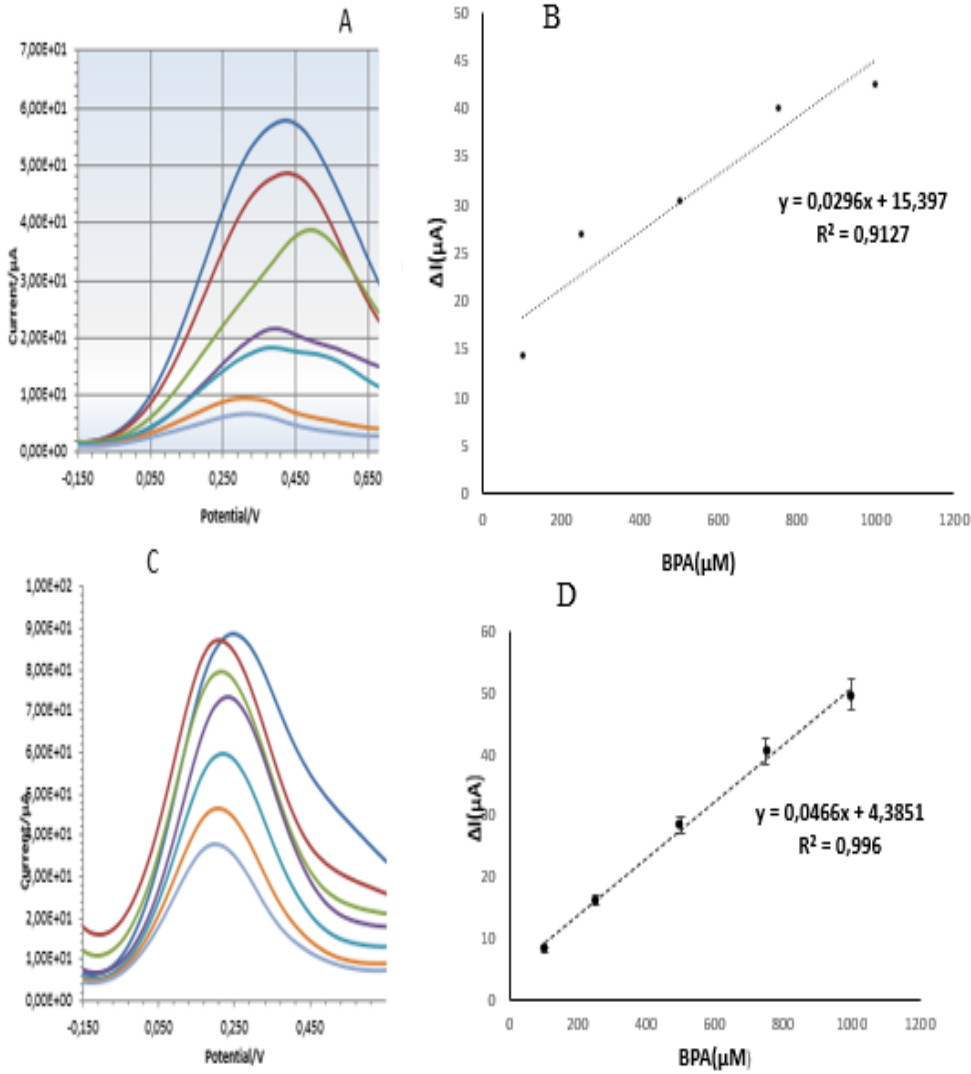
Çalışmanın sonucunda Şekil 4.11' de verilen DPV ölçümleri ve bunların ışığında % biyosensör cevabı-sıcaklık grafiği elde edilmiştir. Grafikten de görüldüğü gibi sıcaklık artışı ile biyosensör cevabında bir artış gözlenmiştir Ancak sıcaklık değeri 30°C' yi geçtiği zaman cevapta düşüş görülmektedir. En fazla akım farklanması 30°C 'de elde edildiği fakat 25°C için elde edilen değerinde 30°C'ye yakın olmasından dolayı 25°C ve 30°C için DPV ölçümleri yolu ile standart grafikler elde edildi.



Şekil 4.11. Miyogloblin temelli biyosensör ile alınan DPV ölçümleri ve optimum sıcaklık grafiği.

Ölçümler pH: 7,0; 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 50 mM potasyum fosfat tamponunda (-0,15) V & (+0,65) V potansiyelleri arasında alınan DPV yöntemi ile gerçekleştirildi.

25 ve 30 °C’lerde tekrarlanan DPV ölçümleri ve bunlara ilişkin olarak elde edilen standart grafik sonuçları Şekil 4.12 ‘de gösterilmiştir.

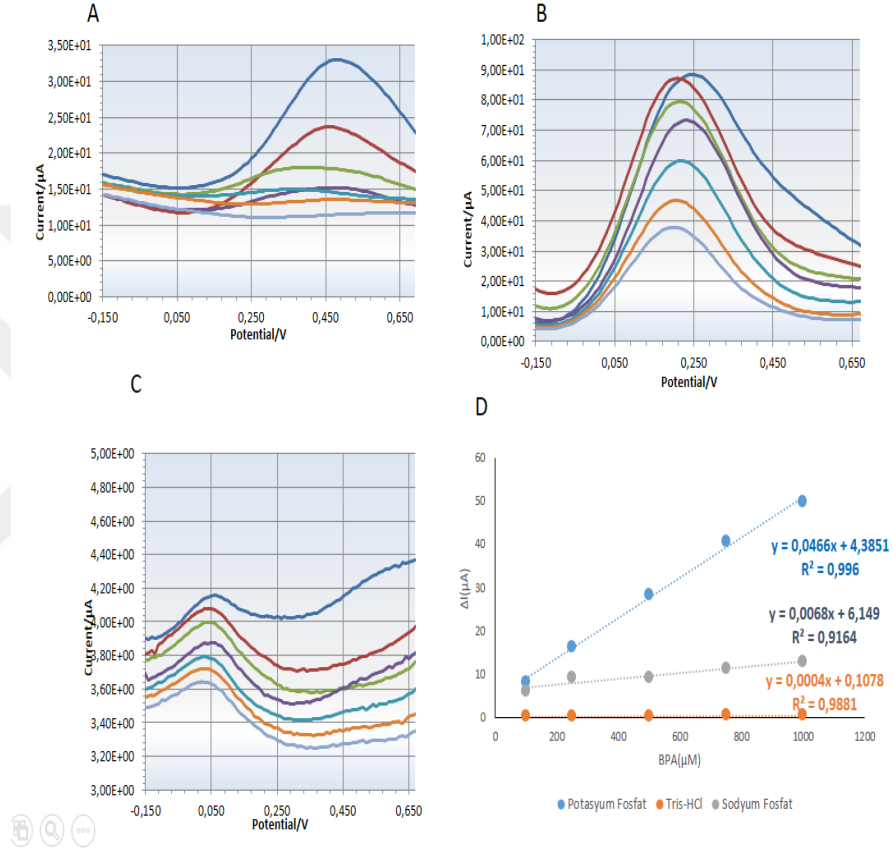


Şekil 4.12 Miyogloblin temelli biyosensörün 25 ve 30 °C sıcaklık değerleri için elde edilen DP voltammogramları. (A) 30°C için elde edilen DPV ölçümü, (B) 30°C için elde edilen standart grafik, (C) 25 °C için elde edilen DPV ölçümü, (D) 25 °C için elde edilen standart grafik. Ölçümler ve pH: 7,0 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 50 mM fosfat tamponunda gerçekleştirilmiştir.

25 ve 30 °C’lerde tekrarlanan DPV ölçümleri ve standart grafik sonuçlarının ışığında, 25 °C için alınan DPV sonuçlarının ideale daha yakın ve standart grafiğin daha doğrusal olduğu görülmektedir. Bu sebeple biyosensör için ideal sıcaklık değeri olarak 25 °C seçilmiştir.

4.4.3 Miyogloblin Biyosensörüne Farklı Tamponların etkisi

Miyogloblin biyosensörünün pH:7,0 değerindeki farklı tampon sistemlerindeki (Potasyum fosfat, Sodyum fosfat ve Tris-HCl) etkinliğini aydınlatıp karşılaştırmak için yapılan çalışmalar sonucu elde edilen grafikler Şekil 4.13 'de gösterilmiştir.



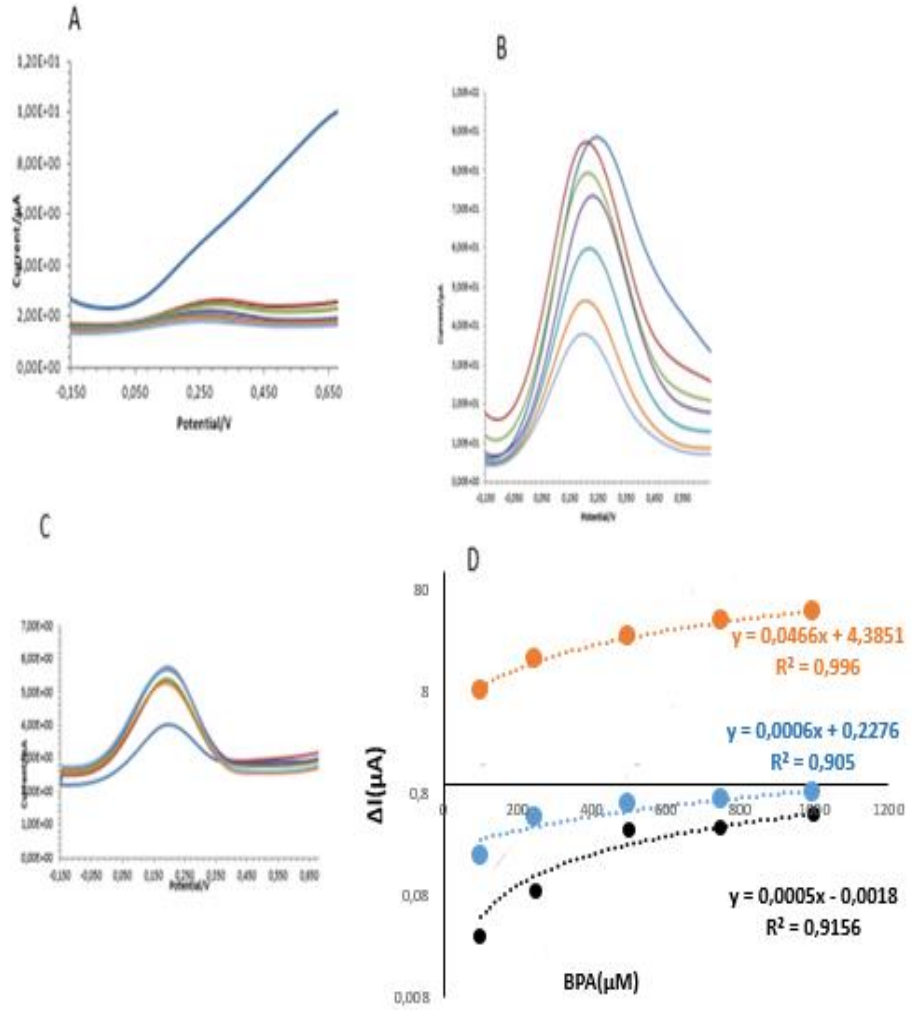
Şekil 4.13. Miyogloblin temelli biyosensörün farklı tamponlardaki çalışmalarından elde edilen DP voltammogramları ve buna bağlı çizilen standart grafikler. (A) Sodyum Fosfat Tamponu (B), Potasyum fosfat tamponu (C) Tris-HCl tamponu ve (D) Standart grafikler. Ölçümler 10 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ içeren pH 7,0; 50 mM tamponlarda ve 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

Miyogloblin biyosensörünün farklı tamponlarda verdiği biyosensör cevaplarına bakıldığında en iyi biyosensör cevabının potasyum fosfat tamponunda gözlemlendiğini söylemek mümkündür. Tris-HCl 'deki akım farkının çok az olmasının sebebi Tris-HCl tamponunun organik tabanlı bir tampon olması olabilir.

Sodyum Fosfat tamponu, Tris-HCl tamponuna göre daha iyi akım farklanması ve de hem ideal değerlere uzaklığı hem de standart grafiğin doğrusallığının çok iyi olmaması sebebiyle en ideal sonuç Potasyum Fosfat tamponu ile elde edilmiştir. Bu sonuç, hem tampon türünün hem de tamponu oluşturan iyon türünün BPA'nın Mb üzerindeki etkinliğini göstermesinde çok önemli olduğunu göstermektedir.

4.4.4 Tasarlanan Miyoglobin Biyosensörüne Farklı Tampon Konsantrasyonlarının Etkisi

En ideal tampon türü olarak Potasyum Fosfat tamponu belirlendikten sonra miyoglobin biyosensörünün farklı tampon konsantrasyonlarındaki (25,50,100 mM Potasyum Fosfat tamponları) cevabını aydınlatıp karşılaştırmak için yapılan çalışmalar sonucu elde edilen grafikler Şekil 4.14 'de gösterilmiştir.



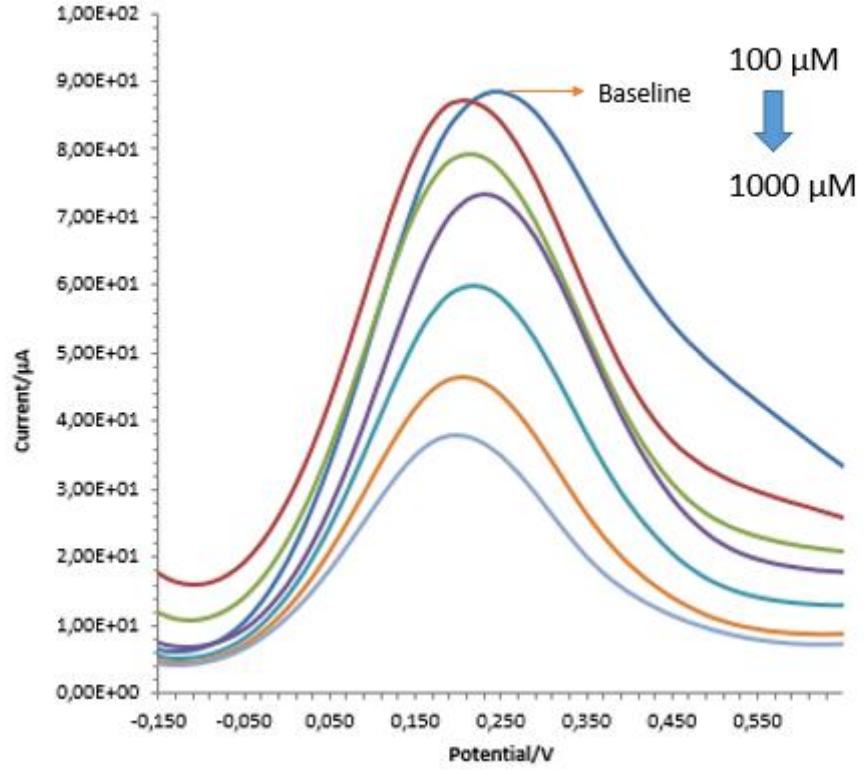
Şekil 4.14. Miyoglobin temelli biyosensörün farklı tampon konsantrasyonlarındaki çalışmalarından elde edilen DP voltammogramları ve buna bağlı çizilen standart grafikler. (A) 25 mM Potasyum Fosfat Tamponu, (B) 50 mM Potasyum fosfat tamponu (C) 100 mM Potasyum fosfat tamponu, (D) Standart grafikler. **Turuncu:** 50 mM, **Mavi:** 25 mM, **Siyah:** 100 mM Potasyum Fosfat. Ölçümler 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

Miyoglobin temelli biyosensörün cevabı üzerine tampon konsantrasyonu etkisini gösteren sonuçları incelendiğinde, en uygun tampon konsantrasyonunun 50 mM olduğu görülmektedir. 25 ve 100 mM potasyum fosfat tamponu konsantrasyonlarında sonuçlar ideallikten uzaktır, standart grafikler doğrusal değildir ve akım farklanmalarının en iyi 50 mM Potasyum Fosfat tamponunda olduğu görülmektedir.

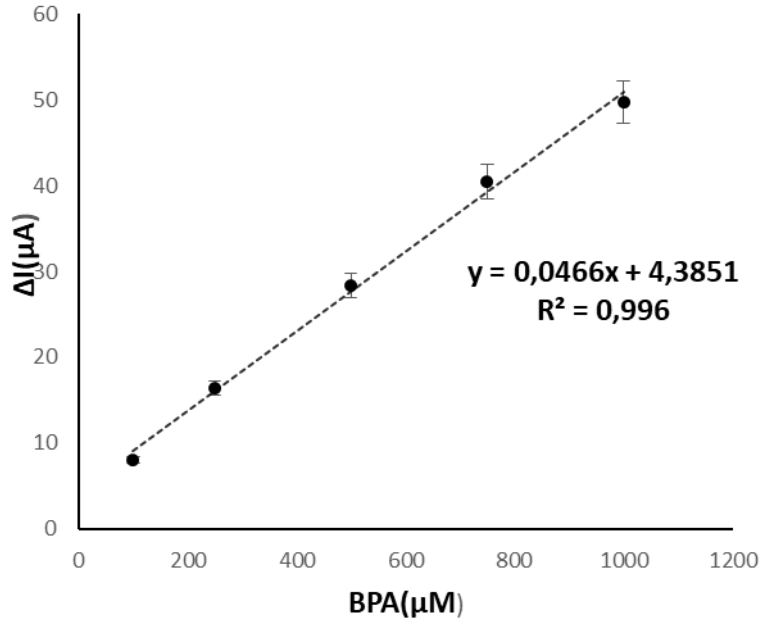
4.5 KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları

4.5.1 KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye biyosensör için doğrusal tayin aralığı sonuçları

Tasarlanan miyoglobin temelli biyosensör ile BPA için doğrusal tayin aralığı belirlenmiştir. Bu amaç dahilinde 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren pH: 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponunda (-0,15) V & (+0,65) V potansiyelleri arasında DP voltammogramları alınmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen veriler ve bu verilerden yola çıkılarak çizilen DP voltammogramları Şekil 4.15'te ve akım farkına bağlı olarak çizilen standart grafik Şekil 4.16' da gösterilmiştir. Grafiklerden de görüldüğü üzere, BPA için doğrusal tayin aralığı: 100–1000 μ M olarak bulunmuştur. Artan BPA konsantrasyonları ortamda hidrojen peroksit varken miyoglobinin katalitik aktivitesini konsantrasyonla doğru orantılı bir şekilde düşürmüştür. Ayrıca BPA'nın daha düşük derişimleri için de denemeler yapılmış fakat akım farklanmaları çok azaldığı için sağlıklı sonuçlar elde edilememiştir.



Şekil 4.15. Miyoglobin temelli biyosensörün doğrusal tayin aralığının belirlenmesi. Bulunan sonuçlar yukarıdan aşağıya; baseline, 500 μM H_2O_2 , 500 μM H_2O_2 ile birlikte aynı ortamda bulunan 100, 250, 500, 750 ve 1000 μM BPA. Ölçümler pH: 7,0; 10 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ içeren 50 mM potasyum fosfat tamponunda ve (-0,15) V & (+0,65) V potansiyelleri arasında 25 °C sabit sıcaklıkta alınmıştır.



Şekil 4.16. Miyogloblin tabanlı biyosensörün doğrusal tayin aralığı. Ölçümler pH: 7,0; 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 50 mM potasyum fosfat tamponunda (-0,15) V & (+0,65) V potansiyelleri arasında 25 °C sabit sıcaklıkta alınmıştır.

4.5.2 Miyogloblin Temelli Biyosensörün Tekrarlanabilirliğine Yönelik Denemeler

4.5.2.1 KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye biyosensörün tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi

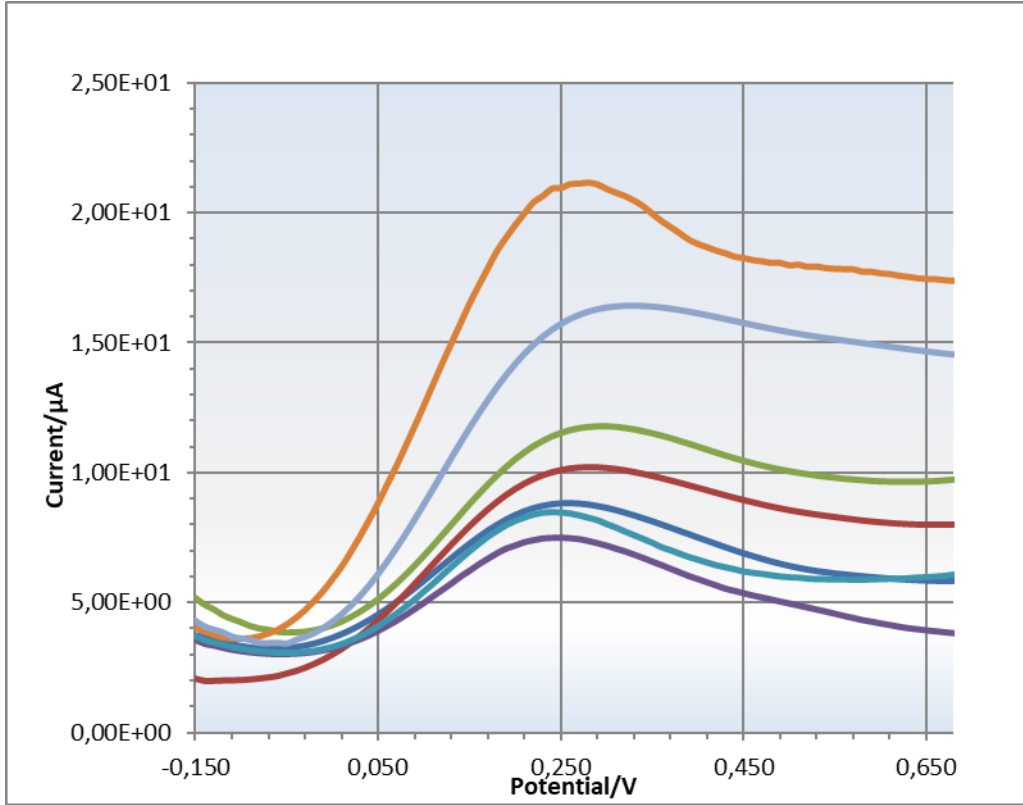
Miyogloblin temelli biyosensörün BPA için tekrarlanabilirliğini belirlemek için alınan DPV ölçümleri sonucu elde edilen veriler Tablo 4.1 'de gösterilmiştir. Hazırlanan biyosensör ile (500 µM H_2O_2 + 500 µM BPA) için elde edilen 10 ölçümün akım farklarının ortalaması 511,9 µM, standart sapma $\pm 2,76$ µM ve % varyasyon katsayısı da % 0,54 olarak bulunmuştur. Bulunan sonuçlara bakıldığında; gerek standart sapma ve gerekse % varyasyon katsayısının düşük çıkması hazırlanan miyogloblin temelli biyosensörün yüksek tekrarlanabilirlikte olduğunu kanıtlar niteliktedir.

Tablo 4.1. Tasarlanan biyosensörde BPA ve H₂O₂ için gözlenen tekrarlanabilirlik değerleri

Deneme Sayısı	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Ortalama Değer(\bar{x})	Standart Sapma (\pm S.S)	Varyasyon Katsayısı (% V.K)
BPA Konsantrasyonu	507,5 μ M	511,6 μ M	512,7 μ M	509,5 μ M	513,3 μ M	512,3 μ M	510,2 μ M	513,1 μ M	511,4 μ M	517,9 μ M	511,9 μ M	2,76 μ M	0,54

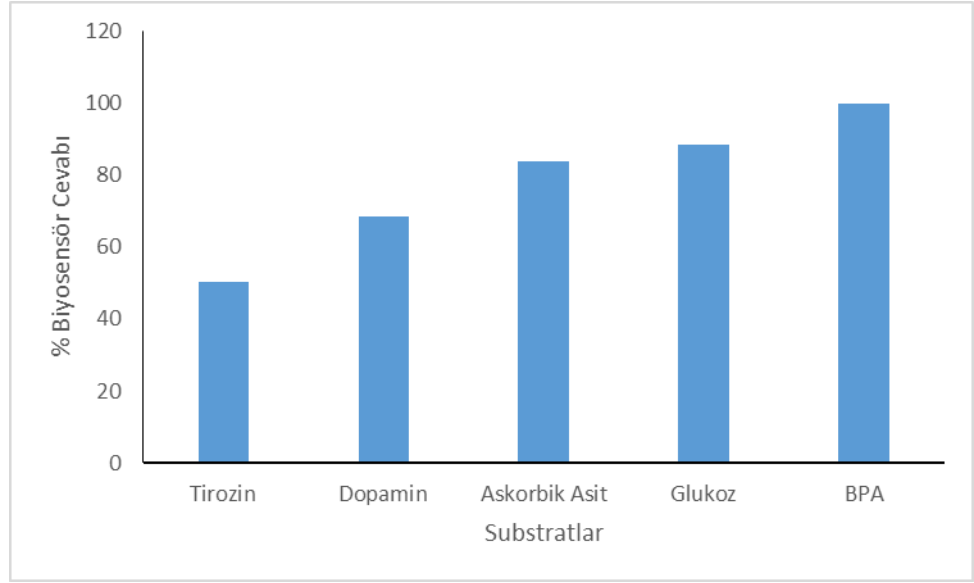
4.5.3 KPE/MWCNT/EDC-NHS/Mb/GA Modifiye Biyosensör Substrat Spesifikliği Çalışması

Bu çalışmada 500 μ M Tirozin, glukoz, askorbik asit, dopamin ve BPA ile yapılan substrat spesifikliği deneyi için alınan DPV sonuçları Şekil 4.17 'de verilmiştir. BPA ile elde edilen akım farkı % 100 kabul edilerek tüm substratlar için elde edilen akım değerleri ile kıyaslanarak % biyosensör cevabı belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.18' de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. Miyoglobin temelli biyosensöre ait substrat spesifikliği DP voltammogram sonuçları.

Turuncu: Baseline, **Açık Mavi:** 500 μM H_2O_2 , **Yeşil:** 500 μM H_2O_2 +Tirozin, **Kırmızı:** 500 μM H_2O_2 +Dopamin, **Lacivert:** 500 μM H_2O_2 +Askorbik Asit, **Mavi:** 500 μM H_2O_2 + Glukoz, **Mor:** 500 μM H_2O_2 + BPA. Ölçümler; pH: 7,0; 10 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ içeren 50 mM potasyum fosfat tamponunda (-0,15) V & (+0,65) V potansiyel aralığında, 25 °C sabit sıcaklıkta alınmıştır.



Şekil 4.18. Miyogloblin temelli biyosensöre ait substrat spesifikliğı grafiğı. Ölçümler; pH: 7,0; 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 50 mM potasyum fosfat tamponunda (-0,15) V & (+0,65) V potansiyel aralığında ve 25 °C sabit sıcaklıkta alınmıştır.

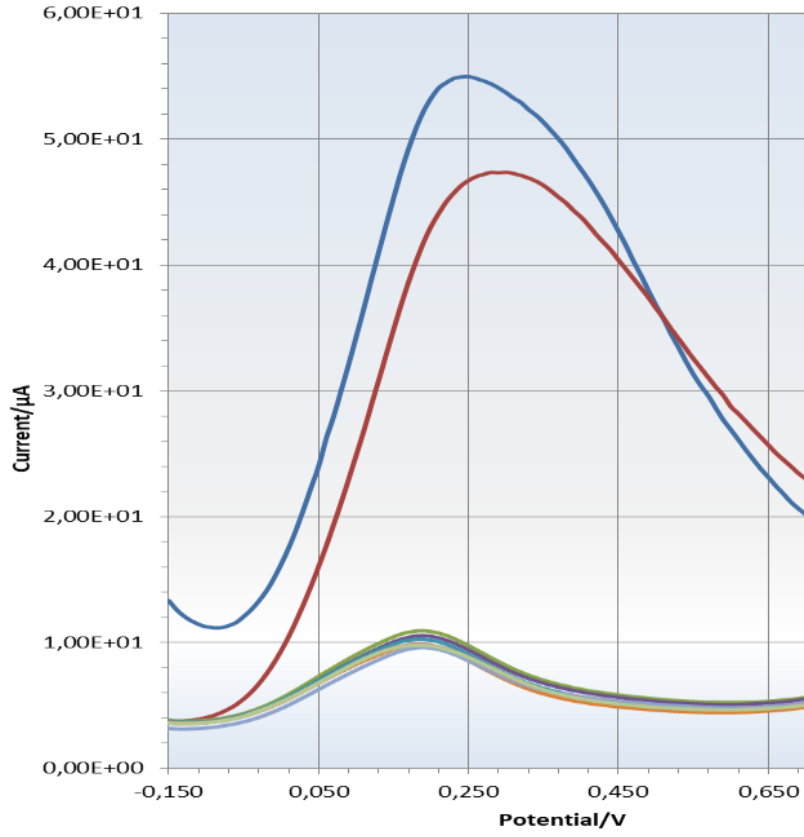
Sonuçlara bakıldığında BPA'nın en yüksek akım farklanmasına neden olduğu için elektrot için en iyi substrat olduğu söylenebilir.

Dopamin ve tirozinin akım farkları diğer substratlara nazaran düşüktür. Askorbik asit mükemmel bir indirgeyici ajandır ve evrensel girişimcidir, bu yüzden yüksek bir girişim etkisi göstermesi normaldir.

Bu çalışmada glukozun akım farkı oldukça yüksek bulundu. Bunun en önemli nedeni glukozun da BPA gibi bir polihidroksi bileşik olması ve BPA'ya benzer bir etkinlik gösterebilme kapasitesi olduğudur.

4.5.4 KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye Biyosensör ile Örnek Tayinine Yönelik Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar

Miyogloblin temelli biyosensör ile örnek tayini için yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.2 'de ve Şekil 4.19 'da gösterilmiştir.



Şekil 4.19. Miyogloblin temelli biyosensörün damacana su ve BPA tayini için tekrarlanabilirliğinin incelenmesi amacıyla yapılan DP voltammogram sonuçları. Ölçümler; pH: 7,0; 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 50 mM potasyum fosfat tamponunda (-0,15) V & (+0,65) V potansiyel aralığında ve 25 °C sabit sıcaklıkta alınmıştır.

Tablo 4.2. Tasarlanan biyosensörde Damacana su+BPA için gözlenen tekrarlanabilirlik değerleri

Deneme Sayısı	1	2	3	4	5	6	7	Ortalama Değer(\bar{x})	Standart Sapma($\pm S.S$)	% Varyasyon Katsayısı (% V.K)
Damacana Su+BPA için Konsantrasyon Değerleri	609,32 μM	617,60 μM	624,05 μM	634,44 μM	637,95 μM	632,90 μM	634,57 μM	627,26	10,62	1,69

Hazırlanan biyosensör ile 500 μM H_2O_2 içeren ortamda (damacana su+500 μM BPA) için $n=7$ ölçüm alınmıştır. Sadece damacana su ile yapılan (BPA katılmaksızın) denemelerden sonuçlar elde edilemediği için standart katmalı metod kullanıldı. Ölçümler neticesinde elde edilen akım farkından yararlanılarak yapılan hesaplamalara göre konsantrasyon değerlerinin ortalaması 627,26 μM , standart sapma değeri $\pm 10,62$ ve % varyasyon katsayısı da % 1,69 olarak bulunmuştur. Ortalama değer olan 627,26 μM a bakıldığında damacana suyun içinde BPA bulunduğu görülmektedir ve bu durum biyosensörümüzün örnek tayinine uygun bir biyosensör olarak çalıştığının göstergesidir.



4.6 BPA Tayinine Yönelik Olarak Geliştirilen KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye Biyosensörün Diğer Bazı Biyosensörlerle Kıyaslanması

Tablo 4.3. BPA Tayinine Yönelik Olarak Geliştirilen KPE/MWCNT/Mb/GA Modifiye Biyosensörün Diğer Bazı Biyosensörlerle Kıyaslanması

Sensör	Tayin Limiti	Lineer Aralık	Cevap Süresi	Örnek	Referans
GCE/Mg-Al layered double hydroxide(LDH)	0,005 μ M	0,01-0,05 μ M	8 sn	Plastik ürün	H. Yin, L. Cui, S. Ai, H. Fan, and L. Zhu, 2010. Electrochim. Acta, 55, 603
SWCNT/Tyr/CPE	0,02 μ M	0,1-12 μ M	6 dk	İçme suları ve yüzey suları	D. Mita et.al., 2007. Biosens. Bioelectron. 23 60
p-ABA/GE	0,26 μ M	2-100 μ M		İçme suyu	D. Serap, Journal of Science, 2018
SPCE/AuNPs/Aptamer	0,113 pM	1 pM- 10 nM		Erkek Wistar fare plazmasında(ELISA Tekniği)	Shokoufeh Hassani et.al., 2020
BSA/Anti-BPA/AuNPs/MWCNTs/GCE	8,7 nM	10 nM- 1 μ M		Streç filmlerde	Huang et.al., 2016
Thionine/CPE	0,15 μ M	0,15-45 μ M	200 saniye	Örnek Tayini yapılmamıştır.	M. Portaccioa, et.al., 2010
CS-Fe ₃ O ₄ /GCE	0,008 μ M	0,05-30 μ M	12 sn	Plastik ürün(DPV ölçümleri ile)	C. Yu et.al., 2011. Electrochim. Acta 56 9056–9063
GCE/AgCNFs/SH-Apt	0,39 nM	0,1 – 10 nM	20 sn	Su örneklerinde(CV Ölçümleri ile)	Tsekeli,T.et.al., 2021
Polyaniline/MWCNTs/GCE	10 nM	1-400 μ M	3 dakika	Biberonlarda(Amperometrik Ölçümler ile)	S. Poorahong et.al., 2012. Microchim. Acta 176 91–99
CPE/MWCNT/Mb/GA	89 μ M	100-1000 μ M	16 saniye	Damacana Sularda(CV ve DPV ölçümleri ile)	Bu çalışmada

5. GENEL DEĞERLENDİRME

Biyosensörler, biyolojik reaksiyonlarda hedef görevi gören ve algılama özelliklerine sahip olan analit maddelerini kontrol etmek için kullanılan aletlerdir. Birbiri içine girmiş biyokimyasal ve elektrokimyasal özelliklere sahip iki anahtar yapıdan oluşurlar. Biyokimyasal kısım analiz edilmesi gereken madde ile etkileşir ve analiti tanınması beklenen tek şeydir (Coulet P.R., 1991).

Günümüz teknolojik gelişmelerinin yardımıyla biyosensörler hızla gelişmektedir. Sensör teknolojisi fen bilimleri ve mühendislik gibi alanlarda da yer almaktadır ve bu disiplinlerde yeni teknolojilerle harmanlanması biyosensörlerin gelişmesinde önemli rol oynamaktadır (Blum L.J., Coulet P.R., 1991).

Hidrojen peroksit tayinine yönelik biyosensör geliştirilmesi uzun zamandır büyük ilgi görmektedir. Bu amaçla geliştirilen biyosensörlerin çoğunda biyokatalizör olarak yaban turpu peroksidazı (HRP) kullanılmıştır ve bu sayede büyük anlamda başarı elde edilmiştir. Ne var ki HRP'nin pahalı oluşu ve çözültide stabil kalmaması nedeniyle bu enzimin yerine kullanılabilecek benzer biyokatalitik reaksiyon gösteren başka bir enzim olmasa da proteinin bulunmasını zorunlu hale getirmiştir. Hidrojen peroksidin indirgenmesinin HRP'nin biyoaktif merkezindeki hem grubu tarafından katalizlendiği bilinmektedir. Bu nedenle hem grubu içeren miyoglobinin peroksidaz yerine kullanımı düşük fiyatı ve çözültideki yüksek stabilitesine bağlı olarak ilgi çekici bir araştırma konusu olmuştur. Miyoglobin kırmızı kaslarda bulunur, prostetik grubu hem olan bir kromoproteindir ve vucutta oksijen taşınımı için gereklidir. Polipeptid zinciri aktif merkez gibi davranma yeteneğine sahip olan hem grubu içermektedir. Peroksidaz yerine kullanılan hemoglobin ve miyoglobinin doğal uzaysal yapısıyla ilgili çalışmaların verdiği sonuçlara bakıldığında miyoglobinin peroksidaz gibi davranabildiğini ortaya koymuştur. Bu çalışmalar sonucunda hidrojen peroksid biyosensörü yapımında HRP yerine protein olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Bu çalışmada BPA tayinine yönelik olarak Mb temelli yeni bir biyosensör sistemi geliştirilmesi amaçlanmıştır. BPA([2,2-bis(-hidroksifenil)] propan) katı,

fenolik kokuya sahip, kremi beyaz renkte, kristalik yapıda bulunan bir maddedir. Bisfenol A (BPA), epoksi reçineler ve polikarbonat plastiklerin üretiminde kullanılan hacmi yüksek olan bir endüstriyel kimyasaldır. Polikarbonat plastiklere başta yiyecek ve içecek kapları olmak üzere pek çok üründe rastlanabilirken, epoksi reçineler, metalik yiyecek ve içecek kaplarının iç astarları olarak korozyonu önlemek için sıklıkla kullanılmaktadır. Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu (EFSA: European Food Safety Authority) tarafından yapılan çalışmaların sonucuna göre, bir insan vücudunun günlük kaldırabileceği ve zehir etkisi oluşturmayan BPA miktarı, vücut ağırlığının her kilogramı için 0,05 mg olarak hesaplanmıştır. Yetmiş kilogram da üç buçuk miligram BPA'yla etkileşen bir insanın sağlığı için, özellikle bebek gelişimi sürecinde yan etkileri olabileceği ve yetişkin insanlar için bazı sağlık problemleri oluşturabileceği düşünülmektedir (Fernandez M.F. et.al., 2007). Bu yüzden BPA tayini çok önem arz etmektedir. BPA, kadınlık hormonu olan östrojene çok benzeyen ksenöstrojen içeren sentetik bir yapıdan meydana gelmiştir.

Bu çalışmada gerek iletkenliğin artması gerekse immobilizasyon için karboksillenmiş MWCNT kullanıldı. Karboksil gruplarının aktivasyonu için EDC-NHS kullanılmıştır. Hazırlanan biyosensörde enzim kullanılmadan miyoglobindeki Hem gruplarından yararlanarak alternatif bir yaklaşım geliştirilmiştir. KPE/MWCNT/Mb/GA modifiye şekilde hazırlanan biyosensörde hidrojen peroksit ile miyoglobinin porfirin halkasındaki demir atomunun etkileşimi sonucu H_2O_2 molekülü su ve oksijene indirgenir. Mediatör varlığında $[K_4(FeCN_6)]$ miyoglobinin porfirin halkasındaki Fe^{+2} , Fe^{+3} 'e yükseltgenir. Mediatör görevi gören $[K_4(FeCN_6)]$ yükseltgenmiş formu elektrot yüzeyinde indirgenerek akım oluşturur. Sabit H_2O_2 ve artan BPA konsantrasyonu ile yapılan ölçümlerde akımın azalması akım farkının artmasına neden olur. Miyoglobin temelli biyosensörle yapılan ölçümler (-0.15) V- (+0.65) V potansiyel aralığında DPV yöntemi kullanılarak alınmıştır. Bunun sonucunda, BPA doğrusal tayin aralığı ve lineer aralığın 100-1000 μM olduğu bulundu. Cevap süresi 16 sn, tayin limiti (LOD) değeri ise 89 μM olarak bulundu.

Tekrarlanabilirlik denemelerinde BPA için ortalama değer (\bar{x})= 511,95, standart sapma değeri ($\pm S.S.$)= $\pm 2,76$ ve % varyasyon katsayısı (%V.K.)= % 0,54

olarak bulundu. Biyosensör cevapları için Optimum miyoglobin miktarının 5 mg/ml, optimum MWCNT miktarının 10 mg olduğu bulundu. Optimum pH 'ın 7, optimum sıcaklığın 25°C olduğu belirlendi. Tampon türü olarak potasyum fosfat sistemi belirlendi. Son olarak 6 ay boyunca bekletilmiş damacana suda BPA tayini için hazırlanan miyoglobin temelli elektrotla ölçüm yapılmıştır.

Sonuç olarak, miyoglobin temelli biyosensörün BPA tayinine yönelik olarak kullanılabilir oldukça duyarlı ve tekrarlanabilir sonuçlar veren alternatif bir yöntem olduğu ispatlanmış oldu.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahmad R, Tripathy N, Park J.H. and Hahn Y.B.**, 2015, Chem Commun (Camb). Aug 4;51(60):11968- 71.
- Alaejos, M.S.; Montelongo and F.J.G.**, 2004, Application of amperometric biosensors to the determination of vitamins and α -amino acids. Chem. Rev., 104, 3239–3266pp. [CrossRef] [PubMed])
- Alonso-Magdalena P., Vieira E., Soriano S., Menes L., Burks D., Quesada A., and Nadal A.**, 2010, Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. Environmental Health Perspectives 118 (9):1243-50.
- Alonso-Magdalena, Morimoto P., S., Ripoll C., Fuentes E., and Nadal. A.**, 2006, The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. Environmental Health Perspectives 114 (1):106-12.
- Alkasir, R.S.J., Ganesana, M., Won, Y.H., Stanciu, L. and Andreescu, S.**, 2010, Enzyme functionalized nanoparticles for electrochemical biosensors: a comparative study with applications for the detection of bisphenol A. Biosensors and Bioelectronics 26 (1): 43–49pp.
- Antiochia, R. and Gorton, L.**, 2007, Development of a Carbon Nanotube Paste Electrode Osmium Polymer-Mediated Biosensor for Determination of Glucose in Alcoholic Beverages, Biosens. Bioelectron., 22, 2611-2617pp.
- Arnich, N., Canivenc-Lavier, MC., Kolf-Clauw, M., Coffigny, H., Cravedi, JP., Grob, K., Macherey, AC., Masset, D., Maximilien, R., Narbonne, JF., Nesslany, F., Stadler, J. and Tulliez, J.**, 2011, Conclusions of the French Food Safety Agency on the toxicity of bisphenol A. Int J Hyg Environ Health.
- Arya, A.; Gangwar, A. and Kumar, A.**, 2019, Biosensors in animal biotechnology. In Nanotechnology in Modern Animal Biotechnology: Concepts and Applications, 1st ed.; Maurya, P.K., Singh, S., Eds.; Elsevier: Cambridge, MA, USA; pp. 75–95pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Balasubramanian, K. and Burghard, M.**, 2006, Biosensors Based on Carbon Nanotubes, *Anal. Bioanal. Chem.*, 385, 452–468pp.
- Batista, T.M., Alonso-Magdalena P., Vieira E., Amaral M.E., Cederroth C.R., Nef S., Quesada I., Carneiro E.M. and Nadal A.**, 2012. Short-term treatment with bisphenol-A leads to metabolic abnormalities in adult male mice. *PLoS ONE* 7 (3):e33814.
- Bienert, G.P., Schjoerring, J.K. and Jahn, T.P.**, 2006, Membrane transport of hydrogen peroxide, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758: 994-1003pp.
- Blum L.J. and Coulet P.R.**, 1991, *Biosensor Principles and Applications*, CRC Press, Boca Raton.
- Borgmann, S.; Schulte, A.; Neugebauer, S. and Schuhmann, W.**, 2011. Amperometric biosensors. In *Advances in Electrochemical Science and Engineering*, 1st ed.; Alkire, R.C., Kolb, D.M., Jacek Lipkowski, J., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany,; 1–84pp.
- Bulut Y.**, 2011, Biyosensörlerin Tanımı ve Biyosensörlere Genel Bakış, 6th International Advanced Technologies Symposium (IATS'11), 16-18 Mayıs, Elazığ, Türkiye.
- Calafat, A.M., Ye X., Wong L.Y., Reidy J.A. and Needham L.L.**, 2008, Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environmental Health Perspectives* 116 (1):39-44pp.
- Chao Zhao, G.,Zhang, L., Wen Wei, X. and Sheng Yang, Z.**, 2003, Myoglobin on multi-walled nanotubes modified electrode: direct electrochemistry and electrocatalysis, *Electrochemistry Communications*, 5: 825-829pp.
- Chaubey, A.; Malhotra, B.D.**, 2002, Mediated biosensors. *Biosens. Bioelectron*, 17, 441–456pp. [CrossRef]
- Choi H.J., Park S.J., Kim S.T. and Jhon M.S.**, 2005, *Diamond Relat. Mater.* 14 766.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Clark L.C.; Lyons C.**, 1962, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. Ann. N. Y. Acad. Sci. 102, (Art. 1), 29-45pp.
- Coulet P.R.**, 1991, What is a Biosensor? Chapter 1; Biosensor Principles and Applications, Ed: Blum, L. J. Coulet, P. R, Marcel Dekker Inc., New York, 1-6pp.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon J.P., Giudice L.C., Hauser R., Prins G.S., Soto A.M., Zoeller R.T. and Gore A.C.**, 2009, Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. Endocrine Reviews 30 (4):293-342pp.
- Dincer, C.; Bruch, R.; Costa-Rama, E.; Fernández-Abedul, M.T.; Merkoçi, A.; Manz, A.; Urban, G.A. and Güder, F.**, 2019, Disposable Sensors in Diagnostics, Food, and Environmental Monitoring. Adv. Mater., 31, 1806739. [CrossRef]
- Dujardin E., Ebbesen T.W., Krishnan A. and M.M.J.**, 1998, Treacy, Adv. Mater. 10 611 p.
- ECB (European Chemicals Bureau)**, 2003, European Union Risk Assessment Report 4,4'-Isopropylidenediphenol (Bisphenol-A). EINECS No: 201-245-8 Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- Er ve Sarımehtetoğlu, Er B. , Sarımehtetoğlu B.**, 2011, Gıdalarda bisfenol A varlığının değerlendirilmesi. Veteriner Hekimler Derneği Dergisi.; 82(1): 69-74pp.
- Ertaş F.N**, 2003, Enstrümental Analiz I Elektroanalitik Yöntemler.
- Fernandez M.F., Arrebola, J.P., Taoufiki, J., Naval'on, A., Ballesteros, O.**,
- Golub, M.S., Wu K.L., Kaufman F.L., Li L.H., Moran-Messen F., Zeise L., Alexeeff G.V. and Donald J.M.**, 2010, Bisphenol A: developmental toxicity from early prenatal exposure. Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology 89 (6):441-66.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Goodson A, Summerfield W. and Cooper I.**, 2002. Survey of bisphenol A and bisphenol F in canned foods. *Food Addit contam.* 19(8):796-802pp.
- Grieshaber, D.; MacKenzie, R.; Janos Vörös, J. and Reimhult, E.**, 2008. Electrochemical biosensors—Sensor principles and architectures. *Sensors*, 8, 1400–1458pp. [CrossRef]
- Hill D.E., Lin Y., Rao A.M., Allard L.F. and Sun Y.P.**, 2002, *Macromolecules* 359466.
- Ho, S.M., Tang W.Y., Belmonte de Frausto J. and Prins G.S.**, 2006, Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Research* 66 (11):5624-5632pp.
- Hong Liu, H., Qing Wan and Lin Zou, G.**, 2006, Redox reactions and enzymlike activities immobilized myoglobin in aqueous/ organic mixtures, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 594: 111-117pp.
- Heyrovsky J. and Zuman P.**, 1968, "Practical Polarography", Academic Press
- Johnson, I., Harvey, P.**, 2002, Study on The Scientific Evaluation of 12 Substances In The Context of Endocrine Disrupter Priority List of Actions European Commission. Wrc-Nsf Ref. Uc 6052.
- Kavlock, R.J., Daston G.P., DeRosa C., Fenner-Crisp P., Gray L.E., Kaattari S., Lucier G., Luster M., Mac M.J. and Maczka C.**, 1996, Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives* 104 Suppl 4:715-40.
- Kim, J.C., Shin H.C., Cha S.W., Koh W.S., Chung M.K. and Han S.S.**, 2001, Evaluation of developmental toxicity in rats exposed to the environmental estrogen bisphenol A during pregnancy. *Life Sciences* 69 (22):2611-25.
- Korotkaya, E.V.**, 2014, Biosensors: Design, Classification, And Applications In The Food Industry. ISSN 2308-4057. DOI 10.12737/5476

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Kosky, P.E., Guggenheim, E.K.**, 1991, The Aqueous Phase in the Interfacial Synthesis of Polycarbonates. 1. Ionic Equilibria and Experimental Solubilities in the BPANaOH-H₂O System Ind. Eng
- Le, H.H., Carlson E.M., Chua J.P., and Belcher S.M.**, 2008, Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. Toxicology Letters 176 (2):149-56.
- Lin Y., Rao M., Sadanadan B., Kenik E.A., Sun Y.P. and Phys J.**, 2003, Chem., B 106, 1294.
- Malhotra, B.D.; Ali, M.A.**, 2017, Nanomaterials in biosensors: Fundamentals and applications. In Nanomaterials for Biosensors, 1st ed.; Malhotra, B.D., Ali, M.A., Eds.; Elsevier: Cambridge, MA, USA; 1–73pp.
- Malhotra Bansi D. and Turner Anthony P.F.**, 2003, Advances in Biosensors 5, 67 p.
- Richards Mark P.**, 2013, Redox reactions of myoglobin, Antioxid Redox Signal, Jun 10;18(17):2342-51. DOI: 10.1089/ars.2012.4887.
- Martinkova, P.; Kostelnik, A.; Valek, T. And Pohanka, M.**, 2017, Main streams in the construction of biosensors and their applications. Int. J. Electrochem. Sci., 12, 7386–7403pp. [CrossRef]
- Merkoçi, A., Pumera, M., Llopis, X., Perez, B., del Vale, M. and Alegret S.**, 2005, New Materials for Electrochemical Sensing VI: Carbon Nanotubes, TRAC Trend Anal. Chem., 24, 826-838pp.
- Morrissey, R.E., George J.D., Price C.J., Tyl R.W., Marr M.C. and Kimmel C.A.**, 1987, The developmental toxicity of bisphenol A in rats and mice. Fundamental and Applied Toxicology 8 (4):571-82.
- Nguyen, H.H.; Kim, M.**, 2017, An Overview of techniques in enzyme immobilization. Appl. Sci. Converg. Technol, 26, 157–163pp. [CrossRef]

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Paradise, M. and Goswami, T.,** 2007, Carbon Nanotubes-Production and Industrial Applications, Mater. Design, 28, 1477–1489pp.
- Portaccio, M., Di Tuoro, D., Arduini, F., Mascone, D., Cammarota, M., Mita, D.G., Leporea, M.,** 2013. J. Electrochem. Acta 109, 340-347pp.
- Pulgar, R., Vilchez, J.L. and Olea, N.,** 2007, Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. Reproductive Toxicology 24: 259–264pp.
- Rogers, K.R., Becker, J.Y., Wang, J. Lu, F.,** 1999, Field Analytical Chemistry and Technology. (3): 161.
- Sajiki, J., Takahashi, K., Yonekubo, J.,** 1999, Journal of Chromatography B 736: 255.
- Sambe, H., Hoshina, K., Hosoya, K., Haginaka, J.,** 2005, Analyst 130: 38.
- Sassolas, A., Blum, L.J. and Leca-Bouvier, B.D.,** 2012, Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. Rev. Biotechnology Advances 30 489–511pp.
- Scott A.M., Jedd D., Wolchok J.D and Old L.J.,** 2012, Antibody Therapy of Cancer, Nature Reviews, 12: 278-287pp.
- Sevencan F, Vaizoğlu SA.,** 2007, PET ve geri dönüşümü: TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni. 6(4): 307-312pp.
- Schecter, A., Malik N., Haffner D., Smith S., Harris T.R., Paepke O. and Birnbaum L.,** 2010. Bisphenol A (BPA) in U.S. food. Environmental Science and Technology 44 (24):9425-30.
- Shanker, A.; Lee, K. And Kim, J.,** 2014, Synthetic hybrid biosensors. In Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, 2nd ed.; Meyers, R.A., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 1–36 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Shi, J., Claussen, J.C., McLamore, E.S., Haque, A.I., Jaroch, D., Diggs, A.R., Calvo-Marzal, P., Rickus, J.L. and Porterfield, M.,** 2011, multi-walled carbon nanotube glucose biosensors. Birck and NCN Publications 955 p.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. and Nieman, T.A.,** 1997, Principles of Instrumental Analysis, Brooks/Cole, 325 p
- Smith, D.R. and Wang, R-S.,** 2006, Glutaraldehyde Exposure and its Occupational Impact in the Health Care Environment. Environmental Health and Preventive Medicine 11, 3–10pp.
- Sneha, H.P.; Beulah, K.C. and Murthy, P.S.,** 2019 Enzyme immobilization methods and applications in the food industry. In Enzymes in Food Biotechnology, 1st ed.; Kuddus, M., Ed.; Academic Press: London, UK; pp. 645–658pp.
- Soto, A.M., Vandenberg L.N., Maffini M.V. and Sonnenschein C.,** 2008, Does breast cancer start in the womb? Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 102 (2):125-33.
- Sung J.H., Kim H.S., Jin H.-J., Choi H.J. and Chin I.-J.,** 2004, Macromolecules 37 p.
- Thakur M.S., Ragavan K.V.,** 2013, Biosensors in Food Processing. J Food Sci Technol, 50/4:625–641pp.
- Theavenot, D.R.; Toth, K.; Durst, R.A. and Wilson, G.S.,** 2001, Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. Biosens. Bioelectron, 16, 121–131pp. [CrossRef]
- Tsai, Y., Li, S. C. and Liao ,S. W.,** 2006, Electrodeposition of Polypyrrole – Multiwalled Carbon Nanotube – Glucose Oxidase Nanobiocomposite Film for the Detection of Glucose, Biosens. Bioelectron., 22, 495-500pp.
- Tural H, Gökçel H.İ, Ertaş F.N.,** 2003, Enstrümental Analiz I Elektroanalitik Yöntemler, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları No:186, Bornava-İzmir, p.131.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Turner, A.P.F.**, 2013, Biosensors: Sense and sensibility. Chem. Soc. Rev., 42, 3184–3196pp. [CrossRef] [PubMed]
- Tüylek, Z.**, 2017. BEU Journal of Science 6(2), 71-80, 2017 6(2), 71-80pp.
- Tyl, R.W., Myers C.B., Marr M.C., Thomas B.F., Keimowitz A.R., Brine D.R., Veselica M.M., Fail P.A. and Chang, J.C.**, 2002, Three generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. Toxicological Sciences 68 (1):121-46.
- Tyl, R.W., Myers C.B., Marr M.C., Sloan C.S., Castillo N.P., Veselica M.M., Seely J.C., Dimond S.S., Van Miller J.P. and Shiotsuka R.N.**, 2008, Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (Swiss) mice. Toxicological Sciences 104 (2):362-84.
- Updike, S.J., Hicks, G.P.**, 1967, The enzyme electrode, Nature, 214, 986-988pp.
- Vandenberg, L.N., Hauser R., Marcus M., Olea N. and Welshons W.V.**, 2007, Human exposure to bisphenol A (BPA). Reproductive Toxicology 24 (2):139-77.
- Vom Saal, F.S., Akingbemi B.T., Belcher S.M., Birnbaum L.S., Crain D.A., Eriksen M., Farabollini F., Guillette L.J., Hauser R. and Heindel J.J.**, 2007. Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. Reproductive Toxicology 24 (2):131-8.
- Völkel, W., Colnot T., Csanady G.A., Filser J.G. and Dekant W.**, 2002. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. Chemical Research in Toxicology 15 (10):1281-7.
- Wang, J.**, 2005, Carbon Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review, Electroanal., 17, 7–14pp.
- Weber Lozada, K., and Keri, R.A.**, 2011. Bisphenol A increases mammary cancer risk in two distinct mouse models of breast cancer. Biology of Reproduction 85 (3):490-7.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Welshons, W.V., Thayer K.A., Judy B.M., Taylor J.A., Curran E.M. and Vom Saal F.S.,** 2003. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environmental Health Perspectives* 111 (8):994-1006pp.
- Wetherill, Y.B., Akingbemi B.T., Kanno J., McLachlan J.A., Nadal, A., Sonnenschein C., Watson C.S., Zoeller R.T., and Belcher S.M.,** 2007. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive Toxicology* 24 (2):178-98.
- Yang Y.,** 2004, An Amperometric Horseradish Peroxidase Inhibition Biosensor Based on a Cysteamine Self-Assembled Monolayer for the Determination of Sulfides, *Sensors and Actuators B:Chemical*,102, 162–168pp.
- Yao, Y. and Shiu, K. K.,** 2007, Electron Transfer Properties of Different Carbon Nanotube Materials and Their Use in Glucose Biosensors, *Anal. Bioanal. Chem.*, 387, 303–309pp.

TEŞEKKÜR

Lisans ve Yüksek lisans çalışmalarım boyunca maddi manevi her anlamda destek veren, yol gösteren, bilimsel anlamda gelişmemi sağlayan saygı değer hocam Sayın Prof. Dr. Erol AKYILMAZ'a, deneyler sırasında ve diğer zamanlarda varlığıyla ve desteğiyle yanımda olan yüksek lisansın kattığı canım çalışma arkadaşım Sayın Cansu TEMEL'e, lisans döneminin bana kattığı, o dönemden bugünlere birlikte geldiğim canım Sayın Sena AÇIKGÖZ'e, araştırma görevlileri Sayın Umut MENGÜLLÜOĞLU ve Sayın Çağrı ALTUĞ'a teşekkürlerimi borç bilirim. Ayrıca bugüne kadar hayatlarında büyük fedakârlıklar yaparak eğitim hayatımın sağlanmasında başrol oynayan sevgileriyle her zaman desteklerini hissettiğim AİLEM başta olmak üzere, çocukluğumdan beri bu günlere kadar hayatımın her evresinde yanımda olan bana benden çok inanan kız kardeşim Sayın Arzum KARABURUN'a ve tüm arkadaşlarıma bana verdikleri desteklerden dolayı teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezim esnasında TÜBİTAK 2210-A Bursiyeriydim. Bu sebeple bir teşekkürü de Tübitak' a borç bilirim.

28 / 01 / 2022

Asude ŞENOLSUN

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı SOYADI: Asude ŞENOLSUN

Medeni hali: Bekar

Uyruđu: T.C.

Eğitim Bilgileri

Yüksek lisans (2019-2022): Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı

Lisans (2015-2019): Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya

Bölümü

Lise (2011-2015): Tuđba Özbek Anadolu Lisesi