

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**1,5-PENTANDİTİYOL/ALTIN
NANOPARTİKÜL/SİSTEAMİN/GLUTARALDEHİT
MODİFİYE TİROZİN AZ BİYOSENSÖRÜ İLE
BİSFENOL A TAYİN OLANAKLARININ
ARAŞTIRILMASI**

Efe Deniz ÖZTÜRK

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Erol AKYILMAZ

Biyokimya Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 09.12.2016

Bornova-İZMİR

2016

Efe Deniz ÖZTÜRK tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “1,5-PENTANDİTİYOL/ALTIN NANOPARTİKÜL/SİSTEAMİN/GLUTARALDEHİT MODİFİYE TİROZİNAZ BİYOSENSÖRÜ İLE BİSFENOL A TAYİN OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş vetarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı :

.....

Raportör Üye :

.....

Üye:

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “1,5-PENTANDİTİYOL/ALTIN NANOPARTİKÜL/SİSTEAMİN/GLUTARALDEHİT MODİFİYE TİROZİNAZ BİYOSENSÖRÜ İLE BİSFENOL A TAYİN OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI” 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.

.... / / 2016

İmzası

Adı- Soyadı

ÖZET**1,5-PENTANDİTİYOL/ALTIN
NANOPARTİKÜL/SİSTEAMİN/GLUTARALDEHİT MODİFİYE
TİROZİNAZ BİYOSENSÖRÜ İLE BİSFENOL A TAYİN
OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

ÖZTÜRK, Efe Deniz

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez danışmanı: Prof. Dr. Erol AKYILMAZ

Aralık 2016, 55 sayfa

Tez kapsamında biyosensör teknolojisine yeni ve orijinal bir bakış açısı getirecek olan 1,5-pentanditiyol/Altın Nanopartikül/Sisteamin/Glutaraldehit modifiye tirozinaz biyosensör sistemi ile gerek endüstriyel ve gerekse klinik anlamda tayini önem arz eden Bisfenol A maddesinin duyarlı bir şekilde tespitinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Biyosensör tasarımında altın elektrot yüzeyinde; 1,5-pentanditiyol kullanılarak kendiliğinden oluşan tek tabaka oluşumu gerçekleştirilmiştir. 1,5-pentanditiyol modifiye edilmiş altın elektrot üzerine altın nanopartikül damlatılmış, elde edilen bu yüzey üzerine ise sisteamin kaplanmıştır. Sisteaminden kaynaklanan -NH grupları üzerine tirozinaz enzimi immobilize edilip, glutaraldehit ile çapraz bağlama yapılmıştır.

Tasarlanan enzim biyosensör sistemi ile bisfenol A ölçümleri, 0,0 & +0,4 V arasında diferansiyel puls voltametri yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Ölçüm ortamında bulunan $K_3[Fe(CN)_6]$ 'ün belirlenen potansiyel aralığındaki yükseltgenme piklerinde meydana gelene değişimler ile bisfenol A konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkiden yararlanılarak ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Tasarlanan biyosensörün optimizasyon çalışmalarında, elektrot yüzeyinde oluşturulan biyoaktif tabaka bileşenlerine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda optimum enzim miktarı, SAM oluşum süresi, sisteamin bekleme süresi ve glutaraldehit miktarı belirlenmiştir. Çalışma

koşullarının optimizasyonu sırasında ise sıcaklık, pH ve iyon şiddeti gibi parametreler incelenmiştir. Enzim biyosensörünün karakterizasyonuna yönelik yapılan çalışmalarda da bisfenol A'nın doğrusal tayin aralığının belirlenmesi, substrat spesifikliğı, girişimci etkisi, tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, depo kararlılığı ve içme suyunda bisfenol A tayini gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre en uygun enzim miktarı, SAM oluşum süresi, sisteamin bekletme süresi ve glutaraldehit miktarı sırası ile; 117 U/mg, 16 saat, 8 saat ve % 2,5 olarak bulunmuştur. Enzim biyosensörü için çalışma tamponu olarak 100 mM , pH: 7,0 fosfat tamponu kullanılmış, çalışma sıcaklığı ise 30°C olarak belirlenmiştir. Karakterizasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre de enzim biyosensörünün doğrusal tayin aralığı 25-500 µM, cevap süresi 19 saniye olarak bulunmuştur. Geliştirilen enzim biyosensörü ile içme suyunda bisfenol A analizi yapılmış, elde edilen sonuçlar referans bir metot ile karşılaştırılmıştır.

Anahtar kelimeler: 1,5-pentanditiyol, enzim biyosensörü, sisteamin, bisfenol A

ABSTRACT**INVESTIGATION OF BISPHENOL A DETERMINATION CAPABILITIES WITH 1,5-PENTANEDITHIOL/GOLD NANOPARTICLE/CYSTEAMINE/GLUTARALDEHYDE MODIFIED TYROSINASE BIOSENSOR**

ÖZTÜRK, Efe Deniz

Master of Science Thesis, Biochemistry Department

Supervisor : Prof. Dr. Erol AKYILMAZ

December 2016, 55 pages

In this thesis; 1,5-pentanedithiol/gold nanoparticle/cysteamine/glutaraldehyde modified tyrosinase biosensor system which brings a new and original biosensor design intended for bisphenol A determination was developed. Self-assembled monolayer was formed in the presence of 1,5-pentanedithiol onto gold electrode. Gold nanoparticle was dropped onto 1,5-pentanedithiol modified gold electrode; then modified electrode was immersed into cysteamine solution. Tyrosinase was immobilized to $-NH$ groups of cysteamine. Finally, cross-linking agent glutaraldehyde was used.

Bisphenol A measurements with enzyme biosensor was operated between 0.0 & +0.4 V potential with differential pulse voltammetry. Measurements were implemented with the relation of the differentiation of reduction peaks which belongs to $K_3[Fe(CN)_6]$ and bisphenol A concentration.

In the optimization studies, bioactive layer of the enzyme biosensor was studied and optimized. Optimum enzyme amount, self-assembled monolayer formation time, cysteamine incubation time and glutaraldehyde amount was determined. Working conditions were also determined such as temperature, pH and ionic strength.

In the characterization studies; linear range of the biosensor, substrate specificity, interference effect, repeatability, reproducibility, stability and real sample analysis were determined.

Optimum enzyme amount, self-assembled monolayer formation time, cysteamine incubation time and glutaraldehyde amount was found to be 117 U/mg, 16 hours, 8 hours and % 2.5, 100 mM, pH: 7.0 phosphate buffer was used and working temperature was determined 30 °C. Linear range of the biosensor was found to be 25-500 μ M and response time was calculated to be 19 seconds. Real sample analysis were carried out with drink water samples with the enzyme biosensor.

Keywords: 1,5-pentanedithiol, enzyme biosensor, cysteamine, bisphenol A.



TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca maddi manevi her anlamda destek veren, yol gösteren, bilimsel anlamda gelişmemi sağlayan saygı değer hocam Sayın Prof. Dr. Erol AKYILMAZ'a, kıymetli görüşlerinden faydalandığım çalışma arkadaşlarım Ezgi BAYRAM, Duygu GÖÇER, Elçin AD, Pelin KARHAN, Zeynep ÇELİK CANBAY ve Erhan CANBAY'a; araştırma görevlileri Sayın Umut MENGÜLLÜOĞLU ve Sayın Çağrı ALTUĞ'a ve bu aşamaya gelmemde önemli katkıları olan tüm HOCALARIMA teşekkürü borç bilirim. Ayrıca lisansüstü eğitimime başlamamdaki en büyük desteğim olan ve bana her zaman inanan AİLEM başta olmak üzere değerli KARDEŞLERİME, bütün eğitim hayatım boyunca bana verdikleri destekten dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 15-FEN-052 no'lu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. Biyosensörler	1
1.2. Biyosensörlerin Performans Özellikleri	1
1.3. Biyosensörlerin Yapısı	2
1.3.1. Biyokomponentler	3
1.3.2. Transduserler	4
1.4. Biyosensörlerin Sınıflandırılması	5
1.4.1. Optik biyosensörler	5
1.4.2. Termal biyosensörler	5
1.4.3. Piezoelektrik biyosensörler	6
1.4.4. Elektrokimyasal biyosensörler	6
1.5. Voltametri	7
1.5.1. Diferansiyel puls voltametrisi (DPV)	9
1.5.2. Döngüsel voltametri (CV)	9
1.6. Çalışma Kapsamında Kullanılan Biyoaktif Tabaka Bileşenleri ve İmmobilizasyon Yöntemleri	10
1.6.1. Kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAM)	10
1.6.2. Altın nanopartiküller	12
1.6.3. Tirozinaz	13
1.6.4. Glutaraldehit	15
1.7. Bisfenol A	16
2. MATERYAL METOT	17

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.1. Materyal	17
2.1.1. Cihaz ve diğer ekipmanlar.....	17
2.1.2. Kimyasallar	17
2.2. Yöntem.....	17
2.2.1. Biyosensörün hazırlanması	17
2.2.2. Biyosensörün çalışma prensibi.....	19
2.3. 1,5-pentanditiyol/AuNP/sisteamin/tirozinaz/GA Enzim Biyosensörünün CV Karakterizasyonu	20
2.4. 1,5-pentanditiyol/AuNP/sisteamin/tirozinaz/GA Biyosensörünün Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyon Çalışmaları.....	20
2.4.1. Enzim aktivitesinin biyosensör cevabına etkisi	20
2.4.2. SAM oluşum süresinin biyosensör cevabına etkisi.....	20
2.4.3. AuNP miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	21
2.4.4. Sisteamin çözeltisinde bekletme süresinin biyosenör cevabı üzerine etkisi	21
2.4.5. Glutaraldehit miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi	21
2.5. Çalışma Koşullarının Optimizasyonu	22
2.5.1. Sıcaklığın biyosensör cevabı üzerine etkisi	22
2.5.2. pH'ın biyosensör cevabı üzerine etkisi	22
2.5.3. İyon şiddetinin biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	22
2.6. 1,5-pentanditiyol/AuNP/sisteamin/tirozinaz/GA Biyosensörünün Karakterizasyon Çalışmaları	23
2.6.1. Bisfenol A için doğrusal tayin aralığının belirlenmesi.....	23
2.6.2. Enzim biyosensörünün tekrarlanabilirliğinin incelenmesi	23
2.6.3. Enzim biyosensörünün tekrar üretilebilirliğinin incelenmesi	23
2.6.4. Enzim biyosensörünün substrat spesifikliğin incelenmesi.....	23
2.6.5. Enzim biyosensörüne girişimci etkisinin incelenmesi	24
2.6.6. Enzim biyosensörünün depo kararlılığı.....	24
2.6.7. Enzim biyosensörü ile pet su şişelerinde BPA tayinine yönelik yapılan çalışmalar	24

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	25
3.1. 1,5-pentanditiyol/AuNP/sisteamin/tirozinaz/GA Enzim Biyosensörünün CV Karakterizasyonuna İlişkin Olarak Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Sonuçlar .	25
3.2. 1,5-pentanditiyol/AuNP/sisteamin/tirozinaz/GA Enzim Biyosensörünün Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyonuna Yönelik Yapılan Çalışmaların Sonuçları	26
3.2.1. Enzim aktivitesinin biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgular	26
3.2.2. SAM oluşum süresinin biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgular	28
3.2.3. AuNP miktarının biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgular.....	30
3.2.4. Sisteaminde bekletme süresinin biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgular	32
3.2.5. Glutaraldehit miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	34
3.3. Çalışma Koşullarının Optimizasyonuna Yönelik Yapılan Denemelerin Sonuçları	36
3.3.1. Optimum sıcaklığın belirlenmesi	36
3.3.2. Optimum pH'ın belirlenmesi	37
3.3.3. Optimum iyon şiddetinin belirlenmesi.....	38
3.4. 1,5-pentanditiyol/AuNP/sisteamin/tirozinaz/GA Biyosensörünün Karakterizasyon Çalışmalarına Yönelik Elde Edilen Sonuçlar	39
3.4.1. Enzim biyosensörünün bisfenol A için doğrusal tayin aralığı	39
3.4.2. Enzim biyosensörünün tekrarlanabilirliği.....	41
3.4.4. Enzim biyosensörünün substrat spesifikliğine yönelik elde edilen sonuçlar	43
3.4.5. Enzim biyosensörünün cevabına girişimcilerin etkisine yönelik elde edilen sonuçlar	44
3.4.6. Enzim biyosensörünün depo kararlılığı	45
3.4.7. Enzim biyosensörü ile içme sularında BPA tayinine yönelik yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar	46
4.DEĞERLENDİRME	48
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Biyosensörlerin çalışma prensibi.	2
1.2. Kullanılan transdusere göre biyosensörlerin sınıflandırılması.....	4
1.3. Elektrokimyasal bir ölçüm şeması ve üçlü elektrot sistemi.	8
1.4. Voltametrik çalışma elektrotları.....	8
1.5. Akım-potansiyel (a) ve akım farklanması-potansiyel (b) eğrileri.....	9
1.6. Zaman-potansiyel (a) ve akım-potansiyel (b) eğrileri.....	10
1.7. Amfifilik adsorbatların katı bir yüzey üzerinde kendiliğinden.....	11
1.8. Tirozinaz enziminin enzimatik aktivitesi.....	14
1.9. Tirozinaz enzimin aktif bölgesinde bulunan bakır iyonlarının koordinasyonu.	15
1.10. Bisfenol A'nın kimyasal yapısı.....	16
2.1. Enzim biyosensörünün immobilizasyon aşamaları.....	19
2.2. Enzim biyosensörünün ölçüm prensibi.	19
3.1. Enzim biyosensörünün yüzey modifikasyonuna ilişkin CV voltammogramları..	26
3.2a. Enzim aktivitesinin biyosensör cevabına etkisi..	27
3.2b. Optimum enzim aktivitesinin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalardan alınan sonuçlarla çizilen standart grafikler..	28
3.3a. SAM oluşum süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	29
3.3b. Optimum SAM oluşum süresinin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalardan alınan sonuçlarla çizilen standart grafikler..	30

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.4a. AuNP miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	31
3.4b. Optimum AuNP miktarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalardan alınan sonuçlarla çizilen standart grafikler.....	32
3.5a. Sisteaminde bekletme süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	33
3.5b. Optimum sisteaminde bekletme süresinin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalardan alınan sonuçlarla çizilen standart grafikler.....	34
3.6a. Glutaraldehit miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	35
3.6b. Optimum glutaraldehit miktarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalardan alınan sonuçlarla çizilen standart grafikler.....	36
3.7. Enzim biyosensörünün optimum sıcaklık grafiği.....	37
3.8. Enzim biyosensörünün optimum pH grafiği.....	38
3.9. Enzim biyosensörünün optimum iyon şiddeti grafiği.....	39
3.10a. Enzim biyosensörünün doğrusal tayin aralığının belirlenmesi amacıyla alınan ölçümlerin DP voltammogramları..	40
3.10b. Enzim biyosensörünün doğrusal tayin aralığı.....	41
3.11. Enzim biyosensörünün tekrarlanabilirliğini incelemek amacıyla hazırlanan standart grafik.....	42
3.12. 4 farklı elektrot ile 25, 100 ve 500 µM BPA için alınan ölçümlerin ortalama sonuçları.....	42
3.13. BPA tayinine yönelik geliştirilen enzim biyosensörünün substrat spesifikliğine yönelik yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar.....	44
3.14. BPA tayinine yönelik geliştirilen enzim biyosensörüne girişimci etkisine yönelik yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar..	45
3.15. Enzim biyosensörünün depo kararlılığı.....	46

ÇİZELGELER DİZİNİÇizelgeSayfa

3.1. Bisfenol A için elde edilen tekrarlanabilirlik değerleri.....	41
3.2. Hazırlanan modifiye biyosensörler ile çizilen standart grafiklerin R^2 değerleri ve farklı bisfenol A konsantrasyonlarda alınan ölçümlerin ortalamaları, standart sapma değerleri ve % varyasyon katsayıları.....	43
3.3. Bisfenol A'nın tasarlanan enzim biyosensörü ve referans metot ile tayini sonucu elde edilen değerler.....	47



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
CV	Döngüsel voltametri
SAM	Kendiliğinden oluşan tek tabaka
AuNP	Altın nanopartikül
Tyr	Tirozinaz
GA	Glutaraldehit
BPA	Bisfenol A
Au	Altın
Cys	Sisteamin

1.GİRİŞ

1.1. Biyosensörler

Biyosensörler; izole edilmiş enzimler, immüno sistemler, dokular, yapay enzimler ve organeller veya hücreler tarafından yönlendirilen biyokimyasal reaksiyonları kullanarak oluşan çeşitli (elektriksel, termal veya optik sinyaller) sinyallerin yardımıyla herhangi bir analitin kalitatif ve kantitatif tayinini sağlayan aygıtlardır. Basitlikleri, yüksek duyarlılıkları ve gerçek zamanlı analizlere uygulanabilirlikleri nedeniyle çok farklı ve geniş alanlarda kullanılmaktadır. Biyosensör tasarımı sırasında kimya, biyoloji ve mühendislik gibi disiplinler arası araştırmalara gerek duyulmaktadır (Mehrotra, 2016).

Biyosensörlerin tarihi, 1950'li yıllarda L.C. Clark'ın bir ameliyat sırasında kandaki O_2 miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlamıştır. 1962 yılında da Clark ve Lyons, glukoz oksidaz enzimini O_2 elektrodu ile kombine ederek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başarmışlardır.

1.2. Biyosensörlerin Performans Özellikleri

Seçimlilik: Diğer analiz yöntemleriyle kıyaslandığında; seçimlilik biyosensörlerin en önemli performans faktörlerinden biridir. Bir biyosensörün seçimliliği üzerine başlıca etki eden parametreler; sensörle girişim, biyokatalizörlerle girişim ve pH'dır.

Kararlılık: Bir biyosensörün kararlılığı diğer faktörlerde yeterli koşullar sağlandığında onun pratik kullanımının en önemli belirtisidir. Kararlılık, biyosensörün ömrü konusunda bilgi verir. Kararlı bir biyosensör tasarlayarak aynı materyalle yapılabilecek analiz sayısı da artacaktır.

Kalibrasyon gereksinimi: İdeal bir biyosensörde aranması gereken faktörlerden biri de kalibrasyona gereksinim duyulmamasıdır. Bu özellik teorikte planlandığı gibi pratikte her zaman gerçekleştirilememektedir.

Tekrarlanabilirlik: İdeal bir biyosensörün aynı koşullar altında art arda yapılan analizlerde hemen hemen aynı sonuçları vermesi beklenmektedir. Bu yüzden; tasarlanan biyosensörün tekrarlanabilirliği mutlaka incelenmelidir.

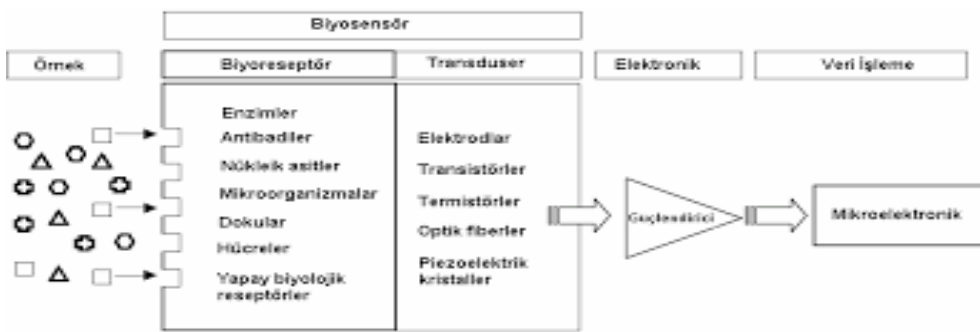
Tayin sınırı: Tasarlanan biyosensörün tayin alt sınırının, yapılan analizdeki beklentiye göre belirli bir konsantrasyona kadar inmesi gerekmektedir. Bu sınır, elektrot yüzeyinin genişliğine, biyoreseptörün tayini yapılmak istenen maddeye ilgisine veya immobilizasyon metoduna göre farklılık gösterebilir.

Ölçüm aralığı: Ölçüm aralığı olarak adlandırılan bölge, biyosensörden alınan elektriksel sinyal-konsantrasyon eğrilerinin doğrusal olduğu aralıktır. Bu aralık ne kadar geniş olursa, biyosensörün duyarlılığı da o kadar yüksek olacaktır.

Cevap süresi: Bir biyosensörün cevap süresi ne kadar kısaysa; kullanılabilirliği o kadar yüksektir. Cevap süresi; amperometrik biyosensörlerde akım-zaman eğrilerinden anlaşılabilirken; potansiyometrik elektrokimyasal biyosensörlerde optimize edilerek en doğru cevap süresi tayin edilebilmektedir.

1.3. Biyosensörlerin Yapısı

Biyosensörler temel olarak iki kısımdan oluşur. Bunlar; biyokomponentler (reseptör) ve fiziksel komponentlerdir (transduser). Biyosensör tasarımında temel amaç, reseptörde gerçekleşen biyokimyasal dönüşüm sırasında oluşan elektriksel farklanmanın transduserde elektriksel sinyale dönüştürülmesidir. Şekil 1.1’de bir biyosensörün çalışma prensibi şematize edilmiştir (Velasco-Garcia and Mottram, 2003).



Şekil 1.1. Biyosensörlerin çalışma prensibi.

1.3.1. Biyokomponentler

Biyokomponentler çoğu zaman biyoreseptörler olarak da adlandırılırlar. Yaygın olarak kullanılan biyoreseptörler; enzimler, antikorlar, mikroorganizmalar, doku preparatları ve nükleik asitlerdir. Biyoreseptörler analizlenecek maddeyi kimyasal olarak dönüşüme uğrattırır. Bu dönüşüme eşlik eden veya bu dönüşüm sonucu açığa çıkan sinyaller transduser tarafından algılanır. Yüksek seçiciliklerinden dolayı enzimler; en sık kullanılan biyoreseptörlerdir. Uygun bir enzimin bulunamaması durumunda veya birden fazla maddenin edilmesi gereken durumlarda da mikroorganizmalardan da faydalanılabilir. Değişik reseptör davranışı gösteren mikroorganizmalar; biyolojik oksijen gereksinimi, toksisite ve mutajenite testlerinde sıklıkla kullanılabilir.

Biyokomponentlerin immobilizasyonu

Uygun biyokomponent ve transduser seçildikten sonra, bunların birbirlerine bağlanması biyosensör tasarımında oldukça önemli bir noktadır ve buna *biyokomponent immobilizasyonu* adı verilir. Bağlama işlemi pek çok farklı yöntemle yapılabilmekle beraber; hangi yöntemin kullanılacağı seçilen transduser ve biyokomponente göre değişir. Biyosensör immobilizasyonunda sıklıkla 5 farklı yöntem kullanılmaktadır. Bunlar;

Kovalent bağlama: Biyokomponentin transduser yüzeyine kimyasal bir reaksiyon sonucu kovalent olarak bağlanmasıdır.

Tutuklama: Biyokomponentin bir membran veya matriks içinde hapsedilmesidir.

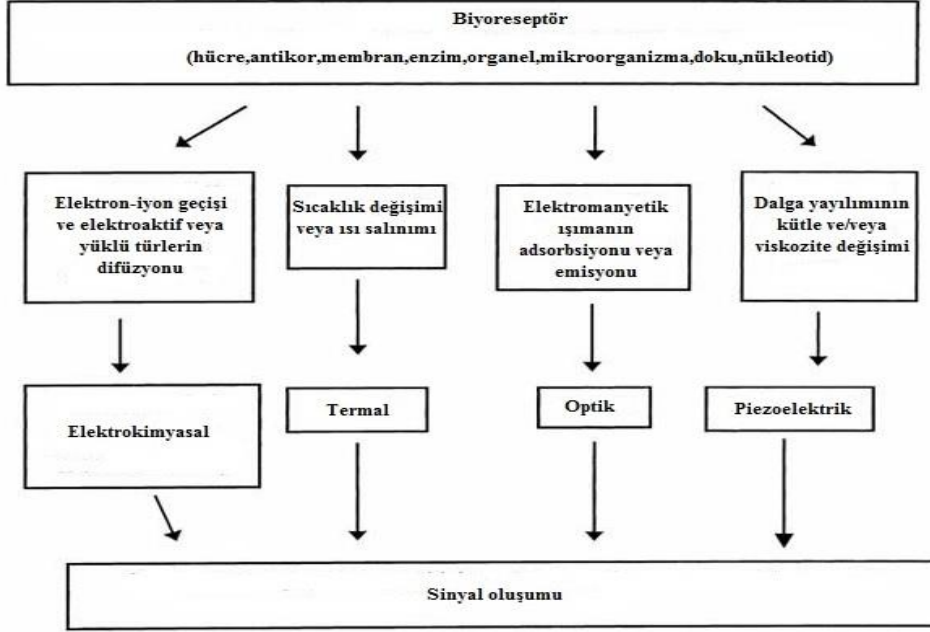
Çapraz bağlama: Tutuklanmış biyokomponentlerin bifonksiyonel reaktiflerle film veya tabakaya kovalent olarak bağlanması sağlanır.

Adsorbsiyon: Biyokomponentin bir film veya tabaka üzerine kovalent olmayan etkileşimlerle (hidrofobik, hidrofilik veya iyonik etkileşim) adsorblanmasıdır.

Biyolojik bağlama: Biyokomponentin bir film veya tabaka üzerine spesifik biyokimyasal bağlama yollarıyla assosiyasyonudur.

1.3.2. Transduserler

Biyokomponentlerin biyokimyasal reaksiyonları sonucu açığa çıkan sinyalleri, ölçülebilir fiziksel sinyale dönüştüren cihazlara transduser adı verilir. Teorik olarak biyokomponent ve transduserlerin birçok kombinasyonu oluşturulabilmekle beraber; bu kombinasyonlar herhangi bir elektriksel bir sinyal oluşturmazsa biyosensör fonksiyon göstermez. Şekil 1.2' de kullanılan transduser türüne göre biyosensörlerin sınıflandırılması şematize edilmiştir.



Şekil 1.2. Kullanılan transduser türüne göre biyosensörlerin sınıflandırılması (Ötleş, 2011).

Transduser yüzeyinin kaplanması

Transduser yüzeyi kaplanırken, ya polimerizasyon doğrudan transduser yüzeyinde gerçekleştirilip bir film elde edilir; veya önceden hazırlanan polimer ile transduser yüzeyi kaplanır. Polimer, transduser yüzeyine adsorbsiyon veya kovalent bağlama ile tutturulur.

Daldırma yöntemi

Elektrot ilk olarak enzim ve reaktif polimer veya inert bir protein ve çapraz bağlayıcı reaktifi içeren karışıma daldırılır. Belirli bir bekleme süresinin ardından elektrot yüzeyinde oluşan film bir O-ring ile tutturulur. Son adımda elektrot

nötrleştirilir ve çapraz bağlayıcının fazlası uzaklaştırılır (Suaud-Chagny and Pujol, 1985).

Direkt bağlama yöntemi

Daldırma yönteminde biyokomponent ve transduser yüzeyinde film oluşturacak maddenin bir çözeltisi hazırlanmaktadır. Kullanılacak biyokomponentin yeterli miktarda elde olmaması durumunda, daldırma yöntemiyle transduser yüzeyinde önce bir membran oluşturulacağı gibi; hazır membranlarla da kaplama yapılabilir. Az miktarda biyokomponent çözeltisi ince bir tabaka oluşturacak şekilde damlatılır ve ardından çapraz bağlayıcı ilave edilir (Tran Minh Canh and Beaux, 1979).

Membran kullanımı

Bu yöntemle, önce biyokomponenti immobilize halde içeren membran hazırlanır ve bu membran ile transduser yüzeyi kaplanır. Böylece aynı karakterli membrandan bol miktarda hazırlanabilir ve bu membranlar biyosensör tasarımı için oldukça uygundur (Mascini et al., 1983).

1.4. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

1.4.1. Optik biyosensörler

Optik temelli biyosensörler, transduser olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle biyokomponent immobilize edilerek hazırlanan ölçüm sistemleridir. Biyokimyasal reaksiyon sonucu meydana gelen kimyasal ya da fizikokimyasal değişimin ölçümü esas alınır. Sinyal; ışık yansımaları, saçılımı ya da yayımı sonucu oluşur.

1.4.2. Termal biyosensörler

Bu tür biyosensörlerin temel ilkesi; biyokimyasal reaksiyon sonucu entalpide meydana gelen değişimden yararlanılarak substrat konsantrasyonunu belirlemektir. Oldukça küçük sıcaklık değişimleri termal olarak yalıtılmış ortamlarda izlenebilir.

1.4.3. Piezoelektrik biyosensörler

Piezoelektrik biyosensörler, karakteristik rezonans frekansındaki farklanmayı belirleyerek, bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlelerinin ölçülmesi esasına dayanır. Biyosensör seçimliliği, kristal yüzeyde madde ile spesifik bir etkileşime sahip analitin birikimi ile orantılıdır.

1.4.4. Elektrokimyasal biyosensörler

İyon veya elektron gibi elektroaktif türlerin açığa çıktığı yada bu türlerin kullanıldığı reaksiyonların temel alındığı durumlarda; elektrokimyasal temelli biyosensörler sıklıkla kullanılabilir. Çözeltinin elektriksel özelliklerinde meydana gelen değişimlerin ölçülmesi esasına göre elektrokimyasal temelli biyosensörler tasarlanır. Elektrokimyasal biyosensörler; ölçülen elektriksel parametreye göre 3 gruba ayrılırlar.

Kondüktometrik elektrokimyasal biyosensörler

Bu tür biyosensörlerle çözeltinin elektriksel direnci ölçülür. Elektrokimyasal tepkimeler sonucu oluşan elektronlar veya iyonlar çözeltinin iletkenliğinde ve direncinde değişimlere yol açar. Kondüktometrik ölçümler nicel olarak incelendiği zaman düşük duyarlılığa sahiptir. Derişim polarizasyonu ve çift tabakalı yükleme gibi istenmeyen etkilerin önüne geçmek amacıyla alternatif akım kullanılarak elektrik alan oluşturulur.

Amperometrik elektrokimyasal biyosensörler

Amperometrik temelli biyosensörlerle yapılan ölçümlerin temeli, analizi yapılmak istenen maddenin belirli bir potansiyel altında indirgenmesi veya yükseltgenmesidir. Biyokimyasal reaksiyon sonucu oluşan akım analit konsantrasyonuna bağlıdır.

Potansiyometrik elektrokimyasal biyosensörler

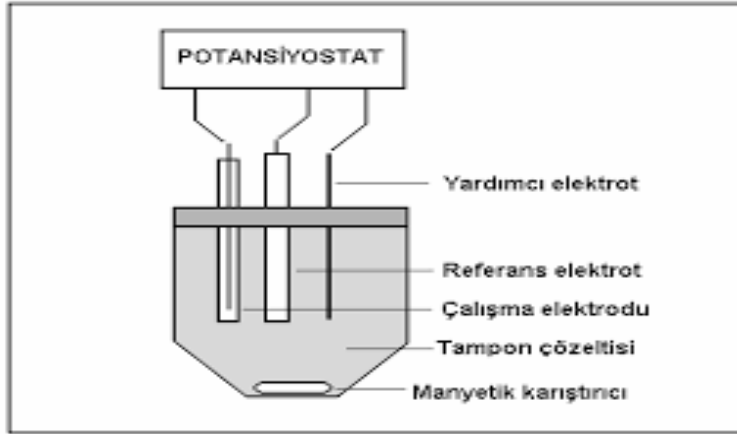
Potansiyometrik biyosensörlerde, biyokimyasal tepkimeyi elektriksel sinyale dönüştürmek için iyon seçimli elektrotlar kullanılır. Ölçüm prensibi bir karşılaştırma elektrodu ve uygun bir çalışma elektrodu ile oluşturulan elektrokimyasal hücrede ölçülen gerilim değerleri ile hücre çözeltisindeki türlerin

nicel analizinin yapılmasıdır. Çalışma elektrodu, çözeltilerdeki türlerden bazılarında seçicilik gösteren ve iç kısmında bir başka karşılaştırma elektrodu ile nicel analizi yapılacak türün belirli derişimdeki çözeltisi bulunan ve bir membran ile analizi yapılacak çözeltilerden ayrılmış bir elektrottur. Analizlenecek çözeltilere daldırılan bu elektrot ile aynı çözeltilere temas halinde olan bir karşılaştırma elektrodu arasında logaritmik bir ilişki vardır. Hücredeki gerilimin ölçümü sırasında iki elektrot arasında uygun bir devre yardımıyla bir akımın geçmemesi sağlanır. İçte ve dışta bulunan çözeltilerde analizi yapılacak türün derişimi açısından bir fark varsa membranın iç yüzeyi ve dış yüzeyi arasında bir gerilim farkı oluşur. Bu gerilim farkının değeri, analizi yapılan türe ve derişimine bağlı olduğu gibi, membranın cinsine ve çözeltilerde bulunan öteki bileşenlerin cins ve miktarına bağlıdır. Reseptör olarak enzim kullanılan potansiyometrik biyosensörlerde katalizlenen tepkime sonucu ya hidrojen iyonu oluşur veya hidrojen iyonu adsorblanır. Potansiyometrik biyosensör olarak kullanılan elektrotlar 2 grup altında incelenebilir:

- Normal pH elektrot: Bu elektrotlar belirli bağlanma bölgelerine bağlanan katyon derişimine bağlı olarak elektriksel potansiyel oluşturmaktadır.
- Duyar gaz geçirgen pH elektrot: Membrandan difüzlendi gazlar membran ve elektrot arasındaki çözeltilerde pH derişimine neden olur.

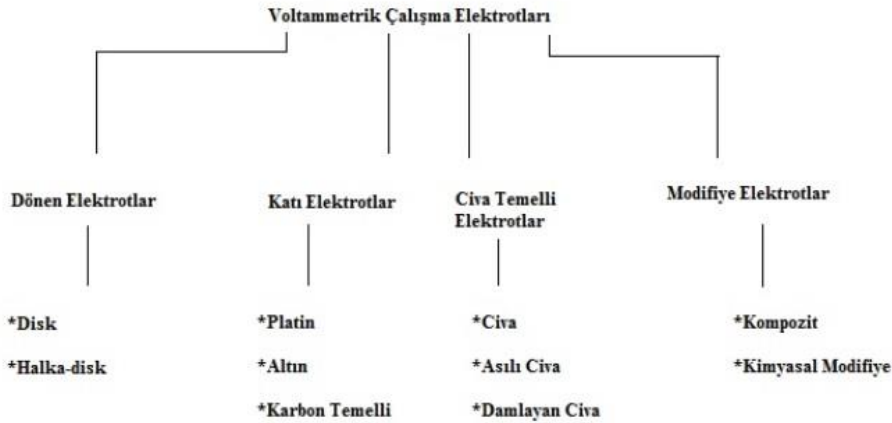
1.5. Voltametri

Akım, gerilim ve derişim ilişkilerini inceleyen elektroanalitik yöntem voltametri denir. Voltamogram denen akım-gerilim eğrileri $i=f(E)$ iki veya üç elektrotlu sistemlerle elde edilir. Bu elektrotlar çalışma elektrodu, karşılaştırma elektrodu ve yardımcı elektrottur (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Elektrokimyasal bir ölçüm şeması ve üçlü elektrot sistemi (Cin, 2007).

Voltametrde çok çeşitli çalışma elektrotları kullanılabilir. Temelde bu elektrotlar, civa temelli, katı, modifiye ve döner elektrotlar olarak dört kategoriye ayrılabilir (Şekil 1.4).



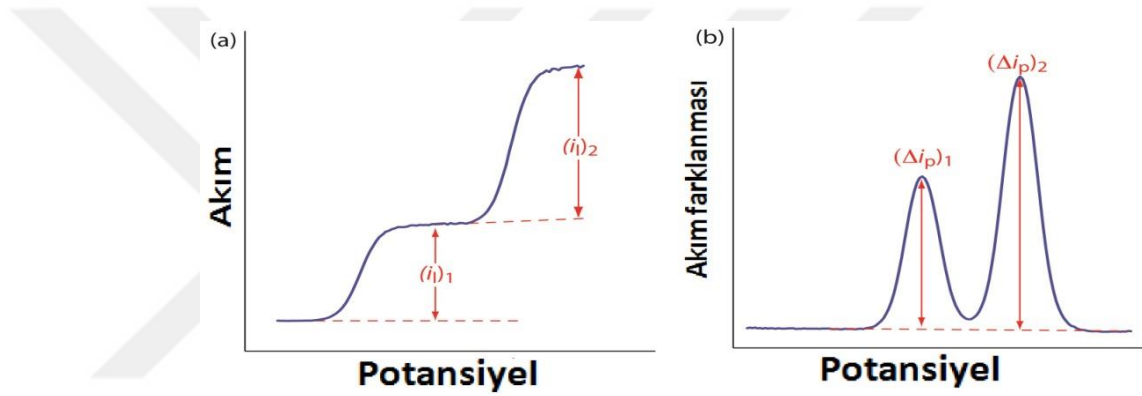
Şekil 1.4. Voltammetrik çalışma elektrotları.

Voltametrde polarize elektrotlar arasına giderek artan miktarda bir gerilim uygulanır. Ayrışma gerilimine (E_a) dek sistemden bir akım geçmez. Daha sonra akımda hızlı bir artış gözlenir. Akımdaki artışın hızı özellikle seyreltik çözeltilerde gerilim arttıkça bir süre sonra azalır ve sınır bir değere ulaşır. Buna limit akım denir. Limit akım karıştırma hızına ve derişime bağlı olarak değişir. Akımı, birim zamanda elektroda taşınan tanecik sayısı (taşınma hızı) belirler. Taşınma olaylarından hangisi egemense limit akım onun adını alır.

Voltametik yöntemin duyarlılığını arttırmak için ileri voltametik teknikler geliştirilmiştir. Bunun yanı sıra, elektrot mekanizmalarının aydınlatılmasında yine bir ileri voltametik teknik olan döngüsel voltametri (CV) kullanılmaktadır. Özellikle elektrokimyasal biyosensörlerde, ileri voltametik tekniklerden olan diferansiyel puls voltametrisi (DPV) yaygınlaşmaya başlamıştır.

1.5.1. Diferansiyel puls voltametrisi (DPV)

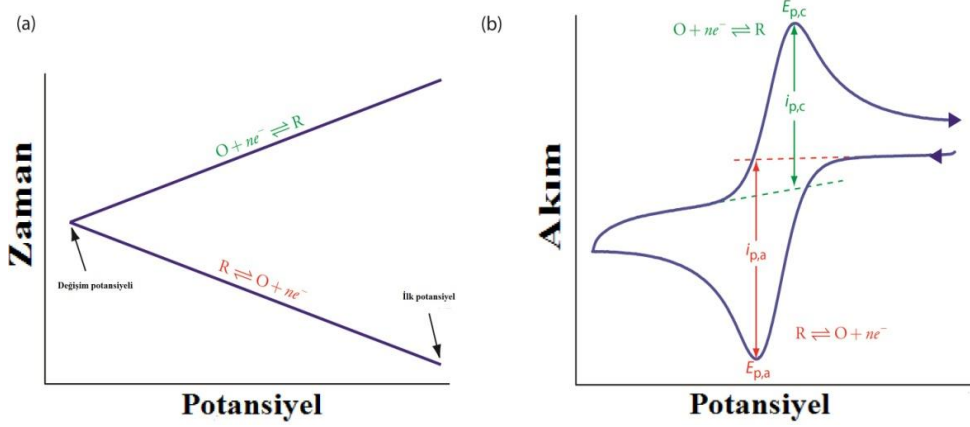
Bu yöntemde sığasal artık akımın ölçülen akımdaki payını azaltmak ve seçimliliği arttırmak için pulsun başında ve sonundaki akımlar ölçülüp farkları alınmaktadır. Yöntemde giderek artan bir doğru akım potansiyeline sabit genlikli pulslar uygulanır (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Akım-potansiyel (a) ve akım farklanması-potansiyel (b) eğrileri (Harvey, 2016).

1.5.2. Döngüsel voltametri (CV)

Yöntemde potansiyel tarama işlemi döngüselidir. Potansiyel E_1 değerinden E_2 değerine belirli bir hızla tarandıktan sonra, taramanın yönü çevrilerek E_1 değerine tekrar ulaşılır. Böylelikle elektrokimyasal tepkimeyle oluşan ürünün, ters döngüyle elektrokimyasal davranışını inceleme olanağı ortaya çıkar. Tarama tek bir döngüyle sonlanabileceği gibi ardışık döngülerle defalarca yapılabilir. Ayrıca sonlanma potansiyeli başlangıç potansiyeli ile aynı olmayabilir. Tepkime tersinir olduğunda taramanın bir yönünde indirgenme, diğer yönünde yükseltgenme olacağından her iki olaya ilişkin pik yükseklikleri birbirine eşit olur (Şekil 1.6). Pik akımları ve pik potansiyellerinden yola çıkılarak tepkimenin tersinir olup olmadığı veya difüzyon kontrollü olup olmadığı anlaşılır (Anık, 2013).

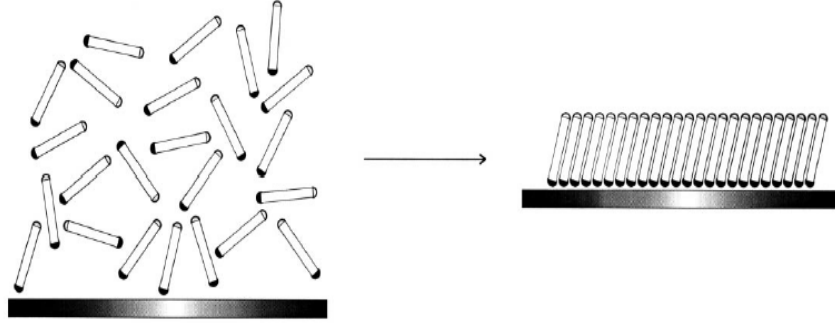


Şekil 1.6. Zaman-potansiyel (a) ve akım-potansiyel (b) eğrileri (Harvey, 2016).

1.6. Çalışma Kapsamında Kullanılan Biyoaktif Tabaka Bileşenleri ve İmmobilizasyon Yöntemleri

1.6.1. Kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAM)

Kendiliğinden oluşan tek tabaka (SAM) oluşumu, katı bir substrat ve seçilen organik molekülün baş kısmı arasındaki kuvvetli kemisorbsiyon tarafından teşvik edilir; ve sonuç olarak kontrol edilebilir, çok ince boyutlu organik filmler edilir (Bain et al., 1989; Dubois and Nuzzo, 1992; Ulman, 1991). Katı bir substratın oda sıcaklığındaki adsorbat çözeltisine daldırılarak iyi tanımlanmış ve organize edilmiş yüzeylerin elde edilmesi; mesafeye dayalı elektron transferi (Becka ve Miller, 1993), tekli elektron transistör mekanizması (L. Feldheim et al., 1998) ve Coulomb merdiveni (Dorogi et al., 1995) gibi moleküler olayların izlenmesinde oldukça kullanılabilir bir durum oluşturmaktadır. Hem metal hem de yarı iletkenlerin tekli nanogruplarının oluşturulmasıyla; tek tabakaların terminal fonksiyonları, nanomimarilerinin daha iyi kontrol edilmelerini sağlamaktadır (K. Vijaya Sarathy et al., 1999; Pethkar et al., 2001). Bu mimari, biyomoleküler elektronik ve biyosensör tasarımı gibi optik ve elektronik özellikleri uygun bi-fonksiyonel molekülün seçilmesiyle hafifletilebilen uygulamalarda büyük bir potansiyele sahiptir (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Amfifilik adsorbatların katı bir yüzey üzerinde kendiliğinden oluşumu (Park et al., 2014).

Mevcut biyosensörler geliştirildikçe, yeni biyosensör tasarımı konusunda yapılan araştırmalar artmaya başlamıştır. Özellikle klinik uygulamalarda minyatürize edilmiş biyosensörlere duyulan gereksinim bu hızlı artışa sebep olmuştur. Kendiliğinden oluşan tek tabakalar çeşitli özellikleriyle bu tür uygulamalara ilgi çekici yenilikler sunmaktadır. İlk olarak; sadece yeteri kadar kaynağa ihtiyaç duyduklarından dolayı minyatürize edilmeleri daha kolaydır. Ayrıca kendiliğinden oluşan tabakaların alkan tiyollerinin iyi düzenlenmiş ve sıkı uzun zincirleri hücrel çevrenin lipid çift tabaka yapısına büyük oranda benzerlik gösterdiğinden; immobilize biyomoleküllere uygun bağlanma bölgeleri sağlamaktadır. Kolay üretilbilir olmaları ve elektrokimyasal ölçümlerde metal substratlarla (altın, gümüş vb.) uyumlu olmaları potansiyometrik ölçümler de dahil olmak üzere pek çok yöntem için kolaylık oluşturmaktadır. Son olarak da immobilize edilmiş moleküllerde modifiye edildikten sonra bile kimyasal kararlılıklarını büyük ölçüde koruduklarından; elektrokimyasal, optik veya piezoelektrik transduserlerle kullanımları mümkündür (Chaki and Vijayamohanan, 2002).

Tek tabakaların hazırlanması ve karakterizasyonu

Kendiliğinden oluşan tek tabakaların avantajlarından biri çok kolay metotlarla laboratuvar ortamında hazırlanabilmeleridir. Çalışılmak istenen katı substrat, tabakası oluşturulmak istenen molekülün çözeltisine daldırılır; molekülün çözünürleştirildiği çözücü ile yıkanarak inert bir gaz altında kurutulur. Katı substratın yapısı ve sertliği, çözücünün özellikleri, adsorbatın doğası, adsorbatın derişimi ve sıcaklık gibi faktörler tek tabakaların dizilimini etkilemektedir. Ayrıca katı substratın temizliği ve kristal özelliği tek tabakanın yoğunluğunun belirlenmesinden önemlidir. Pek çok substrat için kesin bir temizlik prosedürü ve

substrat ön muamelesi, tek tabaka dizilimi oluşturulmadan önce yapılması gereken işlemlerdir (Bain et al., 1989).

Kararlı olmaları, tekdüze yüzey yapısı oluşturmaları ve tabakanın inceliğinin görece olarak kolay ayarlanabilir olması kendiliğinden oluşan tabakaların biyosensör tasarımında kullanımını uygun hale getirmektedir. Uygun SAM kullanılması, biyomoleküllerin kontrollü bir şekilde yönelimlerini sağlamaktadır (Cheng et al., 2008; Jung et al., 2006).

Kendiliğinden oluşan tek tabaka temelli enzimatik biyosensörler

Enzimatik biyosensörler, enzim ve substratı arasında gerçekleşen spesifik reaksiyon sonucu açığa çıkan elektroaktif türlerin (hidrojen, hidrojen peroksit, amonyum vb.) elektrot yüzeyinde ölçülmesini sağlayan sistemlerdir (Arya et al., 2009). Kendiliğinden oluşan tek tabaka temelli enzim modifiye biyosensörler bazı etkili girişimcilere karşı seçicilik sağlamaktadır (Zhong et al., 2005). Ayrıca; kendiliğinden oluşan tek tabakalar altın nanopartikül ve enzimlerin birlikte kendiliğinden oluşumlarını da sağlayabilmektedir (Zhong et al., 2005). Altın nanopartiküllerin kendiliğinden oluşan tabakalarla bu şekilde bir araya getirilmesiyle yüzey alanı artırılmış olur; ve böylece enzim yüklemesinin yakın bir çevrede gerçekleşmesi sonucunda tasarlanan biyosensörlerin hassasiyeti artırılmış olur. Bunlara ek olarak kendiliğinden oluşan tek tabakalar, amperometrik biyosensörlerin kararlılıklarının artırılmasında (Vidal et al., 2004) ve tekrarlanabilir yanıtların alınmasında da etkili olmaktadır (Sirkar et al., 2000).

1.6.2. Altın nanopartiküller

Yapılan son araştırmalarda görülmektedir ki, biyosensörlerin performans faktörleri biyomoleküllerin immobilizasyonuna doğrudan bağlıdır. Bu bağlamda; biyosensör tasarımında nanomalzemelerin kullanımı heyecan verici bir yaklaşım teşkil etmektedir. Bu cihazların oldukça umut vaat eden özellikleri, nanomalzemelerin eşsiz doğasından kaynaklanmaktadır (Katz et al., 2004).

Altın nanopartiküllerin (AuNPs), biyomoleküllerin immobilizasyonunu kararlı bir şekilde sağlarken aynı zamanda biyoaktivitelerini devam ettirmelerine olanak vermeleri biyosensör tasarımında oldukça büyük bir avantajdır. Üstelik; altın nanopartiküller, elektrot materyali ve redoks proteinleri arasında doğrudan elektron transferi sağlayarak mediyatör gereksinimini de ortadan kaldırırlar.

Yüksek yüzey-hacim oranları, yüksek yüzey enerjileri, protein-metal partikül mesafe aralığını düşürmeleri ve prostetik grup ile elektrot yüzeyi arasında elektron yürütücü olarak işlev gösterme özellikleriyle elektrot yüzeyi ve redoks proteini arasında elektron transferinin gerçekleşmesini sağlamaktadır (Liu et al., 2003; Yáñez-Sedeño and Pingarrón, 2005). Altın nanopartiküller ayrıca; hidrojen peroksit, oksijen ve NADH gibi moleküllerin redoks işlevlerinin elektrokatalizi için kullanışlı bir ara yüz alanı da oluştururlar (Md. Harunar Rashid et al., 2006).

Altın nanopartiküllerin elektrot yüzey modifikasyonu ya da elektrot ana malzemesi olarak kullanılması analitik sinyalin katalitik olarak artışına ve yapılan ölçümün hassasiyetinin artmasını sağlamaktadır. Ayrıca enzimatik, immüno veya DNA biyosensörlerinin immobilizasyonunda uygun bir destek malzemesi olarak da işlev görebilmektedirler (Trojanowicz, 2006).

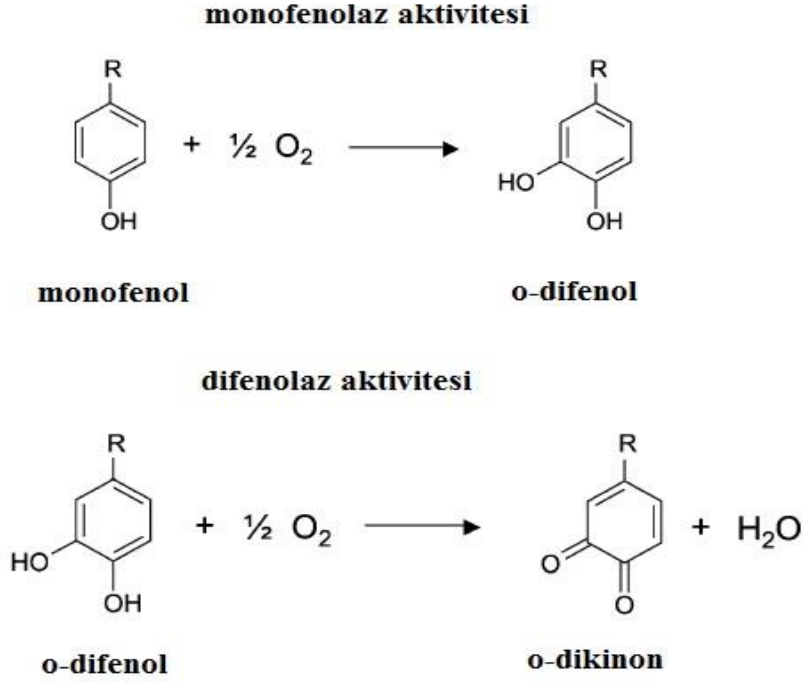
Voltametri, altın nanoyapılar ile modifiye edilmiş elektrot sistemlerinin elektrokimyasal teşhisini sağlayan bir yöntemdir. Bu tür ölçümler potansiyometrik veya amperometrik tayin yöntemlerinden daha önce kullanılarak, elektrot sisteminin analitik işleyişi hakkında detaylı bilgiler vermektedir. Buna bağlı olarak altın nanopartikül içeren yöntemler inorganik iyonlar ve küçük organik moleküllerin tayininde kullanılabilir. Bu yöntemler; enzimatik, immünokimyasal ve DNA biyosensörlerine uygulanabilmektedir (Trojanowicz, 2006).

1.6.3. Tirozinaz

Tirozinazlar (E.C 1.14.18.1) doğada yaygın biçimde bulunan ve bakır içeren enzimlerdir (Lerch, 1995; Mayer, 1986). Melanin düzenlenmesi ve çeşitli işlevleri açısından oldukça gerekli enzimlerdir (Butler and Day, 1998; Nosanchuk and Casadevall, 2003). Bitkilerde, mantarlarda ve pek çok omurgasızda yara iyileşmesi ve birincil immün cevabın oluşmasında önemli işlevleri vardır (Cerenius and Söderhäll, 2004). Memelilerde ise retina ve deride melanositler halinde bulunurlar (García-Borrón and Solano, 2002).

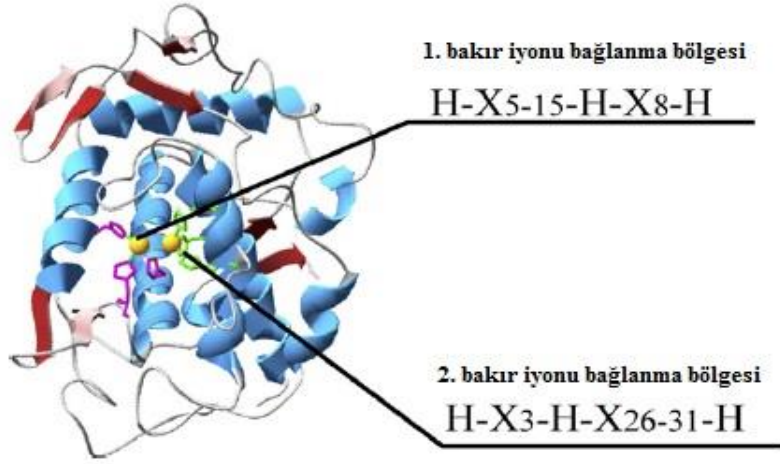
Tirozinazlar iki farklı enzimatik reaksiyonu katalizlemek için moleküler oksijeni kullanırlar (Decker et al., 2000): monofenollerin o-difenollere orto-hidroksilasyonu (monofenolaz aktivitesi) ve o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonu (difenolaz aktivitesi) (Şekil 1.8). Çakışan substrat spesiflikleri nedeniyle; enzimin

difenolaz aktivitesi gösteriyor olması monofenolaz aktivitesi de göstereceği anlamına gelmemelidir.



Şekil 1.8. Tirozinaz enziminin katalitik aktivitesi (Claus and Decker, 2006).

Bakır, tirozinaz enziminin katalitik aktivitesi için gereklidir. Bu enzimlerin kristal yapıları, enzimin aktif bölgesinde iki bakır iyonunun varlığını göstermektedir. Farklı organizmalardan izole edilen tüm tirozinaz enzimlerinde her bir bakır iyonunun, proteinin birincil yapısında bulunan üç histidin kalıntısıyla koordine olduğu görülmektedir (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Tirozinaz enzimin aktif bölgesinde bulunan bakır iyonlarının koordinasyonu (Faccio et al., 2012).

Mantar veya bakterilerden izole edilmiş tirozinaz enzimi kullanılarak fenolik bileşiklerin pikomolar seviyelerinde tayinine olanak sağlayan biyosensörler geliştirilmiştir (Abdullah et al., 2006; Streffer et al., 2001; Wang et al., 2002). Meyve suyu, çay, serum ve reçelerde fenolik bileşiklerin tayinine yönelik mantardan izole edilen tirozinaz temelli biyosensörler geliştirilmiştir (Girelli et al., 2009).

1.6.4. Glutaraldehit

Glutaraldehit özellikle enzimlerin kovalent immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılan homo bifonksiyonel bir bileşiktir. Homo bifonksiyonel maddeler, proteindeki lizin kalıntısının amino grupları gibi primer aminlerle seçici olarak etkileşime girerler. Suda, benzen ve alkol gibi susuz ortamlarda kararlı ve çözünebilir olması nedeniyle kullanımları çok yaygındır (Freitag et al., 1997).

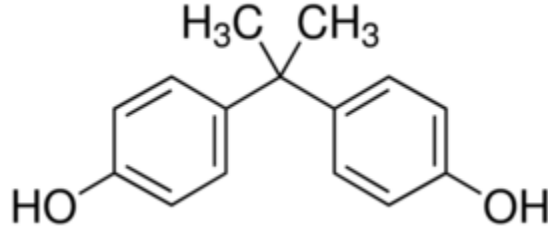
Glutaraldehit, içerdiği iki aktif aldehit grubu ile biyosensör geliştirilmesinde kullanılan enzim, mikroorganizma ve doku kesitleri gibi biyolojik bileşenlerin, kitosan, kolajen, jelatin ve karragenan gibi biyolojik matriks moleküllerinin polimerleri üzerindeki $-NH_2$ gibi gruplarla su çıkararak birleşir ve iki polimer zincirini birbirine çapraz bağlar. Bu esasa dayalı immobilizasyon yöntemi oldukça sık kullanılmaktadır (Sezgintürk and Dinçkaya, 2005). Yöntem kolay uygulanabilir olup genellikle sistemin termal, işlem ve depo kararlılıklarını da arttırmaktadır.

1.7. Bisfenol A

Yaygın adı bisfenol A (BPA) olan 2,2-(4,4-dihidroksidifenil) propan, 2 mol fenol ve 1 mol asetonun bir araya gelmesiyle oluşur (Şekil 1.10). Polikarbonat plastiklerin, epoksi reçinelerin ve alev almayı önleyici malzemelerin üretiminde sıkça kullanılır (Bruchet and Janex-Habibi, 2004). Aynı zamanda pestisitlerin ve antioksidanların içeriğinde de bulunabilir (Staples et al., 1998)

BPA, memeli hücrelerinde östrojen reseptörlerine bağlanarak kromozomal bozukluklara neden olmaktadır (Matthews et al., 2000). Bilinen bir başka etkisi de erkeklerde sperm hücrelerinin sayısında azalmaya sebep olmasıdır (Yachiguchi et al., 2014). Tüm bu etkileri göz önüne alındığında BPA'nın hızlı ve seçimli yollarla analiz edilmesi hem çevre kirliliğinin önlenmesinde hem de insan sağlığının korunmasında önemli bir etkisi olacaktır.

BPA tayinine yönelik olarak enzim immobilizasyonu ile gerçekleştirilen birçok biyosensör sistemi bulunmaktadır. Bu biyosensörler, karbon nanotüp, karbon pasta gibi çeşitli kompozit elektrot sistemlerinden oluşturulan biyosensör sistemleridir. Elde edilen sonuçlar dahilinde sistem çapraz bağlayıcı ajan kullanımıyla kovalent modifikasyonu da kapsayacaktır.



Şekil 1.10. Bisfenol A'nın kimyasal yapısı.

2. MATERYAL METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Cihaz ve diğer ekipmanlar

Denemelerde PalmSens Ins. (Hollanda) marka potansiyostat; CHI 104 model Altın (Au) çalışma elektrodu, CHI 111 model Ag/AgCl doygun referans elektrodu, BASI MW-1032 model platin yardımcı elektrodu; Eppendorf P100 ve P1000 otomatik pipetleri, Lauda (Germany) marka termostat, IKA marka manyetik karıştırıcı, Elma E 120 H Sonikatör kullanıldı.

2.1.2. Kimyasallar

1,5-pentanditiyol, altın nanoparitikül, sisteamin, glutaraldehit, bisfenol A, mantar tirozinazı (E.C 1.14.18.1), potasyum fosfat monobazik, potasyum klorür, potasyum ferrisiyanid, hidroklorik asit, sodyum hidroksit ve sülfirik asit Sigma Chemical (USA)'dan , gama alümina (0,1; 0,05 μm) CH Instruments Inc.'dan temin edilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Biyosensörün hazırlanması

2.2.1.1. Altın elektrotun temizlik prosedürü

•0,1 ve 0,05 mikronluk gama alümina bulamacı kadife bir yüzeye az miktarda damlatılır.

•Au elektrot ilk olarak 0,1 daha sonra ise 0,05 mikronluk gama alümina bulamacında hafifçe bastırılarak yaklaşık 200 kez sekiz rakamı şeklinde hareket ettirilerek kadife yüzey üzerinde gezdirilir. İşlemin ardından Au elektrot bidistile su ile yıkanır.

•Adsorblanmış partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla Au elektrot % 99'lük etanole daldırılır ve 10 dakika boyunca sonik banyoda bekletilir. Aynı işlem bidistile su ile tekrarlandıktan sonra Au elektrot bidistile su ile yıkanır.

•Elektrot yüzeyinin elektrokimyasal temizliği için 0,5 M H_2SO_4 çözeltisi içerisinde -0,3 V – 1,5 V potansiyelleri arasında, 100 mV/s tarama hızında 30 adet

CV ölçümü alınır. Bu işlemin ardından elektrot bidistile su ile yıkanır ve azot gazı altında kurutulduktan sonra +4 °C’de saklanır.

Biyoaktif tabakanın oluşturulması

• Au elektrot, % 99’luk etanolde hazırlanan 25 mM’lık 1,5-pentanditiyol çözeltisine daldırılır ve 12 saat boyunca çözelti içinde bekletilir. İnkübasyon süresinin sonunda elektrot çözültiden çıkarılır ve bağlanmayan tiyolik bileşiklerin uzaklaştırılması amacıyla % 99’luk etanol çözeltisine birkaç kez daldırılıp azot gazı altında kurutulur.

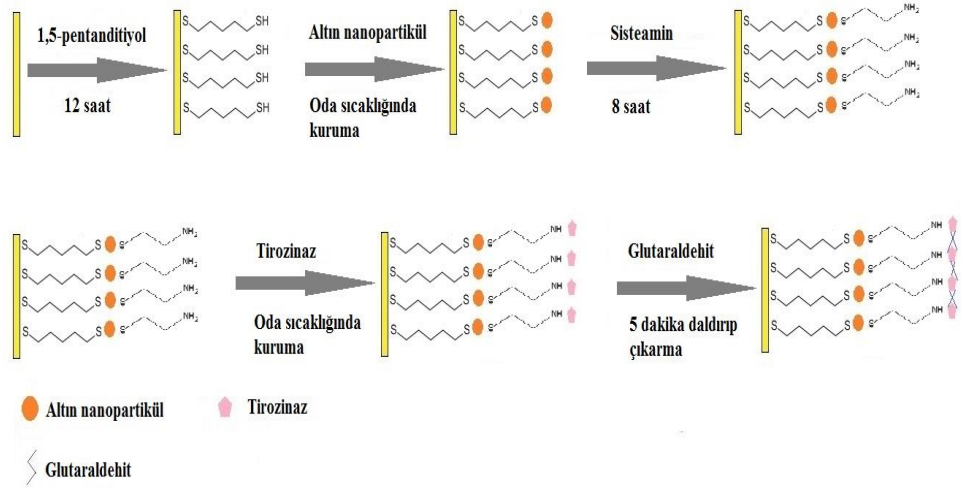
• 1,5-pentanditiyol modifiye altın elektroda 10 nm boyutunda AuNP çözeltisinden 20 µL damlatılarak oda sıcaklığında kuruyana kadar beklenir.

• 1,5-pentanditiyol/AuNP modifiye altın elektrot; 100 mM, pH: 7,0 potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 25 mM’lık sisteamin (Cys) çözeltisine daldırılır ve 8 saat boyunca içinde bekletilir. İnkübasyon süresinin sonunda elektrot çözültiden çıkarılır ve bağlanmayan sisteamin moleküllerinin uzaklaştırılması amacıyla tampon çözeltisi ile yıkanıp azot gazı altında kurutulur.

• 100 mM, pH: 7,0 potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 0,6 mg/ml’lik tirozinaz çözeltisininin 15 µL’si, 1,5-pentanditiyol/AuNP/Cys modifiye altın elektrotun üzerine damlatılır ve oda sıcaklığında kuruyana kadar beklenir.

• Tirozinaz enzimini biyoaktif tabakaya çapraz bağlamak amacıyla modifiye elektrot; 100 mM, pH: 7,0 potasyum fosfat tamponundan hazırlanan % 2,5’luk glutaraldehit çözeltisine 5 dakika boyunca yavaşça daldırılıp çıkarılır. Bağlanma yapmayan moleküllerin uzaklaştırılması amacıyla tampon çözeltisi ile yıkanıp azot gazı altında kurutulur.

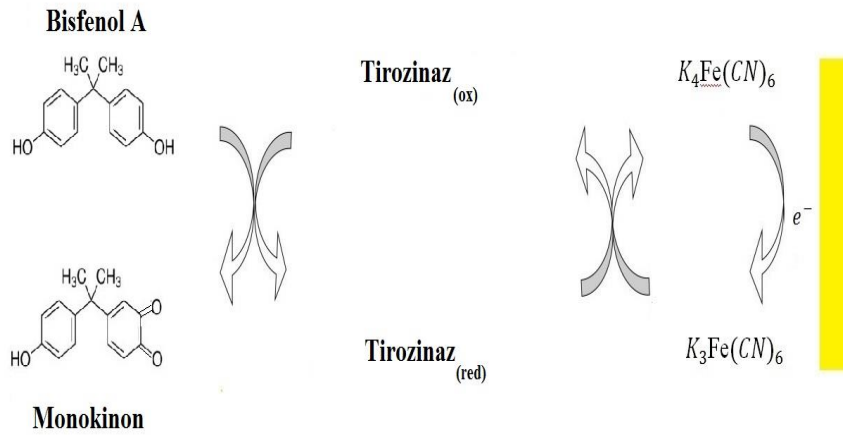
• Hazırlanan 1,5-pentanditiyol/AuNP/Cys/Tyr/GA modifiye altın elektrot; yüzeyi 100 mM, pH: 7,0 potasyum fosfat tamponuna temas edecek şekilde +4 °C’de saklanır. Hazırlanan enzim biyosensörünün immobilizasyon aşamalarına ilişkin şema Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Enzim biyosensörünün immobilizasyon aşamaları.

2.2.2. Biyosensörün çalışma prensibi

Hazırlanan enzim biyosensörünün çalışma prensibi; 0,0 V & +0,4 V potansiyel aralığında alınan ölçümlerde BPA'nın, tirozinaz enzimi tarafından BPA'nın monokinon türevine dönüşmesi esasına dayanır. Katalizlenen bu reaksiyon sonucu açığa çıkan elektronlar, ortamda bulunan $K_3[Fe(CN)_6]$ 'den kaynaklanan Fe^{3+} iyonları tarafından altın elektrot yüzeyine aktarılır. Bu şekilde tirozinaz enziminin aktif merkezindeki bakırın (Cu^{2+}) rejenerasyonu sağlanmaktadır. Bu esnada ise Fe^{3+} iyonlarına ait DPV piklerinin azalması izlenerek BPA konsantrasyonunun ölçülmesi hedeflenmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Enzim biyosensörünün ölçüm prensibi.

2.3. 1,5-pentanditiyol/AuNP/sisteamin/tirozinaz/GA Enzim Biyosensörünün CV Karakterizasyonu

Tasarlanan modifiye enzim biyosensörünün kinetik davranışının incelenmesi amacıyla; immobilizasyondan önce ve her immobilizasyon aşamasının ardından 100 mM, pH: 7,0 potasyum fosfat tamponundan hazırlanan 1mM $K_3[Fe(CN)_6]$ çözelti ortamında, -0,4 V & +0,4 V potansiyel aralığında CV yöntemi ile ölçümler alınmıştır. Bu şekilde, her aşamada elektrot yüzeyine immobilize edilen biyoaktif tabaka bileşenlerinin elektrotun davranışını ne ölçüde değiştirdiği belirlenmiştir.

2.4. 1,5-pentanditiyol/AuNP/sisteamin/tirozinaz/GA Biyosensörünün Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyon Çalışmaları

2.4.1. Enzim aktivitesinin biyosensör cevabına etkisi

Enzim aktivitesinin modifiye biyosensörün cevabına etkisini incelemek amacıyla; farklı aktivitelere sahip 3 enzim preparatından alınan enzim çözeltileri kullanılarak ölçümler alınmıştır. Bu amaçla; 39, 117 ve 234 U/ml aktiviteye sahip enzim çözeltileri kullanılmıştır. Çalışmalar pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ortamında ve 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. SAM oluşum süresi 12 saat, elektrot yüzeyine damlatılan AuNP miktarı 10 µL, sisteamin çözeltisinde bekletme süresi 8 saat ve glutaraldehit miktarı % 2,5 olarak sabit tutulmuştur. Denemeler 0,0 V & +0,4 V potansiyel aralığında DPV metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneyler sonucu elde edilen sonuçlara göre en uygun enzim aktivitesine karar verilmiştir.

2.4.2. SAM oluşum süresinin biyosensör cevabına etkisi

Altın elektrot yüzeyinde SAM oluşturmak amacıyla, % 99'luk etanolde hazırlanan 25 mM'lık 1,5-pentanditiyol çözeltisi kullanılmıştır. Yalın Au elektrot, 1,5-pentanditiyol çözeltisine daldırılarak yüzeyinde SAM oluşumu sağlanmaktadır. SAM oluşum süresinin biyosensör cevabına etkisini incelemek amacıyla, Au elektrot 12, 16 ve 20 saat boyunca 25 mM, 1,5-pentanditiyol çözeltisinde bekletilmiştir. Çalışmalar pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ortamında ve 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesi 117 U/ml, elektrot yüzeyine damlatılan AuNP miktarı 10 µL, sisteamin çözeltisinde bekletme süresi 8 saat ve glutaraldehit

miktarı % 2,5 olarak sabit tutulmuştur. Denemeler 0,0 V & +0,4 V potansiyel aralığında DPV metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en uygun bekleme süresine karar verilmiştir.

2.4.3. AuNP miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

1,5-pentanditiyol modifiye Au elektrot yüzeyine immobilize edilen AuNP miktarının biyosensör cevabına etkisini incelemek amacıyla, elektrot yüzeyine sırasıyla 10, 20 ve 30 µL AuNP damlatılmıştır. Çalışmalar pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ortamında ve 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesi 117 U/ml, SAM oluşum süresi 16 saat, sisteamin çözeltisinde bekleme süresi 8 saat ve glutaraldehit miktarı % 2,5 olarak sabit tutulmuştur. Denemeler 0,0 V & +0,4 V potansiyel aralığında DPV metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en uygun AuNP miktarı belirlenmiştir.

2.4.4. Sisteamin çözeltisinde bekleme süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi

1,5-pentanditiyol/AuNP modifiye altın elektrot, pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponundan hazırlanan 25 mM sisteamin çözeltisine daldırılarak, enzimin biyoaktif tabakaya immobilizasyonuna olanak veren -NH gruplarının oluşumu sağlanır. Sisteamin çözeltisinde bekleme süresinin biyosensör cevabına etkisini incelemek amacıyla, Au elektrot 2, 4 ve 8 saat boyunca sisteamin çözeltisinde bekletilmiştir. Çalışmalar pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ortamında ve 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesi 117 U/ml, elektrot yüzeyine damlatılan AuNP miktarı 20 µL ve glutaraldehit miktarı % 2,5 olarak sabit tutulmuştur. Denemeler 0,0 V & +0,4 V potansiyel aralığında DPV metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre de en uygun bekleme süresi bulunmuştur.

2.4.5. Glutaraldehit miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Biyoaktif tabakaya immobilize edilen tirozinaz enziminin, yapıya daha sağlam bağlanması amacıyla çapraz bağlayıcı ajan olarak glutaraldehit kullanılmıştır. Kullanılan glutaraldehit miktarının biyosensör cevabına etkisini incelemek amacıyla, pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponundan hazırlanan % 1,0; % 2,5 ve % 5,0'lik glutaraldehit kullanılmıştır. Çalışmalar pH: 7,0; 100 mM

potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ortamında ve 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesi 117 U/mg, elektrot yüzeyine damlatılan AuNP miktarı 20 μ L ve sisteamin çözeltisinde bekletme süresi 8 saat olarak sabit tutulmuştur. Denemeler 0,0 V & +0,4 V potansiyel aralığında DPV metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en uygun glutaraldehit miktarı seçilip, bundan sonraki immobilizasyon aşamalarında belirlenen glutaraldehit miktarı kullanılmıştır.

2.5. Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

2.5.1. Sıcaklığın biyosensör cevabı üzerine etkisi

Tasarlanan enzim biyosensörünün çalışma koşullarının optimizasyonunda ilk olarak sıcaklık incelenmiştir. Enzimler belirli sıcaklıklarda optimum aktivitelerini gösterdiklerinden, çalışma ortamının sıcaklığının optimize edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, 20, 25, 30, 35, 40 ve 45°C sıcaklıkta 100 μ M BPA için ölçümler alınmıştır. Çalışmalar pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ortamında ve 0,0 V & +0,4 V potansiyel aralığında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre de tasarlanan enzim biyosensörü için en uygun çalışma sıcaklığı belirlenmiştir.

2.5.2. pH'ın biyosensör cevabı üzerine etkisi

Enzim biyosensörünün çalışma koşulları optimize edilirken çalışma pH'ı incelenmiştir. Biyomateryal olarak enzim kullanıldığından, ortam pH'ının optimize edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla farklı türler ile hazırlanan farklı pH'lardaki tampon çözeltileri kullanılarak 100 μ M BPA için ölçümler alınmıştır. pH: 5,0; 5,5 ve 6,0 tampon çözeltileri sodyum sitrat ile, pH: 6,5; 7,0; 7,5 tampon çözeltileri potasyum fosfat ile, pH: 8,0; 8,5 ve 9,0 tampon çözeltileri glisin ile hazırlanmıştır. Hazırlanan bu tampon çözeltileri daha sonra, ölçümleri gerçekleştirmek üzere 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ çözeltisini hazırlamak için kullanılmıştır. Denemeler 0,0 V & +0,4 V potansiyel aralığında DPV metodu kullanılarak 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Bulunan değerlere göre en uygun çalışma pH'ı belirlenmiştir.

2.5.3. İyon şiddetinin biyosensör cevabı üzerine etkisi

Tirozinaz enziminin aktif merkezinde bakır (Cu^{2+}) bulunduğundan, ortamın iyon şiddeti enzimin aktivitesini etkilemektedir. Bu yüzden ölçümlerde kullanılan

tampon çözeltisinin derişiminin optimize edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla 50, 100 ve 200 mM'lık pH: 7,0 potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ortamında 100 μ M BPA için ölçümler alınmıştır. Denemeler 0,0 V & +0,4 V potansiyel aralığında DPV metodu kullanılarak 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre de enzim biyosensörü için optimum tampon konsantrasyonu belirlenmiştir.

2.6. 1,5-pentanditiyol/AuNP/sisteamin/tirozinaz/GA Biyosensörünün Karakterizasyon Çalışmaları

2.6.1. Bisfenol A için doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Yapılan denemelerde 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 μ M BPA için 0,0 V & +0,4 V potansiyel aralığında DPV ile ölçümler alınmıştır. Çizilen kalibrasyon grafiğinin yardımıyla enzim biyosensörünün doğrusal tayin aralığı belirlenmiştir.

2.6.2. Enzim biyosensörünün tekrarlanabilirliğinin incelenmesi

1,5-pentanditiyol/AuNP/Cys/Tyr/GA modifiye enzim biyosensörü ile 0,0 V & +0,4 V potansiyel aralığında 100 μ M BPA için 10 ölçüm alınmıştır. Elde edilen verilerden yararlanılarak ortalama değer, standart sapma (S.S) ve varyasyon katsayısı (%V.K) hesaplanmıştır.

2.6.3. Enzim biyosensörünün tekrar üretilebilirliğinin incelenmesi

Enzim biyosensörünün tekrar üretilebilirliğini araştırmak amacıyla 4 farklı modifiye elektrot hazırlanıp; hazırlanan bu elektrotlarla 25, 100 ve 500 μ M BPA için üç ölçüm alınmıştır. Alınan ölçümler sonunda elde edilen sonuçlara göre ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı belirlenmiştir.

2.6.4. Enzim biyosensörünün substrat spesifikliğinin incelenmesi

BPA tayini için tasarlanan enzim biyosensörünün, substratına olan spesifikliğinin araştırılmasına ilişkin çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla konsantrasyonları 100 μ M olan fenol, m-kresol, p-kresol, o-kresol, glukoz ve hidrokinon için 0,0 V & +0,4 V potansiyel aralığında ölçümler alınmış ve 100 μ M

BPA için alınan cevapla karşılaştırma yapılarak modifiye enzim biyosensörünün substrat spesifikliğı belirlenmiştir.

2.6.5. Enzim biyosensörüne girişimci etkisinin incelenmesi

Enzim biyosensörüne girişimci etkisini incelemek amacıyla 100 µM fenol, m-kresol, p-kresol, o-kresol, glukoz ve hidrokinon 100 µM BPA ile birlikte kullanılmıştır. Enzim biyosensörünün BPA için verdiği cevap % 100 kabul edilerek, girişimci etkisi yaratan bileşiklere BPA ile birlikte verdiği cevaplar ilişkilendirilerek enzim biyosensörüne girişimci etkisi belirlenmiştir. Ölçümler 0,0 V & +0,4 V potansiyel aralığında alınmıştır.

2.6.6. Enzim biyosensörünün depo kararlılığı

Tasarlanan enzim biyosensörünün depo kararlılığını incelemek amacıyla; immobilizasyon adımlarının tamamlanması itibariyle 100 µM BPA için hafta hafta ölçüm alınarak biyosensör cevabının zamanla ne kadar azaldığı incelenmiştir. Ölçümler 0,0 V & +0,4 V potansiyel aralığında alınmıştır.

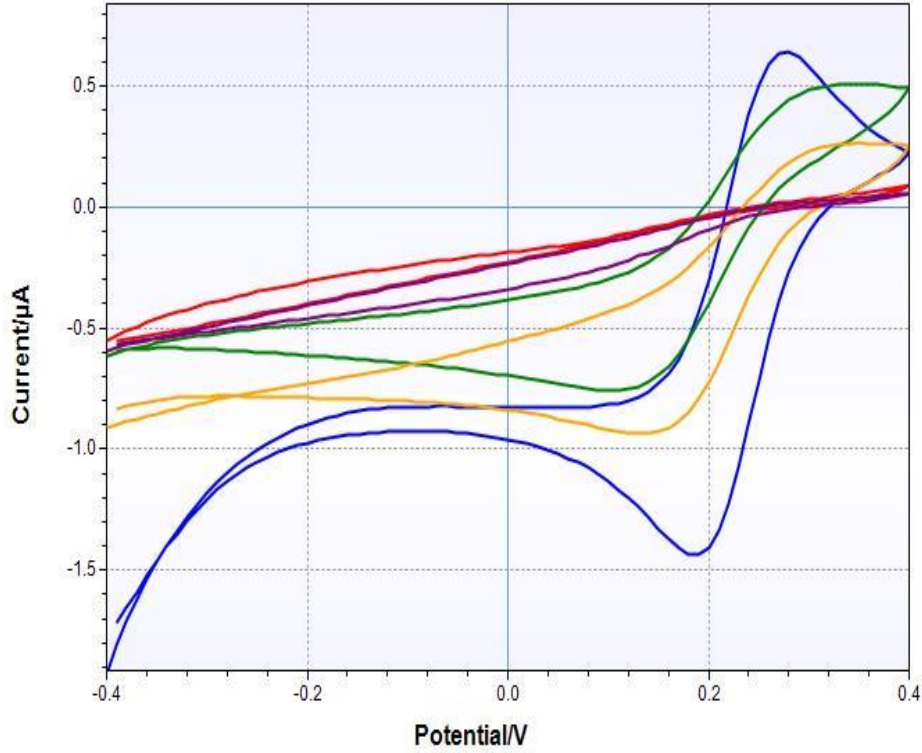
2.6.7. Enzim biyosensörü ile pet su şişelerinde BPA tayinine yönelik yapılan çalışmalar

Tasarlanan biyosensör ile 3 farklı su markasına ait pet şişede bekletilen su örnekleriyle BPA tayini yapılmıştır. Enzim biyosensörü ile elde edilen sonuçlar, referans HPLC yöntemiyle (Li et al., 2016) karşılaştırılmıştır.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1. 1,5-pentanditiyol/AuNP/sisteamin/tirozinaz/GA Enzim Biyosensörünün CV Karakterizasyonuna İlişkin Olarak Yapılan Çalışmalarda Elde Edilen Sonuçlar

Tasarlanan enzim biyosensörünün immobilizasyon aşamaları sırasında, CV karakterizasyonunu incelemek amacıyla; pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ortamında -0,4 V & +0,4 V potansiyelleri arasında döngüsel voltammogramlar alınmıştır. Sonuçlar Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; yalın altın elektrotun 0,26 V potansiyeldeki yükseltgenme pikinin Au elektrot yüzeyine 1,5-pentanditiyol modifiye edildiğinde neredeyse yok olduğu gözlemlenmektedir. AuNP ve sisteamin immobilizasyonu ile aynı potansiyeldeki pik tekrar gözlemlenmiştir. 0,26 V'daki pikin AuNP ve sisteamin immobilizasyonu ile tekrar gözlenmesi; yalın altın elektrot kadar olmasa da modifiye elektrotun iletkenliğinin yeteri seviyeye ulaştığını göstermektedir. Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan GA nedeniyle de, modifiye enzim biyosensörüne ait görünür pikler gözlemlenmemiştir.



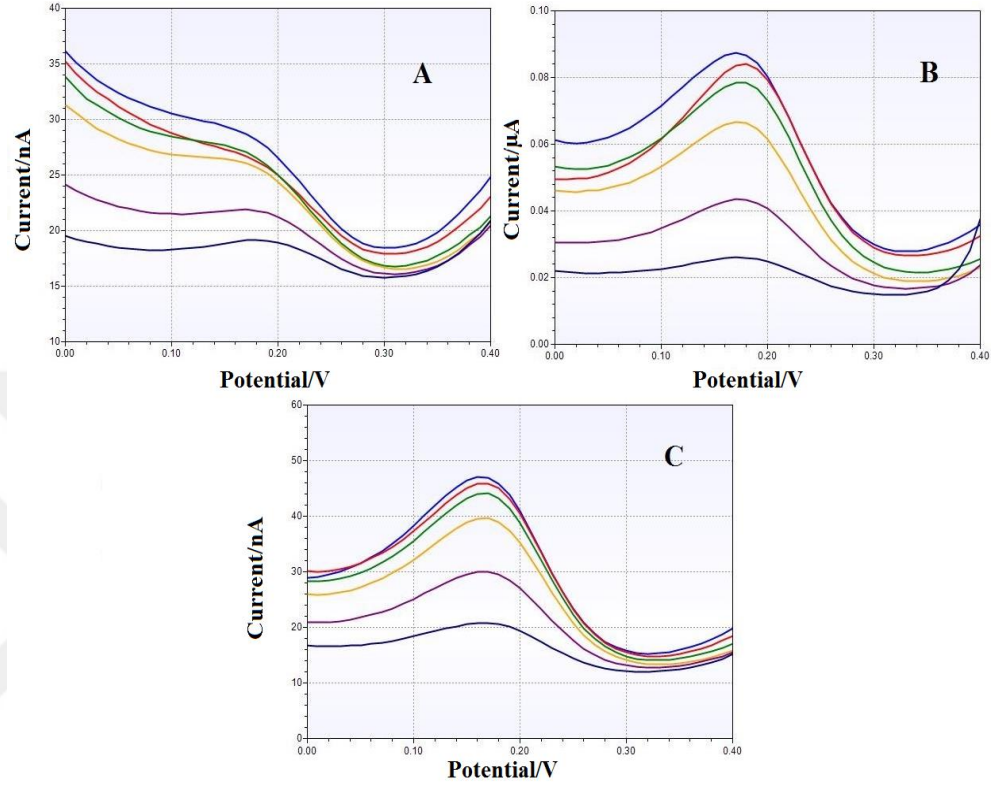
Şekil 3.1. Enzim biyosensörünün yüzey modifikasyonuna ilişkin CV voltammogramları. **Mavi:** Yalın Au elektrot, **Kırmızı:** 1,5-pentanditiyol modifiye Au elektrot, **Sarı:** 1,5-pentanditiyol/AuNP modifiye Au elektrot, **Yeşil:** 1,5-pentanditiyol/AuNP/sisteamin modifiye Au ve **Mor:** 1,5-pentanditiyol/AuNP/sisteamin/Tirozinaz/GA modifiye Au elektrot. Ölçümler pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ortamında -0,4 V & +0,4 V potansiyelleri arasında 25 °C sabit sıcaklıkta alınmıştır.

3.2. 1,5-pentanditiyol/AuNP/sisteamin/tirozinaz/GA Enzim Biyosensörünün Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyonuna Yönelik Yapılan Çalışmaların Sonuçları

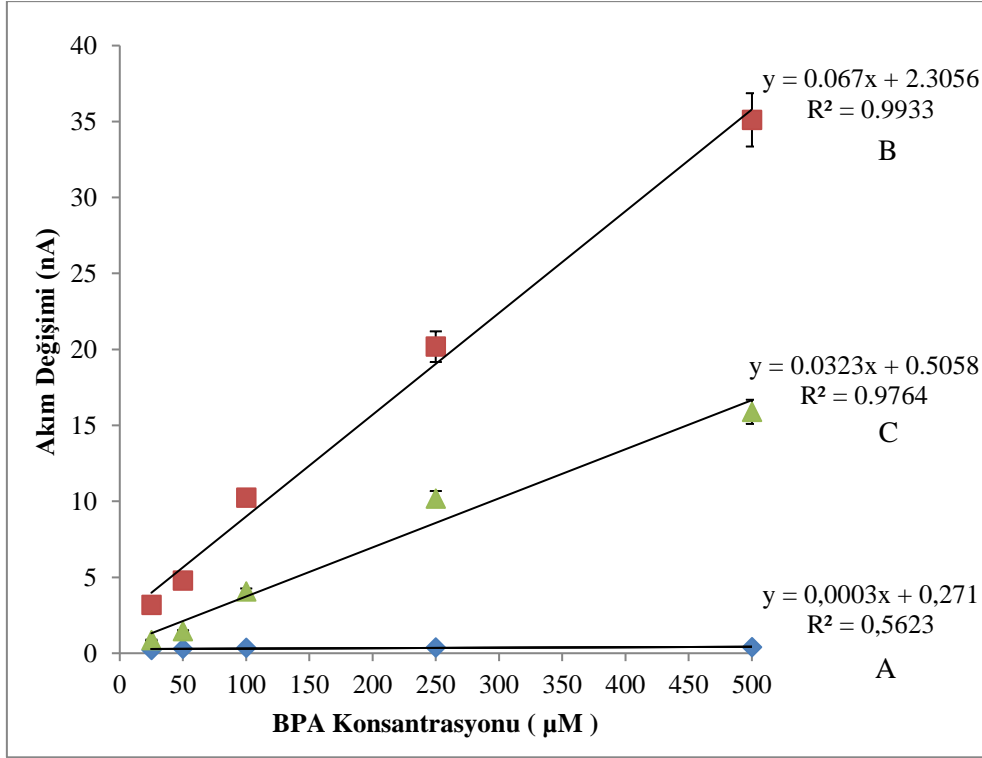
3.2.1. Enzim aktivitesinin biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgular

BPA'nın biyokimyasal reaksiyonunu katalizleyen tirozinaz enziminin hangi aktivitede kullanılacağı, biyosensör cevabını doğrudan etkileyen bir parametredir. Bu nedenle farklı aktivitede (39, 117 ve 234 U/ml) enzim örnekleri kullanılarak gerçekleştirilen ölçümlerin sonuçları Şekil 3.2a'da; bu sonuçlardan yola çıkılarak çizilen standart grafikler Şekil 3.2b'de gösterilmiştir. Yapılan denemelerden elde

edilen sonuçlara göre en uygun enzim aktivitesi 117 U/ml olarak belirlenmiştir. 39 U/ml aktiviteye sahip enzim ile hazırlanan biyosensör ile alınan ölçümlerden herhangi bir sonuç alınamazken; 234 U/ml aktiviteye sahip enzim alınan ölçümlerin doğrusallığının yeteri kadar iyi olmadığı görülmüştür.



Şekil 3.2a. Enzim aktivitesinin biyosensör cevabına etkisi. 39 U/ml aktiviteye sahip enzim içeren elektrot ile (A), 117 U/ml aktiviteye sahip enzim içeren elektrot ile (B) ve 234 U/ml aktiviteye sahip enzim içeren elektrot ile (C) yukarıdan aşağıya; baseline, 25, 50, 100, 250 ve 500 μ M BPA varlığında, pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ortamında, 0,0 V & +0,4 V potansiyelleri arasında alınan DP voltammogramları. Ölçümler 25 °C sabit sıcaklıkta alınmıştır.

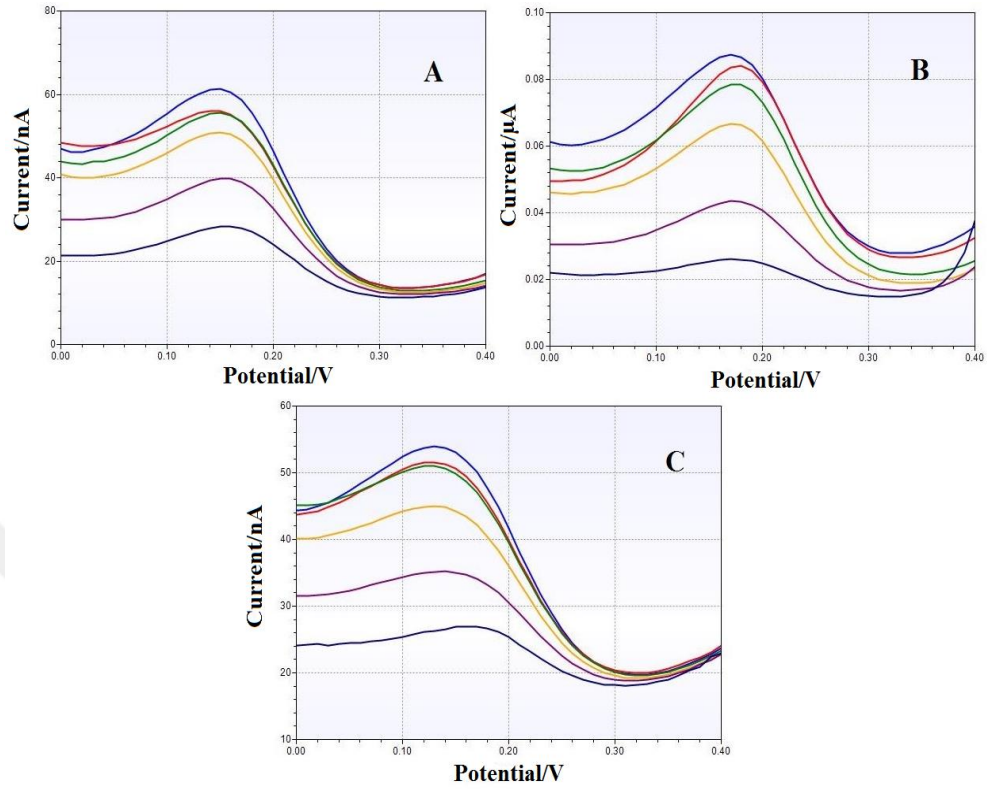


Şekil 3.2b. Optimum enzim aktivitesinin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalardan alınan sonuçlarla çizilen standart grafikler. 39 U/ml (A), 117 U/ml (B) ve 234 U/ml (C). Ölçümler pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ortamında ve 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

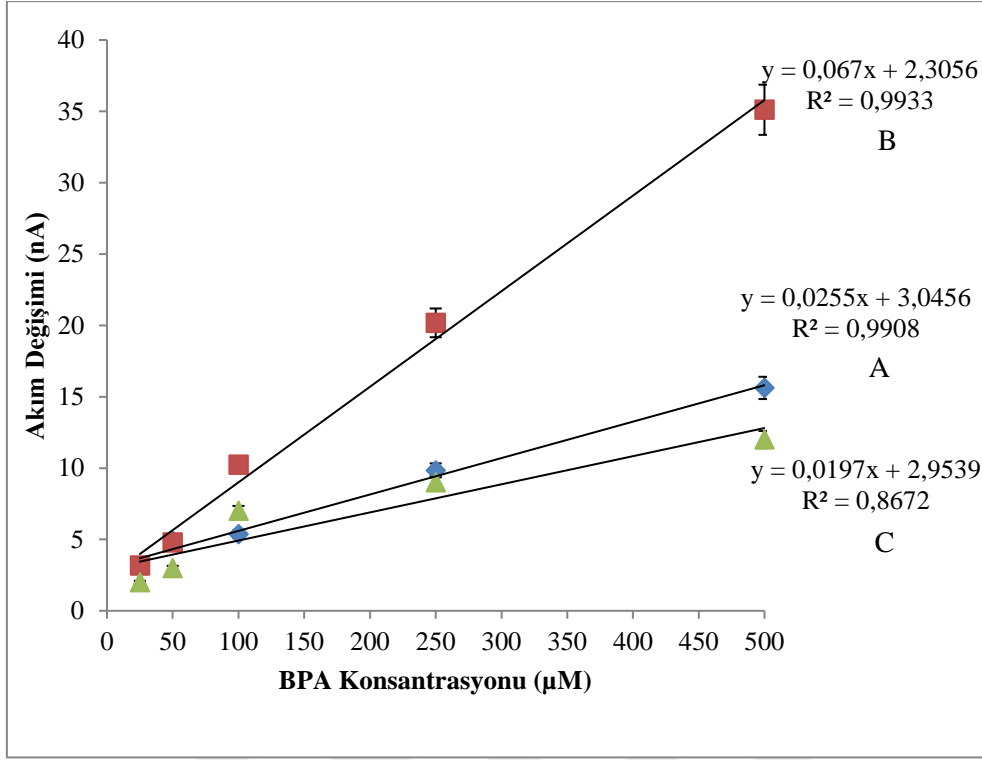
3.2.2. SAM oluşum süresinin biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgular

Au elektrot yüzeyinde oluşturulan SAM tabakasının oluşum süresi, yapının stabilitesini doğrudan etkileyen bir parametredir. 1,5-pentanditiyolün –SH grubu ile altın arasındaki kovalent bağın yeterli seviyede sağlam olması, geçen süreye ve 1,5-pentanditiyolün derişimine bağlıdır. Yapılan denemelerde 1,5-pentanditiyolün derişimi (25 mM) sabit tutularak, altın elektrotun 1,5-pentanditiyolde bekletilme süresi optimize edilmiştir. Bu amaçla 12, 16 ve 20 saatlik beklemeler sonucu oluşturulan modifiye elektrotlarla 0,0 V & +0,4 V arası DPV yöntemi ile ölçümler alınmış; elde edilen sonuçlar ile standart grafikler çizilmiştir. Elde edilen DP voltammogramları ve çizilen standart grafikler Şekil 3.3a ve Şekil 3.3b’de gösterilmiştir. Sonuçlardan da anlaşılacağı üzere en uygun SAM oluşum süresi 16 saat olarak belirlenmiştir. 20 saatlik bekleme sonucunda elektrot yüzeyinde bir difüzyon bariyeri oluşmuş olması muhtemeldir. 12 saatlik bekletme ile hazırlanan elektrotla alınan ölçümleri doğrusallığı yeterli olmakla beraber; 16 saatlik bekletme

ile hazırlanan elektrotun doğrusallığı daha iyi olduğundan optimum bekleme süresi 16 saat olarak belirlenmiştir.



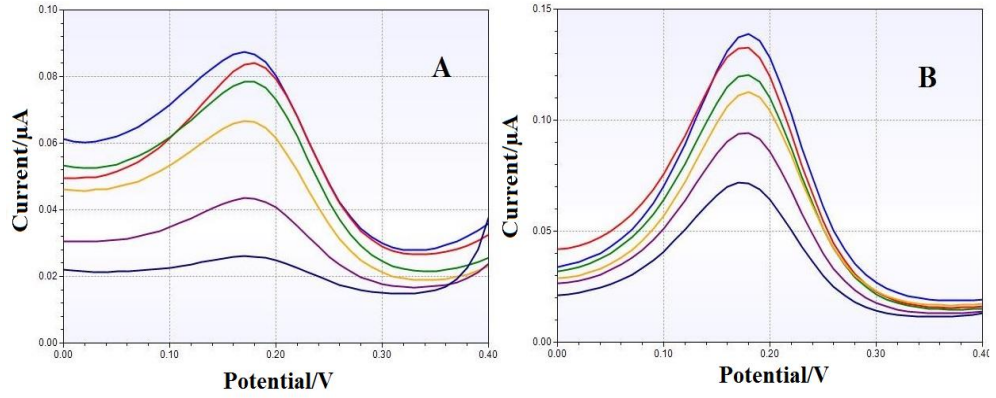
Şekil 3.3a. SAM oluşum süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi. 12 saat (A), 16 saat (B) ve 20 saat (C) bekletilen elektrot ile yukarıdan aşağıya; baseline, 25, 50, 100, 250 ve 500 μM BPA varlığında, pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ortamında 0,0 V & +0,4 V potansiyelleri arasında alınan DP voltammogramları. Ölçümler 25 °C sabit sıcaklıkta alınmıştır.



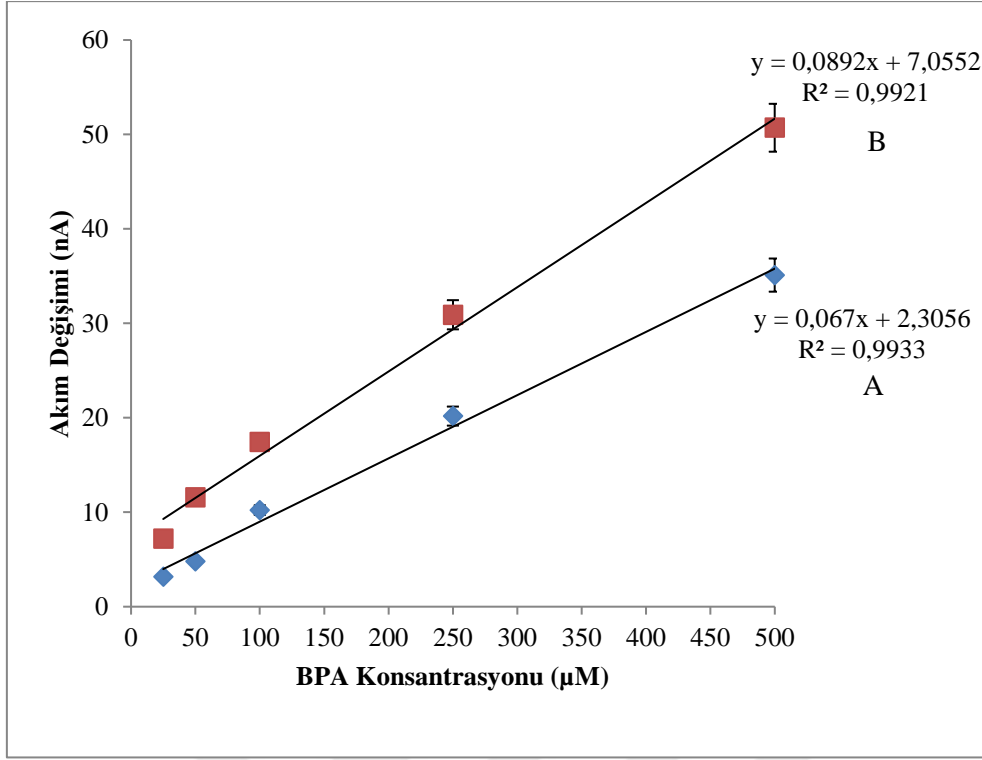
Şekil 3.3b. Optimum SAM oluşum süresinin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalardan alınan sonuçlarla çizilen standart grafikler. 12 saat (A), 16 saat (B) ve 20 saat (C). Ölçümler pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ortamında ve 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. AuNP miktarının biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgular

1,5-pentanditiyol modifiye Au elektrot üzerine damlatılan AuNP miktarı, hem iletkenliğin artırılması hem de sisteminin biyoaktif tabakaya daha kararlı bir şekilde katılması açısından önemlidir. Biyosensör tasarımında 10 nm boyutunda AuNP kullanılmıştır ve boyut sürekli sabit tutulmuştur. AuNP miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisini incelemek amacıyla, elektrot yüzeyine 10 ve 20 µl AuNP damlatılarak hazırlanan biyosensörlerle 0.0 V & +0.4 V arası DPV yöntemi ile ölçümler alınmış; elde edilen sonuçlar ile standart grafikler çizilmiştir. Elde edilen DP voltammogramları ve çizilen standart grafikler Şekil 3.4a ve Şekil 3.4b'de gösterilmiştir. Sonuçlara bakıldığında; 20 µL AuNP damlatılarak hazırlanan biyosensörle elde edilen sonuçların en doğrusal sonuçlar olduğu gözlemlenmektedir. Damlatılan AuNP miktarı arttıkça sonuçların daha doğrusal olduğu görülmekle birlikte, elektrot yüzeyine 20 µL'den fazla AuNP damlatılamadığından optimum AuNP miktarı 20 µL olarak belirlenmiştir.



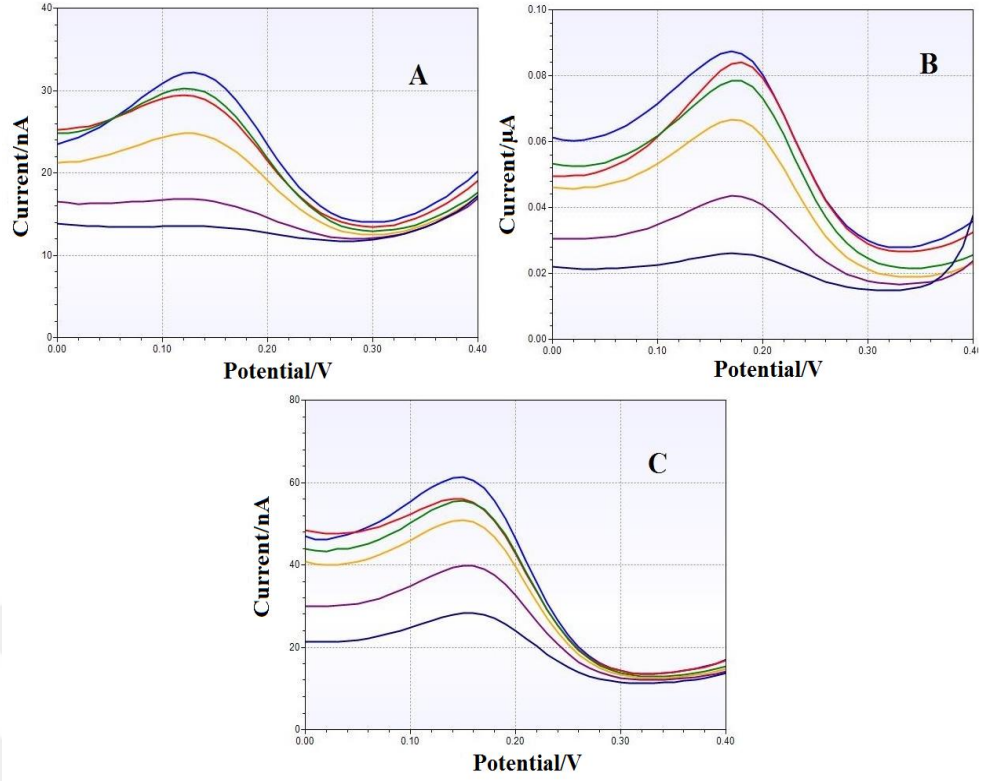
Şekil 3.4a. AuNP miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi. 10 μL (A) ve 20 μL (B) AuNP damlatılan elektrot ile yukarıdan aşağıya; baseline, 25, 50, 100, 250 ve 500 μM BPA varlığında, pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ortamında 0,0 V & +0,4 V potansiyelleri arasında alınan DP voltammogramları. Ölçümler 25 $^\circ\text{C}$ sabit sıcaklıkta alınmıştır.



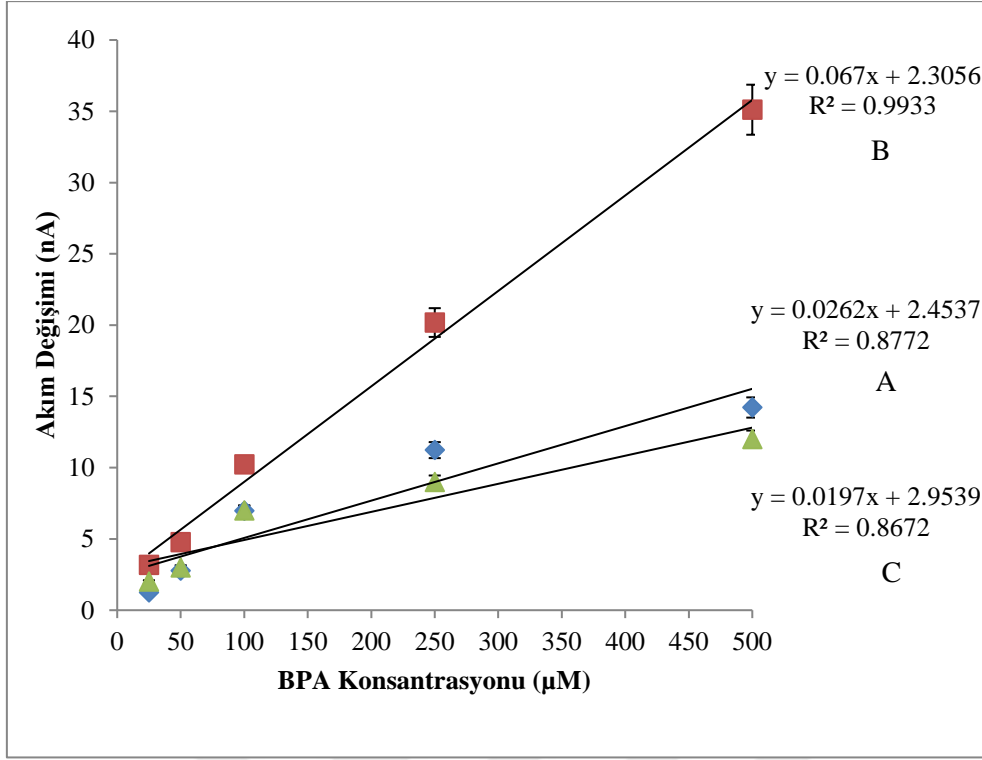
Şekil 3.4b. Optimum AuNP miktarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalardan alınan sonuçlarla çizilen standart grafikler. 10 µL (A) ve 20 µL (B). Ölçümler pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ortamında ve 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. Sisteaminde bekletme süresinin biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgular

Tirozinaz enziminin biyoaktif tabakaya immobilize edilebilmesi için, AuNP immobilizasyonundan sonra yapıya katılan sisteaminin; kovalent olarak bağlanması için gereken sürenin optimize edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla; sisteamin konsantrasyonu sabit tutularak (25 mM), 1,5-pentanditiyol/AuNP modifiye Au elektrot sırasıyla 4, 8 ve 12 saat boyunca pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan sisteamin çözeltisine daldırılır. Tasarlanan biyosensörlerle 0,0 V & +0,4 V arası DPV yöntemi ile ölçümler alınmış; elde edilen sonuçlar ile standart grafikler çizilmiştir. Elde edilen DP voltammogramları ve çizilen standart grafikler Şekil 3.5a ve Şekil 3.5b'de gösterilmiştir. Sonuçlara bakıldığında en uygun bekletme süresinin 8 saat olduğu görülmektedir.



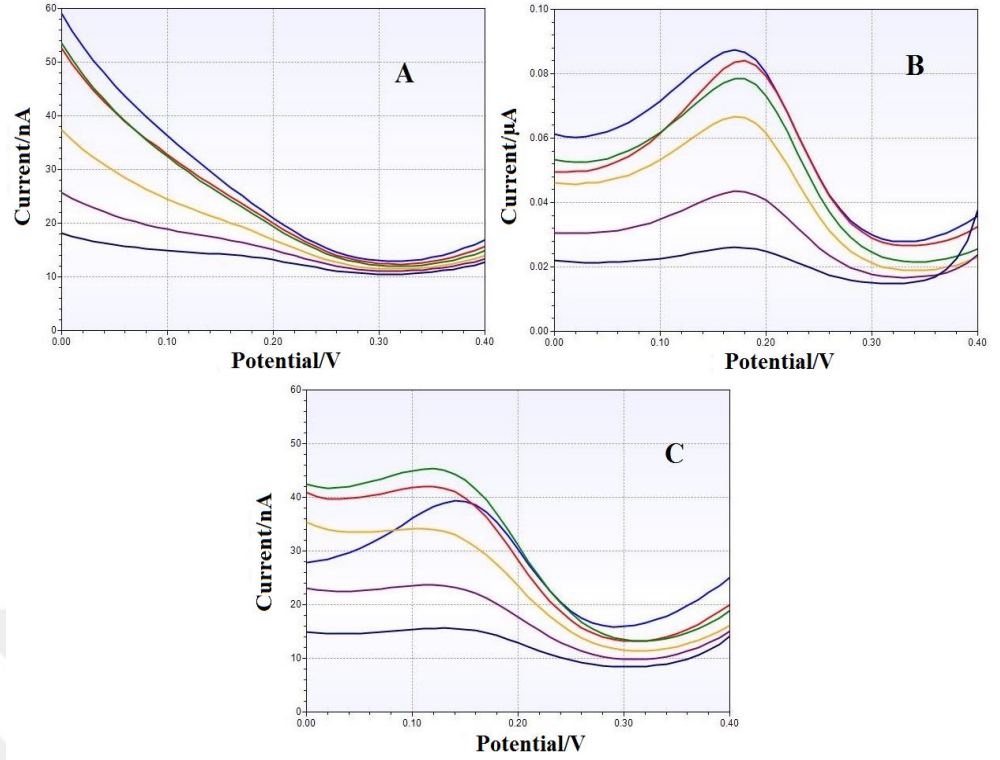
Şekil 3.5a. Sisteaminde bekleme süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi. 4 saat (A), 8 saat (B) ve 12 saat (C) bekletilen elektrot ile yukarıdan aşağıya; baseline, 25, 50, 100, 250 ve 500 μM BPA varlığında, pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ortamında 0,0 V & 0,4 V potansiyelleri arasında alınan DP voltammogramları. Ölçümler 25 °C sabit sıcaklıkta alınmıştır.



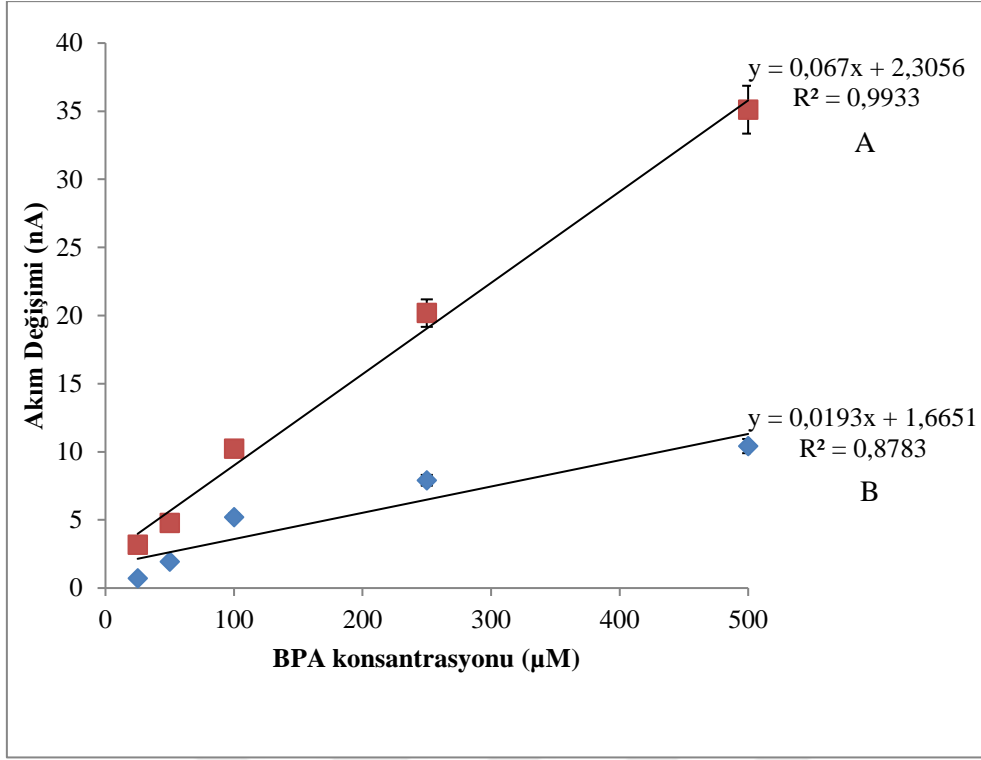
Şekil 3.5b. Optimum sistemde bekleme süresinin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarla alınan sonuçlarla çizilen standart grafikler. 4 saat (A), 8 saat (B) ve 12 saat (C). Ölçümler pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ortamında ve 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. Glutaraldehit miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Tirozinaz enziminin biyoaktif tabaka üzerine immobilize edildikten sonra çapraz bağlayıcı bir ajan ile hapsedilmesi gerekmektedir. Bu amaçla; tasarlanan biyosensörde glutaraldehit kullanılmıştır. Kullanılan glutaraldehit miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisini incelemek amacıyla pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponundan hazırlanan % 1, % 2,5 ve % 5'lik glutaraldehit çözeltileri ile 0,0 V & +0,4 V arası DPV yöntemi ile ölçümler alınmış; elde edilen sonuçlar ile standart grafikler çizilmiştir. Elde edilen DP voltammogramları ve çizilen standart grafikler Şekil 3.6a ve Şekil 3.6b'de gösterilmiştir. Çıkan sonuçlara bakıldığında en uygun glutaraldehit miktarının % 2,5 olduğu belirlenmiştir. % 1,0'lık glutaraldehit kullanıldığında ölçülebilir pikler gözlenmemiştir. Bunun nedeni yeterli miktarda glutaraldehit kullanılmadığından enzimin biyoaktif tabakaya sıkı bir şekilde bağlanmamış olmasıdır. Aynı şekilde glutaraldehit miktarı % 5,0 olarak kullanıldığında da difüzyon bariyeri oluştuğundan doğrusal ve tekrarlanabilir pikler gözlemlenmemiştir.



Şekil 3.6a. Glutaraldehit miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi. % 1,0 (A), % 2,5 (B) ve % 5,0 (C) glutaraldehit kullanılan elektrot ile yukarıdan aşağıya; baseline, 25, 50, 100, 250 ve 500 μM BPA varlığında, pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ortamında 0,0 V & +0,4 V potansiyelleri arasında alınan DP voltammogramları. Ölçümler 25 °C sabit sıcaklıkta alınmıştır.

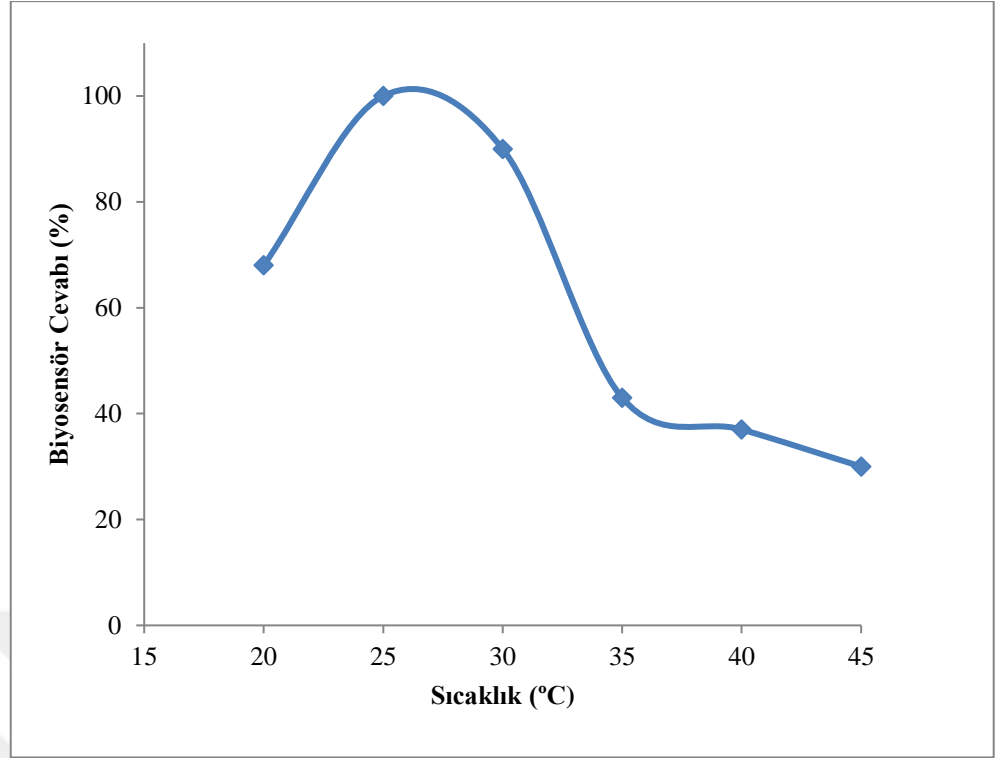


Şekil 3.6b. Optimum glutaraldehit miktarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalardan alınan sonuçlarla çizilen standart grafikler. % 2,5 (A) ve % 5,0 (B) Ölçümler pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ortamında ve 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

3.3. Çalışma Koşullarının Optimizasyonuna Yönelik Yapılan Denemelerin Sonuçları

3.3.1. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

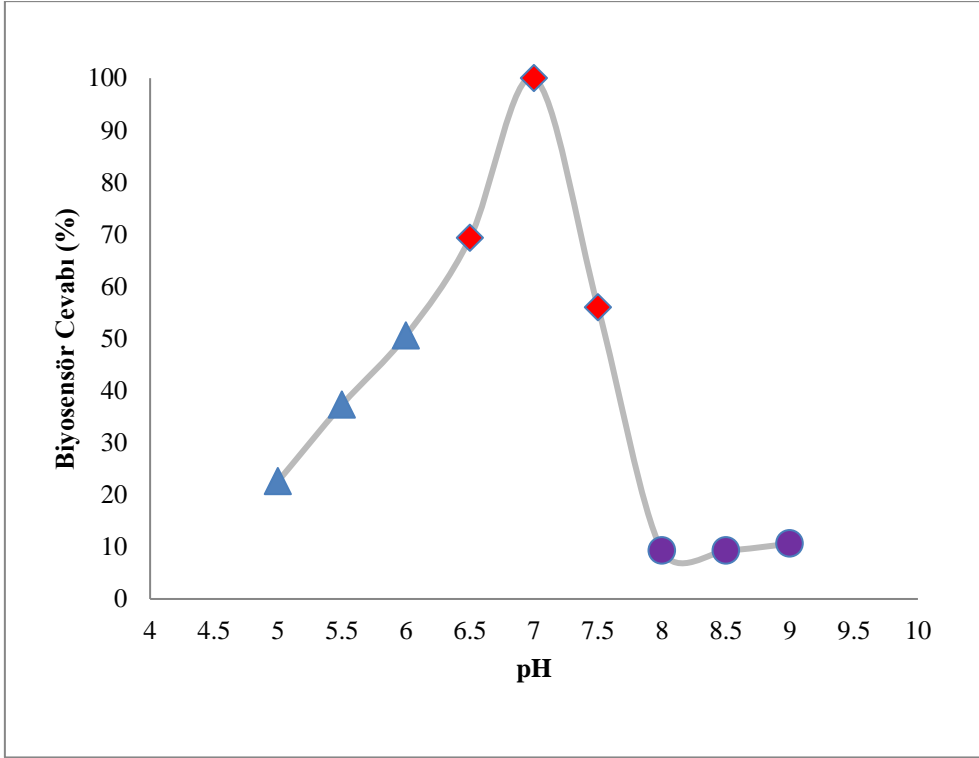
Biyosensör sistemlerinde optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi; hem biyoaktif tabakanın stabilitesinin sağlanmasında hem de biyokomponentin yüksek aktivite gösterebilmesi açısından önemlidir. Yapılan denemeler sonucunda tasarlanan enzim biyosensörünün optimum çalışma sıcaklığı 25 °C olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ile çizilen optimum sıcaklık grafiği Şekil 3.7'de gösterilmiştir. Tasarlanan biyosensörde kullanılan tirozinaz enziminin optimum çalışma sıcaklığı da 25 °C'ye yakın olduğundan, bulunan sıcaklık değeri anlamlı bir sonuç teşkil etmektedir.



Şekil 3.7. Enzim biyosensörünün optimum sıcaklık grafiği. Ölçümler pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ortamında 0,0 V & +0,4 V potansiyelleri arasında alınan DP yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. Optimum pH'ın belirlenmesi

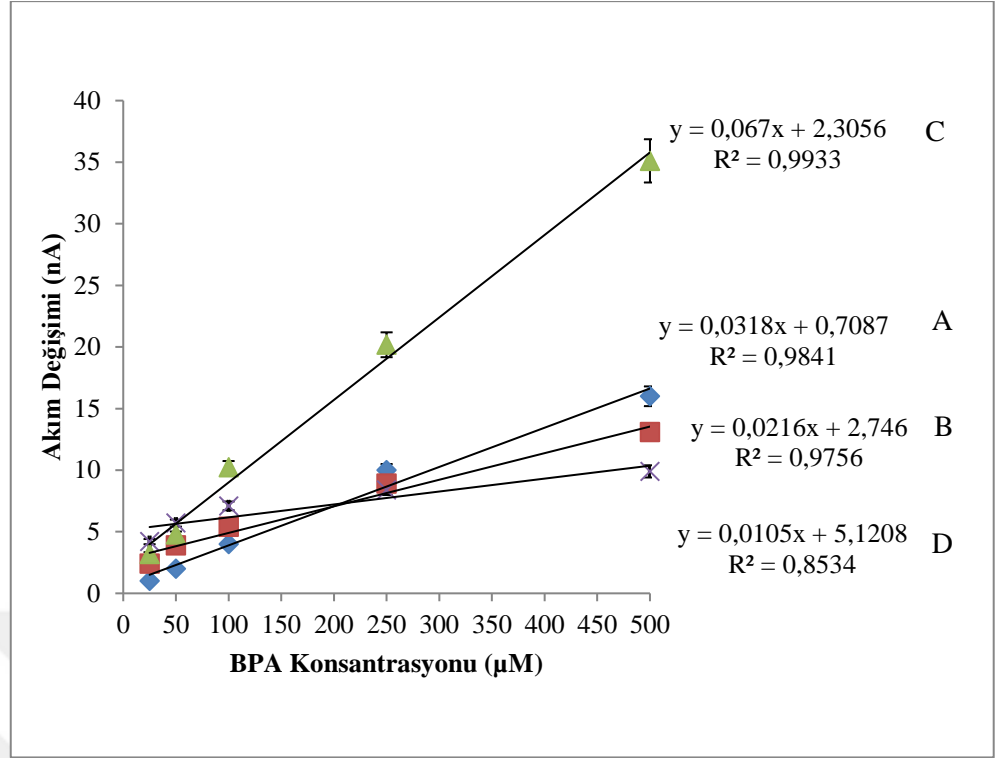
Yapılan denemeler sonucu tasarlanan enzim biyosensörünün optimum çalışma pH'ı 7,0 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlarla ile çizilen optimum pH grafiği Şekil 3.8'de gösterilmiştir. Bulunan bu değer, enzimin serbest haldeki optimum pH'ına yakın olduğundan; immobilizasyon aşamalarının enzimin optimum pH'ını değiştirmedeği söylenebilir. Aynı zamanda pH: 6,0 ve 7,5 aralığında, tasarlanan enzim biyosensörünün aktivitesinin % 50'sinden fazlasını koruduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 3.8. Enzim biyosensörünün optimum pH grafiği. Ölçümler; 100 mM pH: 5,0; 5,5 ve 6,0 sitrat (▲); 100 mM pH: 6,5; 7,0 ve 7,5 fosfat (■); 100 mM pH: 8,0, 8,5 ve 9,0 glisin (●) tamponlarında hazırlanan 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ortamında 0,0 V & +0,4 V potansiyelleri arasında alınan DP yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.3. Optimum iyon şiddetinin belirlenmesi

Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre; tasarlanan enzim biyosensörü için optimum tampon konsantrasyonunun 100 mM olduğu belirlenmiştir. Çalışma ortamını oluşturan fosfat tamponunun derişimi iyon şiddetini doğrudan etkileyeceğinden, tasarlanan enzim biyosensörü için en uygun tampon konsantrasyonu 100 mM olmalıdır. Şekil 3.9'da iyon şiddetinin biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesine yönelik olarak elde edilen sonuçlar verilmiştir.

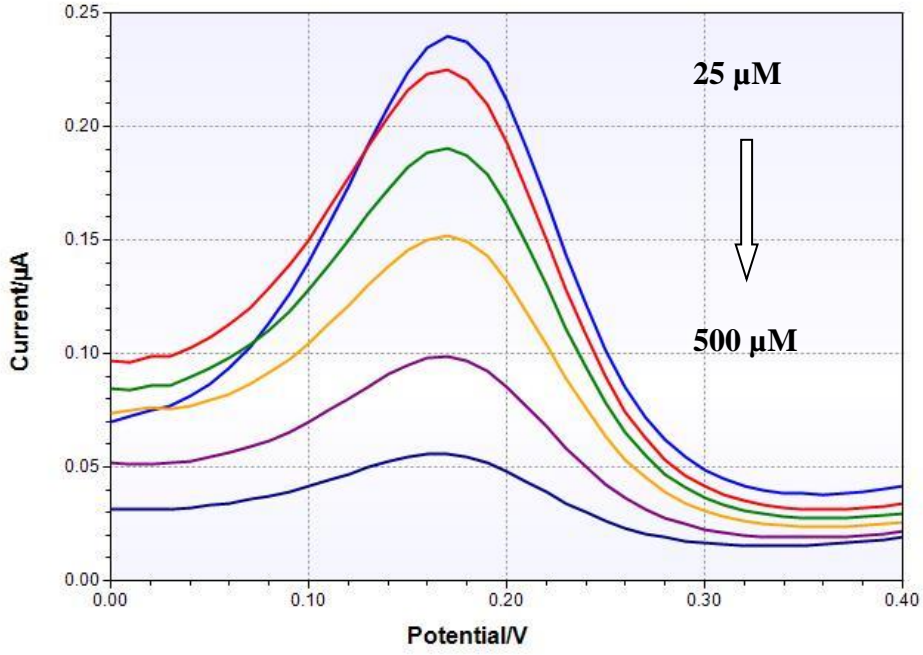


Şekil 3.9. Enzim biyosensörünün optimum iyon şiddeti grafiği. 25 mM (A), 50 mM (B), 100 mM (C) ve 200 mM (D) pH: 7,0 potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ortamında alınan ölçümler sonucu çizilen standart grafikler.

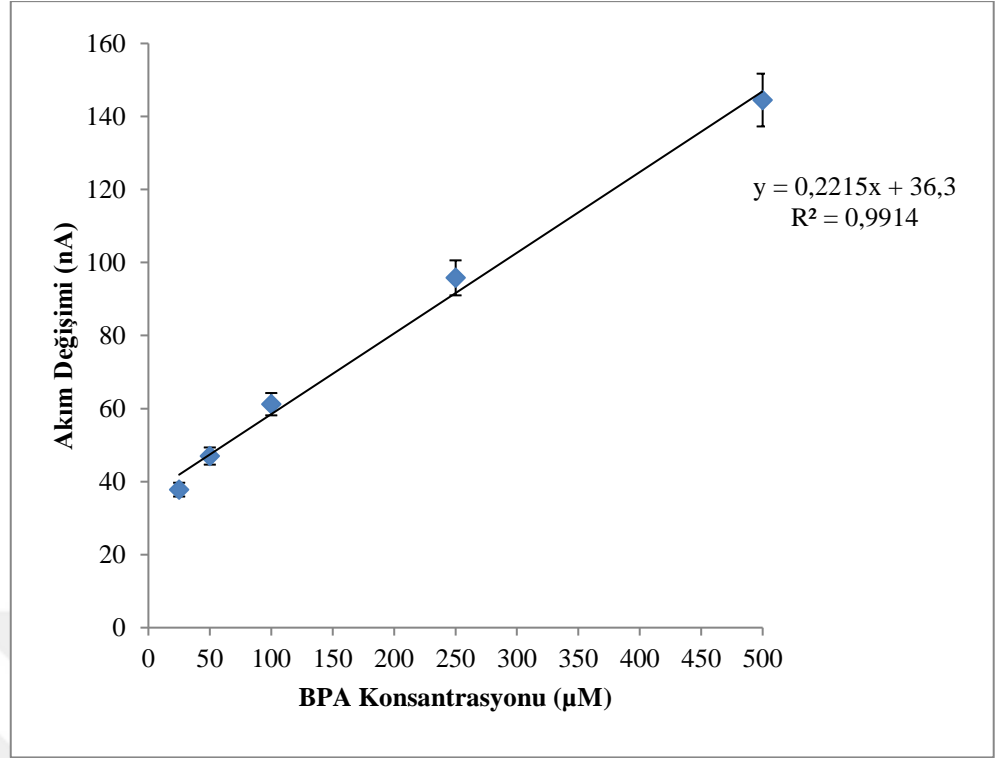
3.4. 1,5-pentanditiyol/AuNP/sisteamin/tirozinaz/GA Biyosensörünün Karakterizasyon Çalışmalarına Yönelik Elde Edilen Sonuçlar

3.4.1. Enzim biyosensörünün bisfenol A için doğrusal tayin aralığı

Tasarlanan 1,5-pentanditiyol/AuNP/Cys/Tyr/GA enzim biyosensörünün hazırlama ve çalışma koşullarının optimizasyonu tamamlandıktan sonra, kinetik karakterizasyonu belirlenmiştir. Bu amaçla ilk olarak enzim biyosensörünün bisfenol A için doğrusal tayin aralığı belirlenmiştir. pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ortamında 0,0 V & +0,4 V potansiyelleri arasında DP voltammogramları alınmıştır. Elde edilen sonuçlar ve bu sonuçlar göz önüne alınarak çizilen standart grafik Şekil 3.10a ve Şekil 3.10b'de gösterilmiştir. Enzim biyosensörü ile 1, 5 ve 10 µM BPA için de ölçümler alınmış; ancak ölçülebilir pikler elde edilmemiştir. Bu yüzden tasarlanan enzim biyosensörünün doğrusal tayin aralığı 25-500 µM; tayin alt sınırı da 5,6 µM olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.10a. Enzim biyosensörünün doğrusal tayin aralığının belirlenmesi amacıyla alınan ölçümlerin DP voltammogramları. Ölçümler yukarıdan aşağıya; baseline, 25, 50, 100, 250 ve 500 M BPA varlığında, pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ortamında 0,0 V & +0,4 V potansiyelleri arasında 25°C sabit sıcaklıkta alınmıştır.



Şekil 3.10b. Enzim biyosensörünün doğrusal tayin aralığı.

3.4.2. Enzim biyosensörünün tekrarlanabilirliği

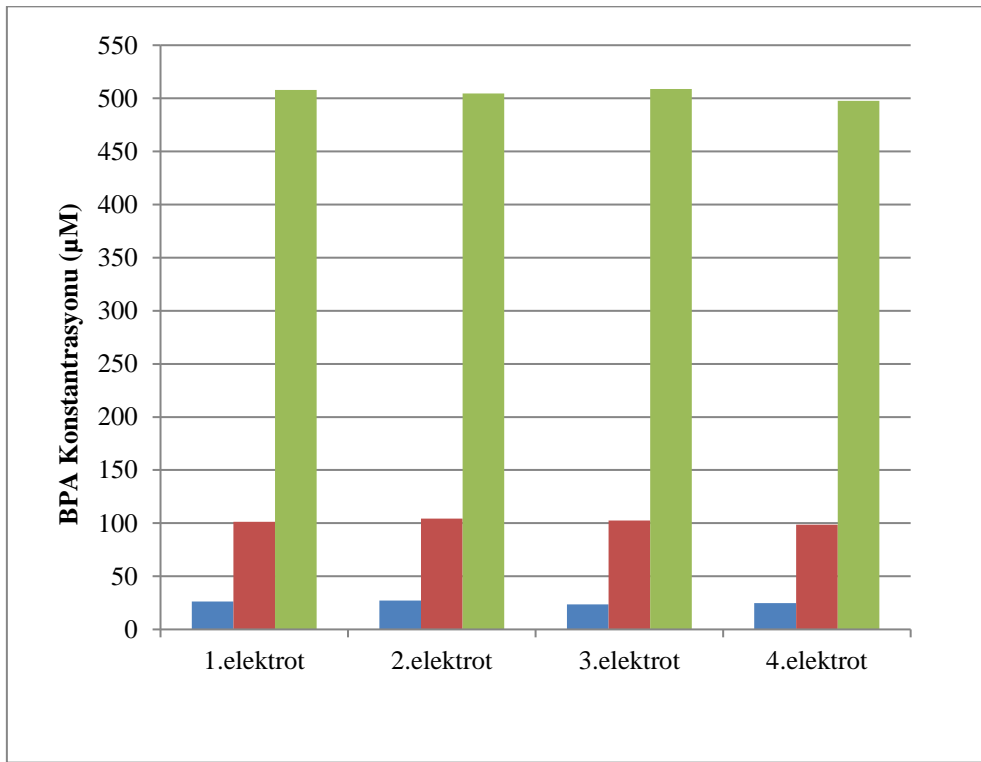
Enzim biyosensörünün tekrarlanabilirliğini incelemek amacıyla yapılan denemeler sonucu elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1’de gösterilmiştir. Tasarlanan enzim biyosensörü ile 100 µM BPA için alınan 10 ölçümün ortalaması 101,88 µM olarak bulunmuştur. Varyasyon katsayısı ise kabul edilebilir değer olan % 5’ ten düşük bulunmuştur. Bu da enzim biyosensörünün yüksek tekrarlanabilirlikte olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3.1. Bisfenol A için elde edilen 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)
Ölçülen BPA Konsantrasyonu (µM)	102,54	103,11	98,75	101,11	104,3	101,86	102,35	103,21	102,35	103,21	101,88 µM	± 1,69 µM	1,66

3.4.3. Enzim biyosensörünün tekrar üretilebilirliği

Enzim biyosensörünün tekrar üretilebilirliğini incelemek amacıyla alınan ölçümler sonucu elde edilen değerler Şekil 3.11 ve Çizelge 3.2’de gösterilmiştir. Çizelge 3.2’den de anlaşılacağı üzere, hazırlanan 4 elektrot ile çizilen standart grafiklerin R^2 değerleri birbirine oldukça yakındır. Her 3 konsantrasyon için bulunan ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı da kabul edilebilir düzeydedir. Buna göre; tasarlanan enzim biyosensöründe kullanılan immobilizasyon yönteminin oldukça kararlı bir yapı ortaya çıkarttığı görülmektedir.



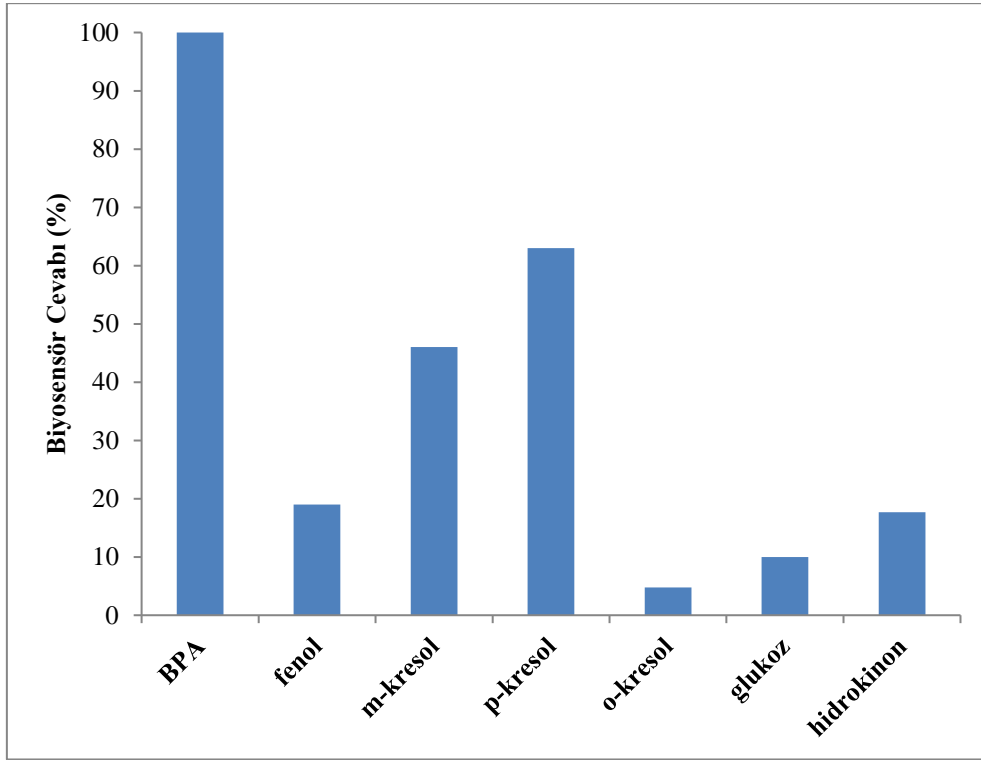
Şekil 3.11. 4 farklı elektrot ile 25, 100 ve 500 µM BPA için alınan ölçümlerin ortalama sonuçları. Ölçümler pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ortamında 0,0 V & +0,4 V potansiyelleri arasında 25°C sabit sıcaklıkta alınmıştır.

Çizelge 3.2. Hazırlanan modifiye biyosensörler ile çizilen standart grafiklerin R^2 değerleri ve farklı bisfenol A konsantrasyonlarda alınan ölçümlerin ortalamaları, standart sapma değerleri ve % varyasyon katsayıları.

Elektrot	Standart grafiklerin R^2 değerleri	25 μM BPA için (\bar{X})	25 μM BPA için $(\pm \text{S.S.})$	25 μM BPA için $(\% \text{ V.K.})$	100 μM BPA için (\bar{X})	100 μM BPA için $(\pm \text{S.S.})$	100 μM BPA için $(\% \text{ V.K.})$	500 μM BPA için (\bar{X})	500 μM BPA için $(\pm \text{S.S.})$	500 μM BPA için $(\% \text{ V.K.})$
1	0,9898	26,34	0,32	1,21	101,45	0,93	0,9	507,78	6,8	1,34
2	0,9874	27,14	0,66	2,43	104,32	0,75	0,7	504,63	4,89	0,9
3	0,9789	23,46	0,98	4,18	102,56	1,71	1,6	508,67	4,31	0,8
4	0,9743	24,77	1,32	5,3	98,64	4,7	4,7	497,61	6,2	1,25

3.4.4. Enzim biyosensörünün substrat spesifikliğine yönelik elde edilen sonuçlar

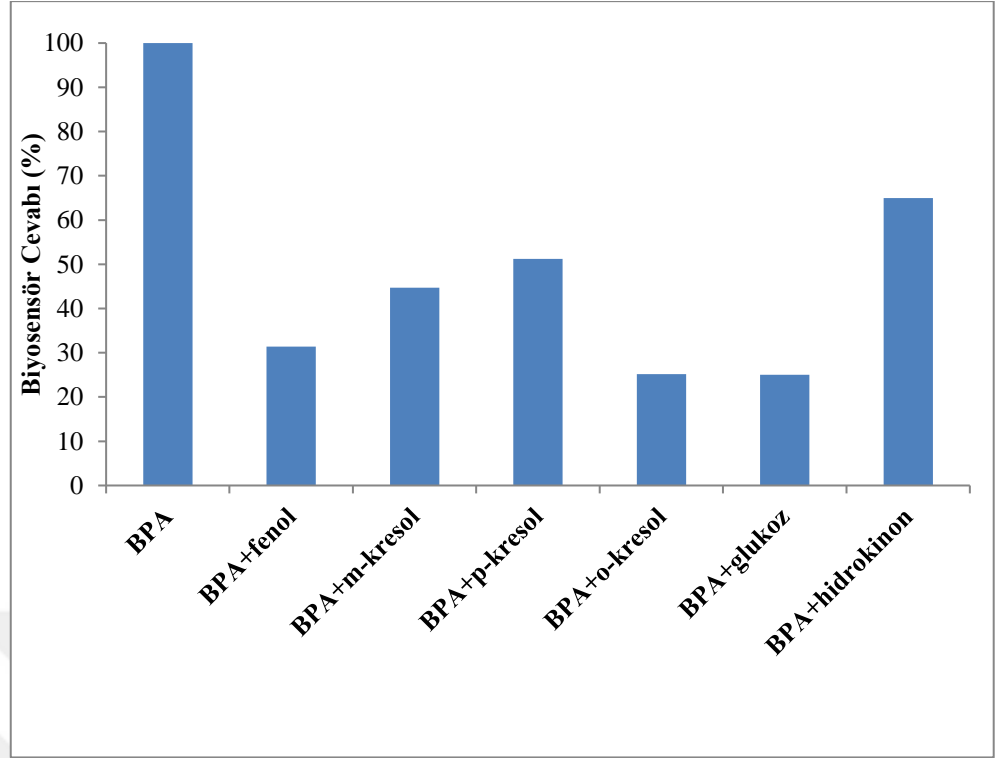
Tirozinaz grup spesifikliğı olan bir enzim olduğundan, kimyasal yapıları BPA'ya benzeyen bazı moleküllerin biyosensör cevabına olan etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla yapılan denemeler sonunda elde edilen sonuçlar Şekil 3.12'de gösterilmiştir. Enzim biyosensörünün BPA'ya verdiği cevap % 100 kabul edilerek, diğer bileşikler için bulunan değerler ile kıyaslanmıştır. Kimyasal yapıları BPA'ya benzerlik gösteren m-kresol ve p-kresol yaklaşık olarak % 50'den daha fazla biyosensör cevabı alınmasına neden olmuştur.



Şekil 3.12. BPA tayinine yönelik geliştirilen enzim biyosensörünün substrat spesifikliğini belirlemesine ilişkin yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar. Ölçümler pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ortamında 0,0 V & +0,4 V potansiyelleri arasında 25°C sabit sıcaklıkta alınmıştır.

3.4.5. Enzim biyosensörünün cevabına girişimcilerin etkisine yönelik elde edilen sonuçlar

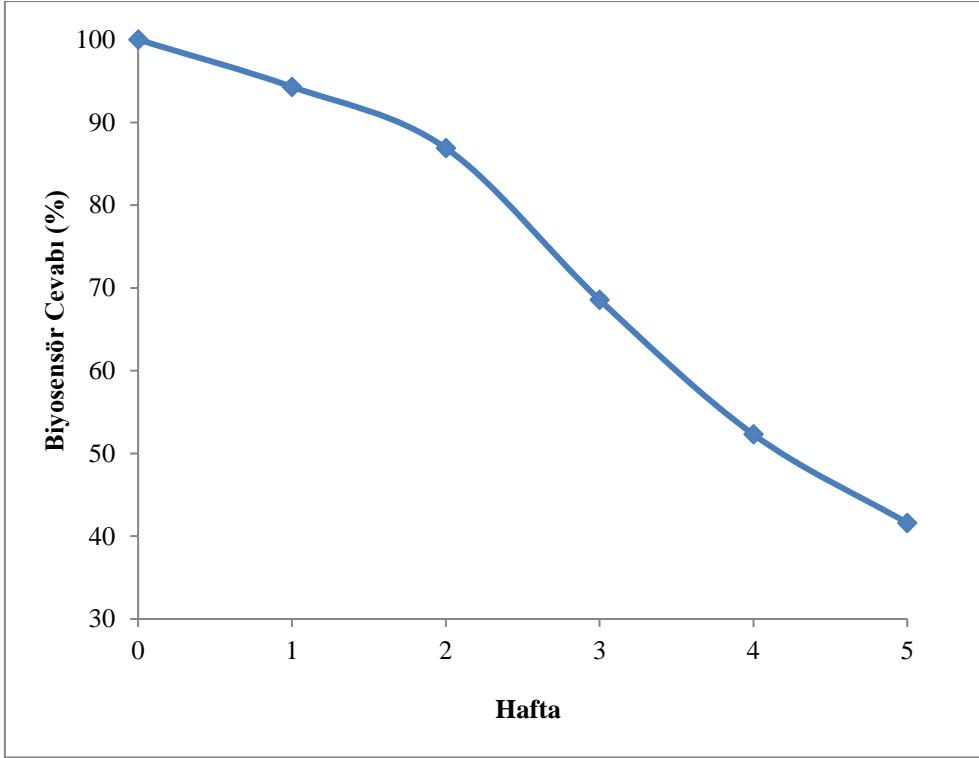
Tasarlanan enzim biyosensörüne girişimci etkisini incelemek amacıyla; BPA varlığında bazı bileşikler için ölçümler alınmıştır. Bu amaçla yapılan denemeler sonunda elde edilen sonuçlar Şekil 3.13'te gösterilmiştir. Enzim biyosensörünün yalnızca BPA için verdiği cevap % 100 kabul edilerek, diğer bileşiklerin BPA ile bir arada olduğu durumda elde edilen biyosensör cevapları ile kıyaslanmıştır. Grafikten de görüldüğü üzere, hidrokinon haricinde diğer tüm girişimcilerin sınırlı düzeyde de olsa girişimci etkisi söz konusudur. Hidrokinonun, tirozinazı nispeten inhibe edici etkisi olduğundan BPA ile bir aradayken bu etkisi daha az düzeydedir.



Şekil 3.13. BPA tayinine yönelik geliştirilen enzim biyosensörüne girişimci etkisine yönelik yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar. Ölçümler pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ortamında 0,0 V & +0,4 V potansiyelleri arasında 25°C sabit sıcaklıkta alınmıştır.

3.4.6. Enzim biyosensörünün depo kararlılığı

Tasarlanan enzim biyosensörünün depo kararlılığını incelemek amacıyla yapılan ölçümlerin sonucu Şekil 3.14'te gösterilmiştir. Grafikten görüldüğü gibi enzim biyosensörü 1 hafta sonrasında aktivitesinin sadece % 6'sını kaybetmiştir. Bu azalma zamanla artmaya devam etmektedir ve 5. haftanın sonunda aktivitesinin yaklaşık %60'ını kaybetmiştir.



Şekil 3.14. Enzim biyosensörünün depo kararlılığı. Ölçümler pH: 7,0; 100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ortamında 0,0 V & +0,4 V potansiyelleri arasında 25°C sabit sıcaklıkta alınmıştır.

3.4.7. Enzim biyosensörü ile içme sularında BPA tayinine yönelik yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar

Tasarlanan enzim biyosensörü ile örnek analizi gerçekleştirmek amacıyla; 3 farklı içme suyu markasına ait pet şişelerden alınan örneklerle standart katma metodu ile ölçümler alınmıştır. Ölçümlerden alınan sonuçlar; standart katma hesaplaması ile tekrar hesaplanmış ve referans HPLC metodu ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.3'de gösterilmiştir. Enzim biyosensörü ile örneklerde bulunan BPA değerleri, HPLC metoduyla bulunan değerler ile kıyaslandığında; enzim biyosensörü ile bulunan BPA değerlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Bununla birlikte; enzim biyosensörü ile bulunan değerlerin HPLC ile bulunan değerler ile oldukça yakın olması, geliştirilen enzim biyosensörünün duyarlılığının iyi olduğu göstergesidir.

Çizelge 3.3. Bisfenol A'nın tasarlanan enzim biyosensörü ve referans metot ile tayini sonucu elde edilen değerler.

Örnek	Eklene Standart BPA Miktarı (μM)	Biyosensörle Alınan Değer (μM)	Referans Metot (HPLC) ile Alınan Değer (μM)	% Geri Kazanım
A	20	4,75	3,15	% 150
B	20	3,85	3,01	% 128
C	20	3,03	2,68	% 113s

4.DEĞERLENDİRME

Son zamanlarda hızla artan plastik üretimi nedeniyle; plastik üretimi sırasında kullanılan veya üretim sonucu açığa çıkan zararlı bileşiklerin hızlı ve basit bir şekilde tayinlerinin yapılması oldukça önem teşkil etmektedir. Tasarlanan 1,5-pentanditiyol/AuNP/Cys/Tyr/GA modifiye enzim biyosensörü ile; plastik birçok ürünün üretiminde kullanılan BPA'nın tayini amaçlanmıştır.

Biyosensör tasarımı sırasında kullanılan immobilizasyon metodu ilk kez denenilen bir yöntemdir. Altın elektrot yüzeyinde tekdüze bir tabaka yaratmak amacıyla 1,5-pentanditiyol kullanılmış; tiyolik bileşiklerden ileri gelen iletkenliğin azalması sorunu ise AuNP ve sisteamin immobilize edilerek aşılmaya çalışılmıştır.

Biyokomponent olarak kullanılan tirozinaz enzimi geniş bir aralıktaki fenolik bileşikleri katalizlemesine karşın; tasarlanan biyosensörün karakterizasyon çalışmalarında da görüldüğü gibi BPA'ya spesifikliğı oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum gerek klinik araştırmalarda gerekse çevre analizlerinde ortamda bulunabilecek diğer fenolik bileşiklerin bertaraf edilebilmesi adına oldukça önemli olup; biyosensörün kullanılabilirliğini arttıran bir faktördür.

Avrupa Gıda Güvenliğı Otoritesi'nin (EFSA) açıkladığı günlük alınabilir maksimum 'Güvenli Limit' (TDI) 50 µg/kg'dır. Tasarlanan enzim biyosensörü ile farklı içme suyu şişelerinden suya geçen BPA miktarı bu değerden çok fazla bulunmuştur. Ancak örnek analizi yapılan içme sularının, ilgili pet şişelerde 6 ay bekletildiğı düşünöldüğünde; zaman içerisinde pet şişeden içme suyuna BPA geçişinin arttığı düşünölmektedir.

Tasarlanan enzim biyosensörünün hazırlanma ve çalışma koşulları optimize edilmiştir. Enzim biyosensörünün optimum çalışma koşulları pH: 7,0 ve 30 °C sıcaklık olarak belirlenmiştir. Karakterizasyona yönelik yapılan çalışmalarda ise 0,0 V & +0,4 V potansiyel aralığındaki DPV yöntemi için doğrusal aralık 25-500 µM olarak bulunmuştur. Tekrarlanabilirlik denemelerinde ise 100 µM BPA için ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı sırasıyla (n=10) 101,88 µM, 1,69 µM ve % 1,66 olarak belirlenmiştir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdullah, J., Ahmad, M., Karuppiah, N., Heng, L.Y. and Sidek, H.,** 2006. Immobilization of tyrosinase in chitosan film for an optical detection of phenol. *Sensors Actuators B Chem.* 114, 604–609. doi:10.1016/j.snb.2005.06.019
- Arya, S.K., Solanki, P.R., Datta, M. and Malhotra, B.D.,** 2009. Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronic devices. *Biosens. Bioelectron.* 24, 2810–7. doi:10.1016/j.bios.2009.02.008
- Bain, C.D., Evall, J. and Whitesides, G.M.,** 1989. Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the head group, tail group, and solvent. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 7155–7164. doi:10.1021/ja00200a039
- Becka, A.M. and Miller, C.J.,** 1993. Electrochemistry at .omega.-hydroxy thiol coated electrodes. 4. Comparison of the double layer at .omega.-hydroxy thiol and alkanethiol monolayer coated Au electrodes. *J. Phys. Chem.* 97, 6233–6239. doi:10.1021/j100125a024
- Bruchet, A. and Janex-Habibi, M.-L.,** n.d. Les perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques et les eaux potables. État des lieux. TSM. Tech. Sci. méthodes, génie urbain génie Rural 81–90.
- Butler, M.J. and Day, A.W.,** 1998. Fungal melanins: a review. *Can. J. Microbiol.* 44, 1115–1136. doi:10.1139/w98-119
- Cerenius, L. and Söderhäll, K.,** 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* 198, 116–26.
- Chaki, N.K. and Vijayamohanan, K.,** 2002. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. *Biosens. Bioelectron.* 17, 1–12.
- Cheng, F., Gamble, L.J. and Castner, D.G.,** 2008. XPS, TOF-SIMS, NEXAFS, and SPR characterization of nitrilotriacetic acid-terminated self-assembled monolayers for controllable immobilization of proteins. *Anal. Chem.* 80, 2564–73. doi:10.1021/ac702380w
- Cin, I.,** 2007. Elektrokimyasal genosensör ile DNA dizi tayini.
- Claus, H. and Decker, H.,** 2006. Bacterial tyrosinases. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 3–14. doi:10.1016/j.syapm.2005.07.012

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Decker, H., Dillinger, R. and Tuczek, F.,** 2000. How Does Tyrosinase Work? Recent Insights from Model Chemistry and Structural Biology. *Angew. Chemie Int. Ed.* 39, 1591–1595. doi:10.1002/(SICI)1521-3773(20000502)39:9<1591::AID-ANIE1591>3.0.CO;2-H
- Dorogi, M., Gomez, J., Osifchin, R., Andres, R.P. and Reifenberger, R.,** 1995. Room-temperature Coulomb blockade from a self-assembled molecular nanostructure. *Phys. Rev. B* 52, 9071–9077. doi:10.1103/PhysRevB.52.9071
- Dubois, L.H. and Nuzzo, R.G.,** 1992. Synthesis, Structure, and Properties of Model Organic Surfaces. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 43, 437–463. doi:10.1146/annurev.pc.43.100192.002253
- Faccio, G., Kruus, K., Saloheimo, M. and Thöny-Meyer, L.,** 2012. Bacterial tyrosinases and their applications. *Process Biochem.* 47, 1749–1760. doi:10.1016/j.procbio.2012.08.018
- Freitag, D.G., Ouimet, P.M., Girvitz, T.L. and Kapoor, M.,** 1997. Heat Shock Protein 80 of *Neurospora crassa*, a Cytosolic Molecular Chaperone of the Eukaryotic Stress 90 Family, Interacts Directly with Heat Shock Protein 70 †. *Biochemistry* 36, 10221–10229. doi:10.1021/bi963030g
- García-Borrón, J.C. and Solano, F.,** 2002. Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res.* 15, 162–73.
- Girelli, A.M., Giuliani, T., Mattei, E. and Papaleo, D.,** 2009. Determination of an Antioxidant Capacity Index by Immobilized Tyrosinase Bioreactor. *J. Agric. Food Chem.* 57, 5178–5186. doi:10.1021/jf900125j
- Jung, S.-H., Son, H.-Y., Yuk, J.S., Jung, J.-W., Kim, K.H., Lee, C.-H., Hwang, H. and Ha, K.-S.,** 2006. Oriented immobilization of antibodies by a self-assembled monolayer of 2-(biotinamido)ethanethiol for immunoarray preparation. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 47, 107–11. doi:10.1016/j.colsurfb.2005.07.007
- K. Vijaya Sarathy, P. John Thomas, G. U. Kulkarni, and, Rao, C.N.R.,** 1999. Superlattices of Metal and Metal–Semiconductor Quantum Dots Obtained by Layer-by-Layer Deposition of Nanoparticle Arrays. doi:10.1021/JP983836L
- Katz, E., Willner, I. and Wang, J.,** 2004. Electroanalytical and Bioelectroanalytical Systems Based on Metal and Semiconductor Nanoparticles. *Electroanalysis* 16, 19–44. doi:10.1002/elan.200302930

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kaushik Sirkar, Alexander Revzin, and Pishko, M. V.**, 2000. Glucose and Lactate Biosensors Based on Redox Polymer/Oxidoreductase Nanocomposite Thin Films. doi:10.1021/AC991041K
- L. Feldheim, D. Keating, C. Bardeen, J. Brattain, W.H. Deal, B.E. Orlov, A.O. Amlani, I. Berstein, G.H. Lent, C.S. Snider, G.L. Gorter, C.J. Neugebauer, C.A. Webb, M.B. Barner, J.B. Ruggiero, S.T. Amman, M. Wilkins, R. Ben-Jacob, E. Maker, P.D. Jaklevic, R.C. Fulton, T.A. Dolan, G.J. Schmid, G. Murray, C.B. Norris, D.J. Bawendi, M.G. Brust, M. Walker, M. Bethell, D. Schiffrin, D.J. Whyman, R.J. Green, S.J. Stokes, J.J. Hostetler, M.J. Pietron, J. Murray, R.W. Colvin, V.L. Goldstein, A.N. Alivisatos, A.P. Alivisatos, A.P., Johnsson, K.P., Peng, X., Wilson, T.E., Loweth, C.J., M. P. Bruchez, J., Schultz, P.G., Mirkin, C.A., Letsinger, R.L., Mucic, R.C., Storhoff, J.J., Fendler, J.H., Meldrum, F.C., Schmitt, J., Decher, G., Dressick, W.J., Brandow, S.L., Geer, R.E., Shashidhar, R., Calvert, J.M., Feldheim, D.L., Grabar, K.C., Natan, M.J., Mallouk, T.E., Grabar, K.C., Smith, P.C., Musick, M.D., Davis, J.A., Walter, D.G., Jackson, M.A., Guthrie, A.P., Natan, M.J., Andres, R.P., Bein, T., Dorogi, M., Feng, S., Henderson, J.I., Kubiak, C.P., Mahoney, W., Osifchin, R.G., Reifengerger, R., Sato, T., Hasko, D.G., Ahmed, H., Klein, D.L., McEuen, P.L., Katari, J.E.B., Roth, R., Alivisatos, A.P., Routkevitch, D., Tager, A.A., Haruyama, J., Almawlawi, D., Moskovits, M., Xu, J.M., Lingjie, G., Leobandung, E., Chou, S.Y., Tiwari, S., Rana, F., Hanafi, H., Hartstein, A., Crabbe, E.F., Chan, K., Yoo, M.J., Fulton, T.A., Hess, H.F., Willett, R.L., Dunkleberger, L.N., Chichester, R.J., Pfeiffer, L.N., West, K.W., Peng, X., Wilson, T.E., Alivisatos, A.P., Schultz, P.G., Sato, T., Ahmed, H., Brown, D. and Johnson, B.F.G.**, 1998. Self-assembly of single electron transistors and related devices. *Chem. Soc. Rev.* 27, 1. doi:10.1039/a827001z
- Lerch, K.**, 1995. Tyrosinase: Molecular and Active-Site Structure. pp. 64–80. doi:10.1021/bk-1995-0600.ch005
- Li, J., Long, X., Yin, H., Qiao, J. and Lian, H.**, 2016. Magnetic solid-phase extraction based on a polydopamine-coated Fe₃O₄ nanoparticles absorbent for the determination of bisphenol A, tetrabromobisphenol A, 2, 4, 6-tribromophenol, and (S)-1, 1'-bi-2-naphthol in environmental waters by HPLC. *J. Sep. Sci.* 39, 2562–2572. doi:10.1002/jssc.201600231
- Liu, S., Leech, D. and Ju, H.**, 2003. Application of Colloidal Gold in Protein Immobilization, Electron Transfer, and Biosensing. *Anal. Lett.* 36, 1–19. doi:10.1081/AL-120017740

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mascini, M., Iannello and M., Palleschi, G.,** 1983. Enzyme electrodes with improved mechanical and analytical characteristics obtained by binding enzymes to nylon nets. *Anal. Chim. Acta* 146, 135–148. doi:10.1016/S0003-2670(00)80600-5
- Matthews, J., Celius, T., Halgren, R. and Zacharewski, T.,** 2000. Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: a species comparison. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74, 223–34.
- Mayer, A.M.,** 1986. Polyphenol oxidases in plants-recent progress. *Phytochemistry* 26, 11–20. doi:10.1016/S0031-9422(00)81472-7
- Md. Harunar Rashid, Rama Ranjan Bhattacharjee, Atanu Kotal, and Mandal, T.K.,** 2006. Synthesis of Spongy Gold Nanocrystals with Pronounced Catalytic Activities. doi:10.1021/LA060939J
- Mehrotra, P.,** 2016. Biosensors and their applications - A review. *J. oral Biol. craniofacial Res.* 6, 153–9. doi:10.1016/j.jobcr.2015.12.002
- Nosanchuk, J.D. and Casadevall, A.,** 2003. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell. Microbiol.* 5, 203–23.
- Park, H.H., Park, H., Jamison, A.C. and Lee, T.R.,** 2014. Colloidal stability evolution and completely reversible aggregation of gold nanoparticles functionalized with rationally designed free radical initiators. *Colloid Polym. Sci.* 292, 411–421. doi:10.1007/s00396-013-3071-1

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pethkar, S., Aslam, M., Mulla, I.S., Ganeshan, P., Vijayamohan, K., Collier, C.P., Vossmeier, T., Heath, R.J., Harfenist, S.A., Wang, Z.L., Whetten, R.L., Wezmar, I., Alvarez, M.M., Elghanian, R., Storhoff, J.J., Muncie, R.C., Letsinger, L.R., Mirkin, C.R., Nakanishi, T., Ohtani, B., Uosaki, K., Kagan, C.R., Murray, C.B., Bawendi, M.G., Guzelian, A.A., Katari, J.E.B., Kadavanich, A. V., Banin, U., Hamad, K., Yin, J.S., Wang, Z.L., Rao, C.N.R., Kulkarni, G.U., Thomas, P.J., Edwards, P.P., Wang, Z.L., Harfenist, S.A., Whetten, R.L., Bentley, J., Evans, N.D., Alvarez, M.M., Houry, J.T., Schoatt, T.G., Shafiqullin, M.N., Wezmar, I., Whetten, R.L., Murray, C.B., Kagan, C.R., Bawendi, M.G., Mayya, K.S., Sastry, M., Korgel, B.A., Fitzmaurice, D., Musick, M.D., Keating, C.D., Lyon, L.A., Botsko, S.L., Pena, D.J., Holliway, W.D., McEvoy, T.M., Richardson, J.N., Natan, M.J., Vijayasarathi, K., Thomas, P.J., Kulkarni, G.U., Rao, C.N.R., Taleb, A., Russier, V., Courty, A., Pileni, M.P., Simon, U., Flesch, R., Wiggers, H., Schon, G., Schmid, G., Heath, J.R., Knobler, C.M., Leff, D. V., Ohara, P.C., Heath, J.R., Gelbart, W.M., Bandyopadhyay, K., Sastry, M., Paul, V., Vijayamohan, K., Bandyopadhyay, K., Vijayamohan, K., Henglin, A., Mostafvi, M., Kechouche, N., Delcourt, M., Belloni, J., Kreibitz, U., Genzel, L., Brust, M., Flink, J., Bethell, D., Schiffrin, D.J., Kiely, C.J., Castner, D.G., Hinds, K., Grainger, D.W., Mekhalif, Z., Riga, J., Pireaux, J.J., Delhalle, J., Miller, C., Cuendet, P., Grätzel, M., Nozik, A.J., Parsons, C.A., Dunlavy, D.J., Keyes, B.M. and Ahrenkiel, R.K., 2001. Preparation and characterisation of silver quantum dot superlattice using self-assembled monolayers of pentanedithiol. *J. Mater. Chem.* 11, 1710–1714. doi:10.1039/b009372f**
- Sezgentürk, M.K. and Dinçkaya, E., 2005.** Direct determination of sulfite in food samples by a biosensor based on plant tissue homogenate. *Talanta* 65, 998–1002. doi:10.1016/j.talanta.2004.08.037
- Staples, C.A., Dorn, P.B., Klecka, G.M., O’Block, S.T. and Harris, L.R., 1998.** A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 36, 2149–73.
- Streffer, K., Vijgenboom, E., Tepper, A.W.J., Makower, A., Scheller, F.W., Canters, G.W. and Wollenberger, U., 2001.** Determination of phenolic compounds using recombinant tyrosinase from *Streptomyces antibioticus*. *Anal. Chim. Acta* 427, 201–210. doi:10.1016/S0003-2670(00)01040-0
- Suaud-Chagny, M.F. and Pujol, J.F., n.d.** Micro-électrode à enzyme immobilisée pour la détection de l’acétylcholine. *Analisis* 13, 25–29.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tran Minh Canh and Beaux, J.**, 1979. Enzyme electrode for inhibitors determination: urease-fluoride system. *Anal. Chem.* 51, 91–95. doi:10.1021/ac50037a030
- Trojanowicz, M.**, 2006. Analytical applications of carbon nanotubes: a review. *TrAC Trends Anal. Chem.* 25, 480–489. doi:10.1016/j.trac.2005.11.008
- Ulman, A.**, 1991. An introduction to ultrathin organic films : from Langmuir-Blodgett to self-assembly. Academic Press.
- Velasco-Garcia, M.N. and Mottram, T.**, 2003. Biosensor Technology addressing Agricultural Problems. *Biosyst. Eng.* 84, 1–12. doi:10.1016/S1537-5110(02)00236-2
- Vidal, J.-C., Espuelas, J., Garcia-Ruiz, E. and Castillo, J.-R.**, 2004. Amperometric cholesterol biosensors based on the electropolymerization of pyrrole and the electrocatalytic effect of Prussian-Blue layers helped with self-assembled monolayers. *Talanta* 64, 655–64. doi:10.1016/j.talanta.2004.03.038
- Wang, G., Xu, J.-J., Ye, L.-H., Zhu, J.-J. and Chen, H.-Y.**, 2002. Highly sensitive sensors based on the immobilization of tyrosinase in chitosan. *Bioelectrochemistry* 57, 33–8. doi:10.1016/s1567-5394(01)00174-8
- Yachiguchi, K., Matsumoto, N., Haga, Y., Suzuki, M., Matsumura, C., Tsurukawa, M., Okuno, T., Nakano, T., Kawabe, K., Kitamura, K., Toriba, A., Hayakawa, K., Chowdhury, V.S., Endo, M., Chiba, A., Sekiguchi, T., Nakano, M., Tabuchi, Y., Kondo, T., Wada, S., Mishima, H., Hattori, A. and Suzuki, N.**, 2014. Polychlorinated biphenyl (118) activates osteoclasts and induces bone resorption in goldfish. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 6365–72. doi:10.1007/s11356-012-1347-5
- Yáñez-Sedeño, P. and Pingarrón, J.M.**, 2005. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 884–6. doi:10.1007/s00216-005-3221-5
- Zhong, X., Yuan, R., Chai, Y., Liu, Y., Dai, J. and Tang, D.**, 2005. Glucose biosensor based on self-assembled gold nanoparticles and double-layer 2d-network (3-mercaptopropyl)-trimethoxysilane polymer onto gold substrate. *Sensors Actuators B Chem.* 104, 191–198. doi:10.1016/j.snb.2004.04.114