T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI ORGANİK BİLEŞİKLERİN TAYİNİ İÇİN MİKROBİYAL ESASLI BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hazırlayan

Hatice PALÜZAR

Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Ayten SAĞIROĞLU

EDİRNE-2009

ÖZET

Bu çalışmada fenolik bileşiklerin tayin edilmesine yönelik probiyotik bakteri esaslı bir biyosensör geliştirilmesi amaçlandı ve *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus delbrueckii bulgaricus, Streptococcus thermophilus* probiyotik bakterilerinin değişik formlarının biyosensör geliştirmede doğal enzim kaynağı olarak kullanılabilirlikleri incelendi. Uygun bulunan probiyotik bakteri formu ile hazırlanan mikrobiyal esaslı biyosensörün optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bu amaçla çalışmalarda substrat olarak kullanılacak fenolik bileşikler belirlendi. Optimizasyon çalışmalarında hazırlanan biyosensörün biyosensör cevapları üzerine pH, tampon konsantrasyonu ve sıcaklığın etkisi incelendi. Ayrıca biyosensörün biyoaktif tabaka bileşenlerini oluşturan probiyotik bakteri, jelatin ve glutaraldehid miktarının biyosensör cevapları üzerine etkisi incelendi. Karakterizasyon çalışmalarında belirlenen optimum koşullarda hazırlanan biyosensörün fenolik bileşiklerin analizi için standart kateşole göre tayin sınırları belirlendi. Ayrıca analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği, operasyonel kararlığı ve depo kararlılığı incelendi. Belirlenen optimum koşullarda hazırlanan biyosensörün çeşitli örneklerdeki fenolik bileşiklerin belirlenmesinde uygulanabilirliği incelendi.

Uygun probiyotik bakterinin belirlenmesinde; *Lactobacillus*lar için uygun olan MRS Broth besi ortamında substrata adapte edilmiş; karışık haldeki *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus themophilus; s*aflaştırılmış *Lactobacillus acidophilus*, saflaştırılmış *Lactobacillus bulgaricus* ve liyofilize formda karışık haldeki *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus themophilus* bakterileri kullanılarak biyosensörler hazırlandı. En iyi biyosensör cevabı *L. acidophilus, L. bulgaricus ve S. thermophilus'*u içeren liyofilize form olarak belirlendi.

Optimizasyon ve karakterizasyon çalışmalarında; standart olarak kullanılacak fenolik bileşiğin belirlenmesi için orsinol, rezorsin, p-kresol, laktik asit, L-dopa, fenol, kateşol, gallik asit ve pirogallolün hazırlanan biyosensörle verdiği biyosensör cevapları incelendi ve en uygun cevap kateşol ile elde edildi.

Optimizasyon çalışmalarında; hazırlanan biyosensörün optimum pH'ı 8.0, en uygun tampon sistemi 50 mM fosfat tamponu, optimum sıcaklık 37,5 ºC olarak belirlendi.

Biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyon çalışmalarında; optimum bakteri miktarı, optimum jelatin miktarı ve optimum glutaraldehit yüzdesi sırasıyla 5 mg, 5 mg ve % 0,625 olarak belirlendi.

Karakterizasyon çalışmalarında; belirlenen optimum koşullarda hazırlanan probiyotik esaslı biyosensörün fenolik bileşiklerin tayininde standart olarak kullanılan kateşol için tayin sınırları 0,5 – 5 mM aralığı olarak belirlendi.

Operasyonel karalılığın ve tekrarlanabilirliğin belirlenmesinde; 1 mM standart kateşol için arka arkaya ölçümler alındı. X_{ort}=1,022 mM, standart sapma (S.D.) ± 0,045, varyasyon katsayısı (C.V.) % 4,39 olarak belirlendi. Bu durum hazırlanan biyosensörün, fenolik bileşik tayini için uygun ve kararlı bir sistem olduğunu gösterdi.

Geliştirilen biyosensörün depo kararlılığının belirlenmesinde; 22 gün boyunca belirli periyotlarla ölçümler alındı. İlk 10 gün, aktivite korundu. Sonra 18. güne kadar biyosensörün başlangıç aktivitesinin % 20'sini kaybettiği gözlendi. 19 günden sonra, biyosensör hızlı bir şekilde aktivitesini kaybetmeye başladı.

Geliştirilen biyosensör kullanılarak yapılan ölçümlere ait standart sapma ve varyasyon katsayıları dikkate alındığında; fenolik bileşik analizi yapılan bütün örneklerde uygulanabileceği görüldü.

Anahtar kelimeler: Mikrobiyal biyosensör, fenolik bileşik, probiyotik, *Lactobacillus acidophilus*

ABSTRACT

In this study, for the determination of phenolic compounds, a biosensor development based on probiotic bacterium was purposed and for developing a biosensor, suitability of different forms of *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus* probiotic bacterium were investigated. The biosensor was prepared by using probiotic bacterium form which was found suitable, and the optimization and characterization conditions of this biosensor were carried out. For this purpose, the phenolic compounds which was used as a substrate in assays was determined. In the optimization studies of the biosensor, the effects of pH, concentration of buffer and temperature on the biosensor response were investigated. Furthermore, for the determination of the effects of bioactive layer materials such as the amount of probiotic bacterium and gelatin, percentage of glutaraldehyde on the biosensor response were investigated. In the characterization studies of the biosensor, determination of phenolic compounds, a biosensor was prepared at the determined optimum working conditions and linear measurement range was determined according to catechol. Besides, repeatability of biosensor responses, operational and storage stability of the biosensor were investigated. For determination of phenolic compounds in various samples, suitability of the biosensor which was prepared in determined optimum conditions, were investigated.

For the determination of the suitable probiotic bacterium, mixed form of *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus* which was adapted to substrat in *Lactobacilli* MRS Broth, pure form of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* which were isolated from mixed form in *Lactobacilli* MRS Broth, liyophilized mixed form of *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus* were used and using these bacteriums, biosensors were prepared. The best biosensor response was taken with liyophilized mixed form of *L. acidophilus, L. bulgaricus* and *S. thermophilus*.

In the optimization and characterization studies, for the determination of a phenolic compounds which was used as a substrate in assays, biosensor responses which were taken with some phenolic compounds such as orsinol, rezorsin, p-cresol, lactic acid, L-dopa, phenol, catechol, gallic acid and pyrogallol were investigated and the most suitable response was obtained with catechol.

In the optimization studies, pH 8,0 was selected as optimum pH value for the biosensor and the most suitable buffer system was determined as 50 mM phosphate buffer and optimum temperature was determined as 37,5 ºC.

In the optimization studies of bioactive layer, optimum bacterium amount, optimum gelatin amount and optimum percentage of glutaraldehyde were determined as 5 mg, 5 mg and % 0,625, respectively.

In the characterization studies, for determination of phenolic compounds, a biosensor was prepared at the determined optimum working conditions and linear measurement range was determined on catechol concentration between 0,5 and 5 mM.

For determination of operational stability and repeatability; measurements were done for 1 mM concentration of catechol. X_{ort}=1,022 mM, S.D. ± 0,045, C.V. 4,39 % were determined. This case proved that this biosensor system was suitable and stable for determination of phenolic compounds.

For determination of storage stability of developed biosensor, the experiments were carried out periodically during 22 days. The first 10 days, the activity was protected constantly and then up to 18 days it was observed that the biosensor lost 20 % of its initial activity. After 19 days, the biosensor lost its activity rapidly.

When the standard devination and the coefficient of variation of the measurements which were done by using developed biosensor were paid attention; suitability of the biosensor were seen for all samples which phenolic compounds analysis were done in.

Keywords: Microbial biosensor, phenolic compound, probiotic, *Lactobacillus acidophilus*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca kıymetli görüşlerinden yararlandığım, tezimin planlanması ve yürütülmesinde, tezimin her aşamasında yoğun ilgi ve desteğini gördüğüm Sayın Hocam **Doç. Dr. Ayten SAĞIROĞLU'**na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın literatür araştırmalarında ve deneysel çalışmalarımda benden bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen **Arş. Gör. Hakkı Mevlüt ÖZCAN'**a, mikroorganizmalar ve besi yerlerinde çoğaltılması aşamasında yardımlarını aldığım Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Anabilim Dalından **Uzm. Dr. Suzan SARICA ÖKTEN** ve **Arş. Gör. Burhan ŞEN'e,** yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım aşamasında katkılarını ve yardımlarını esirgemeyen hocalarıma ve manevi desteğini aldığım arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman ilgiyle ve sabırla beni destekleyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET……..……I
ABSTRACT……...III
TEŞEKKÜR…...……...V
İÇİNDEKİLER……VI
ŞEKİLLER DİZİNİ……..IX
TABLOLAR DİZİNİ……X
KISALTMALAR……..XI

Sayfa

1. GİRİŞ……1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI……..4
2.1. Probiyotik Bakteriler……...4
2.1.1. Probiyotik bakterilerin özellikleri……...……...4
2.1.2. Probiyotik bakterilerin enzim aktiviteleri……...……...7
2.1.3. Probiyotik bakterilerin fiziksel özellikleri……...……..8
2.1.4. Liyofilize formdaki probiyotik bakterilerin saklama koşulları……..…...9
2.2. Fenolik Bileşikler ve Özellikleri……..9
2.3. Fenolik Bileşiklerin Tayin Edilmelerinin Önemi……11
2.3.1. Atık sularda tayin edilmelerinin önemi……13
2.3.2. Süt ve süt ürünlerinde tayin edilmelerinin önemi……13
2.4. Fenolik Bileşiklerin Tayin Yöntemleri……14
2.5. Biyosensör Temelli Yöntemler……..15
2.5.1. Biyosensörlere genel bakış……...15
2.5.2. Biyosensörler ve bileşenleri……..16
2.5.2.1. Biyoajanlar (Biyoaktif tabaka)……17
2.5.2.2. Sinyal ileticiler (Transduserler)……19
2.5.3. Biyoaktif tabakanın elektrot yüzeyine immobilizasyonu……21
2.5.4. Enzim biyosensörleri…….. 23
2.5.5. Doku biyosensörleri……. 23
2.5.6. Mikrobiyal biyosensörler……. 24

2.6. Tezde Kullanılan Biyomateryallere Genel Bakış……26
2.6.1. *Lactobacillus acidophilus* ……26
2.6.2. *Lactobacillus dellbrueckii bulgaricus* ve *Streptococcus* thermophilus……27
2.6.3. Jelatin……29
2.6.4. Glutaraldehid……... 29

3. MATERYAL VE METOD……31
3.1. Materyaller……..31
3.1.1. Kimyasallar……..31
3.1.2. Cihazlar……...…31
3.2. Metodlar……..32
3.2.1. Çözünmüş oksijen probunun çalışma ilkesi…….32
3.2.2. Mikrobiyal esaslı biyosensörün hazırlanması……..32
3.2.3. Hazırlanan mikrobiyal esaslı biyosensör ile ölçüm ilkesi……33
3.2.4. Mikrobiyal temelli biyosensör için uygun bakterinin seçilmesi…….....34
3.2.4.1. *Lactobacilluslar* için besi ortamının hazırlanması……...35
3.2.4.2. Bakterilerin besi ortamından izolasyonu……..……...35
3.2.4.3. Uygun bakteri formunun seçilmesi……..……...36
3.2.5. Substrat olarak kullanılacak standart fenolik bileşiğin seçilmesi…… 37
3.2.6. Mikrobiyal esaslı biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyonu……..37
3.2.6.1. pH optimizasyonu…….37
3.2.6.2. Uygun tampon konsantrasyonu……38
3.2.6.3. Optimum sıcaklık…….38
3.2.7. Biyosensörün biyoaktif tabaka materyallerinin optimizasyonu……...38
3.2.7.1. Bakteri miktarının biyosensör cevabına etkisi……..……..39
3.2.7.2. Jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi……...39
3.2.7.3. Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi……...39
3.2.8. Biyosensörün karakterizasyon çalışmaları……...40
3.2.8.1. Doğrusal ölçüm aralığının belirlenmesi……...40
3.2.8.2. Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği……..40
3.2.8.3. Operasyonel kararlılık……. 40
3.2.8.4. Depo kararlılığı…….41

3.2.9. Geliştirilen biyosensör ile fenolik bileşiklerin tayin edilebilirliği……....41
3.2.9.1. Sentetik atık suda ve fabrika atık suyunda fenolik bileşiklerin tayini…….….41
3.2.9.2. Süt ve süt ürünlerinde fenolik bileşiklerin tayini……..41

4. ARAŞTIRMA BULGULARI…**……43**
4.1. Fenolik Bileşiklerin Tayinine Yönelik Uygun Bakterinin Seçilmesi……..……43
4.2. Substrat Olarak Kullanılacak Standart Fenolik Bileşiğin Seçilmesi…….…….45
4.3. Mikrobiyal Esaslı Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonuna İlişkin Bulgular…….…….…….……47
4.3.1. Optimum pH…….…….……..…47
4.3.2. Optimum tampon konsantrasyonu……..…….48
4.3.3. Optimum sıcaklık……..……....49
4.4. Biyosensörün Biyoaktif Tabaka Materyallerinin Optimizasyonuna İlişkin Bulgular……..50
4.4.1. Bakteri miktarının biyosensör cevabına etkisi…….……50
4.4.2. Jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi…….…….……51
4.4.3. Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi…..……....52
4.5. Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular……...53
4.5.1. Kateşol için doğrusal ölçüm aralığı……...…….….53
4.5.2. Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği……..…….….54
4.5.3. Operasyonel kararlılık…….….55
4.5.4. Depo kararlılığı……..……..……55
4.6. Çeşitli Örneklerde Fenolik Bileşiklerin Tayini…….……...56

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA……..58

6. KAYNAKLAR……....65

ÖZGEÇMİŞ……...71

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

2.1. Bazı probiyotik bakterilerin mikroskobik görüntüleri……..……...8

2.2. Bazı basit fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları……10

2.3. Polifenol oksidaz enziminin yapısı……..12

2.4. Kateşolün PPO enzimi ile verdiği reaksiyon……...12

2.5. Biyosensörün genel şematik gösterimi……17

2.6. Biyoajan olarak kullanılan enzim kaynakları……..18

2.7. Sinyal ileticilerde gerçekleşen değişimler ve ölçüm cihazları…….19

2.8. Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi……..20

2.9. Biyosensörün biyoaktif tabakasındaki reaksiyonların şematik gösterimi……...21

2.10. Biyosensörlerin biyoaktif tabakalarında biyoajanların immobilizasyonunda kullanılan genel teknikler……22

2.11. Bitki dokuları (A), Bitki dokusu kesiti (B)……..24

2.12. *E. coli* Bakterisi……25

2.13. *Lactobacillus acidophilus L.* mikroskobik görüntüleri……27

2.14. *(a) Lactobacillus bulgaricus, (b) Streptococcus thermophilus*……28

2.15. Glutaraldehit'in yapısı…….30

3.1. Tezde kullanılan çözünmüş oksijen (DO) esaslı biyosensör düzeneği…….....33

3.2. Geliştirilen biyosensör ile fenolik bileşiklerin tayini için kullanılan süt ürünleri…….42

4.1. Fenolik bileşik tayini için farklı mikroorganizmaların biyosensör cevapları…..44

4.2. Farklı fenolik bileşiklerin (2,5 mM) çözünmüş oks. kons.-zaman grafiği……..46

4.3. Biyosensör cevabı üzerine pH'ın etkisi……...47

4.4. Biyosensör cevabı üzerine tampon konsantrasyonunun etkisi……48

4.5. Biyosensör cevabı üzerine sıcaklığın etkisi…….49

4.6. Biyosensör cevabı üzerine bakteri miktarının etkisi……51

4.7. Biyosensör cevabı üzerine jelatin miktarının etkisi…….52

4.8. Biyosensör cevabı üzerine glutaraldehit yüzdesinin etkisi……..53

4.9. Kateşol standart grafiği……54

4.10. Operasyonel kararlılık…….55

4.11. Depo kararlılığı……56

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo **Sayfa**

2.1. Probiyotik olarak kullanılan bakteriler……..……..……..…..6

2.2. Biyoaffinite ve Biyokatalitik ajanlar ve bunlarla tayin edilen analitler……..…18

4.1. Standart kateşolün tayini için alınan ölçüm sonuçları……54

4.2. Çeşitli örneklerde kateşol tayini……...……..57

KISALTMALAR

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
DO	Çözünmüş Oksijen (Dissolved oxygen)
PPO	Polifenoloksidaz
S.D.	Standart sapma (Standard Devination)
C.V.	Varyasyon katsayısı (Coefficient of Variation)

1. GİRİŞ

Dünyada ve ülkemizde 1980'li yıllardan sonra hızlı bir endüstriyel değişim meydana gelmiştir. Bu değişimle birlikte öncelik üretime verilmiş, ancak çevreye verilen atıkların çevre ve canlı hayatı üzerine etkileri pek fazla düşünülmemiştir. Çevreye atılan endüstriyel atıkların artmasıyla birlikte birçok atık türünde doygunluğa ulaşılmış ve zararları görülmeye başlanmıştır. Bu atıklardan en önemlilerinden birisi de fenol ve fenol türevleridir. Bunlar patlayıcı madde, farmasötik, plastik, kâğıt, boya, ilaç, pestisit ve antioksidanların üretimi gibi birçok endüstriyel proseste kullanılırlar (Sokol, 1998). Fenol bileşikleri ve homologlarının çoğu zehirli maddelerdir ve organik kirleticilerin büyük bir grubunu oluştururlar. Fenolik bileşiklerin tayin edilmeleri bu nedenle önem kazanmıştır.

Fenolik bileşiklerin bulundukları ortamda miktarlarının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu bileşiklerin atık sular, içecekler gibi çeşitli ortamlarda tayini, kolorimetrik, florometrik, türbidimetrik, spektrofotometrik ve enzimatik metotlarla yapılmaktadır. Ancak bunlar oldukça zaman alıcı ve pahalı sistemlerdir (Mello ve Kubato, 2002). Bu tip sistemlere kıyasla biyosensörler ile oldukça pratik ve çabuk sonuç veren analizler mümkündür.

Biyosensörler, enzim, mikrorganizma, doku gibi biyolojik unsurların uygun bir iletim sistemiyle birleştirilmesiyle oluşan biyoanalitik cihazlardır. Biyosensörlerde enzim kaynağı olarak mikroorganizmaların kullanımı enzim saflaştırılmasının uzun ve pahalı işlemlerini gerektirmediğinden ve enzimler doğal çevresinden ayrılmadığı için daha uzun süre aktivitelerini koruyabileceğinden, saf enzimlerin kullanıldığı biyosensörlere göre daha avantajlı görülmektedirler (D'Souza, 2001).

Mikrobiyal kaynaklar içerdikleri doğal ürünlerle birlikte bu ürünlerin canlı sistemde dönüşüm reaksiyonlarını katalizleyen enzimleri de bulundururlar. Mikroorganizmaların enzim aktiviteleri genel olarak, etkilediği substratın canlıdaki veya canlının yaşadığı ortamdaki miktarıyla orantılıdır. Mikrobiyal kaynakla

hazırlanmış biyosensörler canlı sistemin spesifikliğinin elektronik sinyale dönüşümü yoluyla duyarlı ve kısa sürede sonuç verebilmektedir. Kolay hazırlanır, ucuzdur, tekrar tekrar kullanılabilir. Bu bakımdan enzim kaynağı olarak kullanılabilecek, aktivitesi, işlem kararlığı yüksek olan yeni mikroorganizmaların araştırılması ve uygun olanların biyosensörlerde kullanılabilirliğinin belirlenmesi önemlidir (Telefoncu, 1999a).

Biyosensör geliştirilmesinde biyobileşen olarak doğal enzim kaynaklarından mikroorganizmaların kullanıldığı çok sayıda çalışma vardır (Rotariu vd., 2004; Tkac vd., 2002; Srisawasdi vd., 2006). Ancak yapılan literatür taramalarında daha önce biyosensör hazırlamada enzim kaynağı olarak kullanılan probiyotik bakterilerden *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus'*un kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle tez kapsamında daha önce biyosensör hazırlamada hiç kullanılmamış mikroorganizmaların incelenmiş olması tez çalışmasının önemini arttırmaktadır.

Bu tez çalışmasında, fenolik bileşiklerin tayini için probiyotik bakteri esaslı mikrobiyal biyosensör geliştirilmesi amaçlandı. Bu amaçla *L. acidophilus, L. bulgaricus ve S. thermophilus'*u içeren liyofilize form, bu formun *lactobacillus*lar için uygun olan MRS Broth besi yerinde substrat olarak kullanılan fenolik bileşiğe adapte edilmiş formu, mevcut liyofilize formdan saflaştırılmış *L. acidophilus* ve *L. bulgaricus'*un ayrı ayrı MRS Broth besi yerinde substrat olarak kullanılan fenolik bileşiğe adapte edilmiş formlarının biyosensör geliştirmede doğal enzim kaynağı olarak kullanılabilirlikleri incelendi.

Uygun bulunan probiyotik bakteri formu ile hazırlanan mikrobiyal esaslı biyosensörün optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bu amaçla öncelikle çalışmalarda substrat olarak kullanılacak fenolik bileşik belirlendi. Sonra optimizasyon çalışmalarına geçilerek hazırlanan biyosensörün biyosensör cevapları üzerine pH, tampon konsantrasyonu ve sıcaklığın etkisi, biyosensörün biyoaktif tabaka bileşenlerini oluşturan probiyotik bakteri, jelatin ve glutaraldehid miktarının etkisi incelendi. Karakterizasyon çalışmaları için belirlenen optimum koşullarda hazırlanan biyosensörün fenolik bileşiklerin analizi için standart olarak kullanılan kateşole göre

tayin sınırları belirlenerek analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği, operasyonel kararlığı ve depo kararlılığı incelenmiştir. Son olarak geliştirilen probiyotik esaslı biyosensörün süt, süt ürünleri ve atık sularda fenolik bileşiklerin tayini için kullanılabilirliği incelendi.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Probiyotik Bakteriler

Yeryüzündeki tüm canlılar, çeşitli mikroorganizmalarla iç içe yaşamaktadır. Yeryüzünde insan nüfusu 5 milyar iken mikroorganizma popülasyonu 100 trilyondur (Korkut vd., 2003). Bu nedenle mikroorganizmaların etkileri küçümsenemez. Mikroorganizmalar; şarap, bira, peynir, yoğurt, ekmek, turşu v.b. besinlerin üretimine kadar her yerde mevcuttur.

Mikroorganizmalar ile insan sağlığı arasındaki bağlantıya kılavuzluk eden hipotez ise, Bulgar köylülerinin uzun yaşamlarının fermente süt ürünleri tüketimlerinden kaynaklandığını savunan Nobel ödüllü Rus bilim adamı Elie Metchnikoff (1845-1916) tarafından ileri sürülmüştür. Bu hipoteze göre normal bağırsak florası bugün probiyotikler olarak tanımlanan yararlı mikroorganizmalardan etkilenebilmektedir (Doillet ve Langdon, 1994). Metchnikoff'tan sonra probiyotikler üzerine sayısız araştırma yapılmış ve probiyotikler oldukça bilimsel ve ticari ilgi odağı olmuşlardır. Bu ilgi özellikle mikroorganizmaların sağlık üzerine olumlu bir katkı göstermesinin ilginçliği ve elde edilebilirliği ile ticari form haline dönüştürülebilmesinin kolaylığı nedeniyle olmuştur. Bilimsel olarak desteklenmiş ve hastalık riskini azaltan "Probiyotik mikroorganizmaları" içeren mandıra ürünleri (süt, yoğurt ve peynir gibi), et ürünleri, meyve suları ve çikolata gibi değişik fonksiyonel ürünler uzun zamandır marketlerde yerini almıştır.

2.1.1. Probiyotik bakterilerin özellikleri

Probiyotikler; hayvansal canlıların sindirim sistemi ve özellikle bağırsaklarında mikrobiyal dengeyi düzenleyen canlı bakteriler sınıfından mikroorganizmalardır (Surawicz, 2003). **Prebiyotikler** ise probiyotik bakteriler ile birlikte simbiyotik yaşam

sürdüren, polisakkarit esaslı sindirilmeyen yapılardır ve birlikte bulunduğu bakterilerin sayılarını ve aktivitelerini arttırarak faydalı probiyotik etkisini güçlendirirler.

Probiyotik bakteriler mide asitliğine diğer bakterilere göre daha dayanıklıdır. Safra tuzuna ve lizozim enzimine daha dirençlidir. Probiyotik bakteriler laktik asit, asetik asit, bakteriyosin gibi antimikrobiyal maddeler üreterek, bağırsaklarda istenmeyen mikroorganizmaların çoğalma hızını kontrol ederler ve doğal floranın denge içinde bulunmasını sağlarlar.

Probiyotik bakterilerin önemli özelliklerinden biri de, bağırsak çeperine tutunabilme yeteneğine sahip olmalarıdır. Bu tutunma en önemli ve hatta biyolojik etki gösterebilmeleri için mutlaka olması gereken bir özellik olarak belirtilmiştir. Probiyotik bakteriler, bağırsak çeperine tutunarak patojen mikroorganizmaların tutunmasını engellerler (İnanç vd., 2005). Ayrıca ince ve kalın bağırsaklardaki kötü ve zararlı bakterilerin yerine geçerek, onları kontrol altına alıp, bağışıklık sistemini güçlendirerek birçok hastalığa karşı vücut direncinin artmasına katkıda bulunurlar. Sindirim kanalında sağlıklı bir bakteri dengesi oluşturup, bazı gerekli enzimleri üreterek sindirime katkıda bulunurlar. Laktoz ve protein sindirimini kolaylaştırırlar (Bozdoğan, 2006).

Probiyotikler esas olarak laktik asit bakterileridir. Bunun yanında araştırmalar bazı mayaların da probiyotik özelliğe sahip olduğunu göstermiştir (Oh vd., 1995). Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar ve mayalar **Tablo 2.1**'de gösterilmektedir.

Tablo 2.1 : Probiyotik olarak kullanılan bakteriler (Bozdoğan, 2006)

***Lactobacillus* Türleri**	***Bifidobacterium* Türleri**	***Bacillus* Türleri**	***Pediococcus* Türleri**	***Streptococcus* Türleri**
Lactobacillus bulgaricus	*Bifidobacterium adolescentis*	*Bacillus subtilis*	*Pediococcus cerevisiae*	*Streptococcus cremoris*
Lactobacillus cellebiosus	*Bifidobacterium bifidum*	*Bacillus pumilus*	*Pediococcus acidilactici*	*Streptococcus thermophilus*
Lactobacillus lactis	*Bifidobacterium breve*	*Bacillus lentus*	*Pediococcus pentosaceus*	*Streptococcus intermedius*
Lactobacillus acidophilus	*Bifidobacterium infantis*	*Bacillus licheniformis*		*Streptococcus lactis*
Lactobacillus reuteri	*Bifidobacterium longum*	*Bacillus coagulans*		*Streptococcus diacetilactis*
Lactobacillus brevis	*Bifidobacretium thermophilum*			
Lactobacillus casei				
Lactobacillus curvatus				
Lactobacillus fermentum				
Lactobacillus plantarum				
Lactobacillus johsonli				
Lactobacillus rhamnosus				
Lactobacillus helveticus				
Lactobacillus salivarius				
Lactobacillus gasseri				

***Bacteriodes* Türleri**	***Propionibacterium* Türleri**	***Leuconostoc* Türleri**	**Küfler**	**Mayalar**
Bacteriodes capillus	*Propionibacterium shermanii*	*Leuconostoc mesenteroides*	*Aspergillus niger*	*Saccharomyces cerevisiae*
Bacteriodes suis	*Propionibacterium freudenreichii*		*Aspergillus oryzae*	*Candida torulopsis*
Bacteriodes ruminicola				
Bacteriodes amylophilus				

2.1.2. Probiyotik bakterilerin enzim aktiviteleri

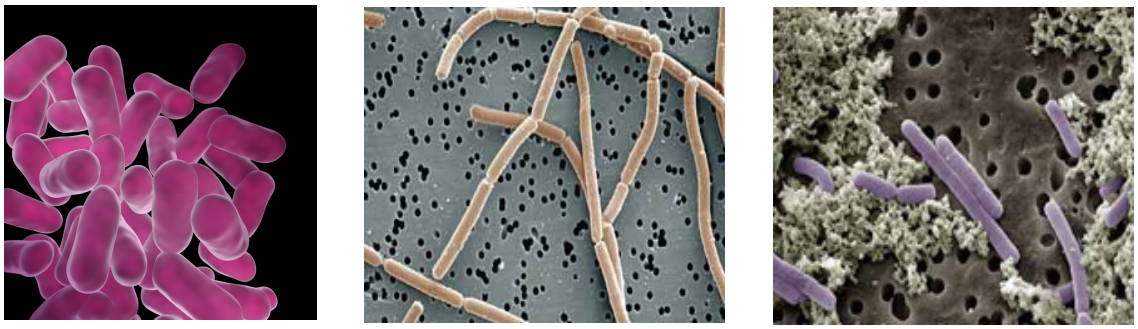
Probiyotik bakteriler pek çok enzim içerirler. Bunlardan bazılarının aktivitelerinin oldukça yüksek olduğu bilinmektedir. Yüksek aktiviteli olduğu belirlenen enzimlerden önemlileri aminopeptidazlar, dipeptidazlar, tripeptidazlar, karboksipeptidazlar, lipazlar, esterazlar, fosfatazlar, peroksidazlar, glukozidazlar, galaktozidazlardır (Shihata ve Shah, 2000). Ayrıca yapılan çalışmalarda probiyotik bakteri içeren süt ve yoğurtlarda mayalanma süresi ile orantılı olarak toplam çözünür fenolik bileşiklerin ve antioksidan maddelerin artış gösterdiği ve buna bağlı olarak bu bileşiklerin metabolizma reaksiyonlarını katalizleyen fenolazlar, polifenolazlar ve antioksidazlar gibi enzimlerin aktivitelerinin de arttığı tespit edilmiştir.

Laktik asit bakterilerinin metabolizmalarında kullandıkları ana substratlar malik asit, sitrik asit ve mayalardan arta kalan heksozlar ve pentozlar gibi şekerlerdir (Davis vd., 1985). Glukoz, fruktoz, ksiloz ve arabinoz şekerleri metabolizma sırasında yükseltgenerek laktik asit, asetik asit, etil alkol ve CO_2'e katabolize olurken, sitrik asit ile asetik asit de karbonil maddelere özellikle tereyağı tadına sahip diasetile dönüşür. Ayrıca laktik asit bakterilerinin tanen, antosiyanin gibi fenol bileşenleri üzerindeki aktiviteleri sonucu şarabın tadı ve rengi istenilen değişikliğe uğrar (Geredeli ve Anlı, 2005).

Probiyotik bakterilerin çok sayıda enziminin aktivitesinin yüksek oluşu veya aktivitelerinin yükseltilebilmesi hem sağlık hem de enzimatik analizlerde kullanılabilirliği bakımından probiyotik bakterilerin endüstriyel önemini arttırmaktadır. Bu nedenle son yıllarda hızlı bir gelişim gösteren analiz yöntemlerinden biri olan biyosensörlerde de enzim kaynağı olarak kullanılmaktadırlar. Bu amaçla probiyotik mikroorganizmaların kullanıldığı bir biyosensöre örnek ise orto-fosfat'ın belirlenmesinde maltoz fosforilaz enzimini içerdiği bilinen *Lactobacillus brevis*'in kullanıldığı bir biyosensördür (Hüwel vd., 1997).

2.1.3. Probiyotik bakterilerin fiziksel özellikleri

Probiyotik bakteriler morfolojik açıdan çok değişken özellik gösterirler. Temelde üç şekil grubu vardır; **a)** Kok şekilli, **b)** Uzun çomak şekilli, **c)** Kısa çomak şekilli. Bu şekillerin mikroskobik görüntüleri **Şekil 2.1**'de gösterilmektedir. Bu üç familyanın fizyolojik özellikleri oldukça benzerdir.



(a) Kok şekilli (*L. acidophilus*) **(b)** Uzun çomak (*L. bulgaricus*) **(c)** Kısa çomak (*L. casei*)

Şekil 2.1 : Bazı probiyotik bakterilerin mikroskobik görüntüleri (www.wikipedia.com)

Ayrıca tüm üyeler; Gram pozitif ve düşük oranda şeker ihtiva eden ortamda pseudokatalaza sahip suşlar da katalaz negatif olmak üzere ikiye ayrılırlar. *Sporolactobacillus inulinus* dışındakiler spor oluşturmayan, fakültatif anaerobik, *Pediococcus* cinsi dışındakiler de yalnız tek düzlemde bölünen ve bazı istisnalar hariç hareketsiz, çubuk veya kok şeklinde bakteriler olarak tanımlanmaktadır (Shape vd., 1966; Şahin, 1990). Fermantasyon yapabilme özelliğine sahip olup asıl fermantasyon ürünü olarak laktik asit üretmektedirler. Katalaz ve sitokromda olduğu gibi Hem grupları içermedikleri halde oksijen varlığında gelişebilen nadir mikroorganizmalardır. Doğal ortamları; süt ve süt ürünleri, işlenmemiş, taze veya çürümüş bitkiler, insan ve hayvanların bağırsak mukozalarıdır (Çon ve Gökalp, 1997).

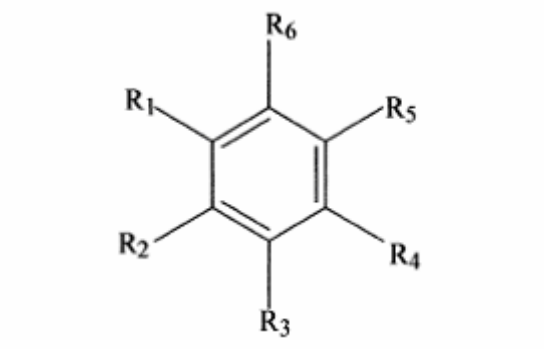
2.1.4. Liyofilize formdaki probiyotik bakterilerin saklama koşulları

Probiyotik preparatlar 22-25 ^{o}C de ve kuru yerde depolanmalıdır ve pH 6-7 arasında olmalıdır. Kuvvetli asidik ve bazik ortamda canlılıklarını kaybederler. Bu yüzden ticari preparatlara asidik maddeler karıştırılmamalıdır. Depolanmaları süresince -5 ^{o}C civarında soğutucuda, kapalı ambalaj içinde tutulmalı ve ancak raf ömürleri boyunca depolanmalıdırlar. Depolanma süresince Demir ve Bakır başta olmak üzere minerallerle etkileşimleri probiyotiklerin canlılığını kısıtlar. Yüksek konsantrasyonlardaki vitaminler ile etkileşimleri de zararlıdır. Bunlardan başka antioksidan ve antifungal maddeler de probiyotiklerin canlılığını olumsuz etkileyen faktörlerdir (Tannock, 1999).

2.2. Fenolik Bileşikler ve Özellikleri

Fenolik bileşikler, en az bir aromatik halka ve bu halkada çok miktarda hidroksil substitüenti bulunduran bileşiklerin tümüne denir. Bitkiler aleminde en yaygın ve en çok bulunan bileşik sınıfıdır. Bitkilerde, çiçek, yaprak, meyve renkleri, bazı bitkisel kokulardan sorumlu olmaları yanında; bitkileri haşere ve mikroorganizma saldırılarına karşı koruma görevleri de vardır. Ayrıca fenolik bileşikler bitkilerde selülozla birlikte destek dokusunu oluşturan lignin ve tannin polimerlerinin temel monomeridir (Havborne, 1973).

Fenolik bileşikler organik kirleticilerin büyük bir grubudurlar. Bunlar patlayıcı madde, farmasötik, plastik, kâğıt, boya, ilaç, pestisit ve antioksidanların üretimi gibi birçok endüstriyel proseste kullanılırlar. Bazı basit fenolik bileşiklerin yapıları **Şekil 2.2'** de gösterilmektedir.



Kateşol, R_1: OH, R_2: OH, R_3: H, R_4: H, R_5: H, R_6: H

Rezorsin, R_1: OH, R_2: H, R_3: OH, R_4: H, R_5: H, R_6: H

Hidrokinon, R_1: OH, R_2: H, R_3: H, R_4: OH, R_5: H, R_6: H

Kaffeik asit, R_1: H, R_2: OH, R_3: OH, R_4: H, R_5: H, R_6: CHCHCOOH

Ferulik asit, R_1: H, R_2: OH, R_3: OCH_3, R_4: H, R_5: H, R_6: CHCHCOOH

p-Kumarik asit, R_1: H, R_2: H, R_3: OH, R_4: H, R_5: H, R_6: CHCHCOOH

Klorojenik asit, R_1: H, R_2: OH, R_3: OH, R_4: H, R_5: H, R_6: $CHCHCOOC_6H_7COOH$

Fenol, R_1: OH, R_2: H, R_3: H, R_4: H, R_5: H, R_6: H

o-Krezol, R_1: H, R_2: OH, R_3: CH_3, R_4: H, R_5: H, R_6: H

Tirozin, R_1: H, R_2: H, R_3: OH, R_4: H, R_5: H, R_6: CH_2CHNH_2COOH

Dihidroksifenilalanin, R_1: H, R_2: H, R_3: OH, R_4: OH, R_5: H, R_6: CH_2CHNH_2COOH

Anisol, R_1: H, R_2: H, R_3: OCH_3, R_4: H, R_5: H, R_6: H

Gallat, R_1: COOH, R_2: H, R_3: OH, R_4: OH, R_5: OH, R_6: H

Propil gallat, R_1: COOH, R_2: H, R_3: OH, R_4: OH, R_5: OH, R_6: $C_3H_6O_4$

Bütilenhidroksianisol, R_1: OH, R_2: $C(CH_3)_3$, R_3: H, R_4: CH_3, R_5: H, R_6: $C(CH_3)_3$

Vanilin, R_1: H, R_2: OH, R_3: OCH_3, R_4: H, R_5: H, R_6: CHO

3,4-dihidroksibenzaldehit, R_1: H, R_2: OH, R_3: OH, R_4: H, R_5: H, R_6: CHO

Karvacrol, R_1: CH_3, R_2: OH, R_3: H, R_4: $CH(CH_3)_2$, R_5: H, R_6: H

Timol, R_1: CH_3, R_2: H, R_3: OH, R_4: $CH(CH_3)_2$, R_5: H, R_6: H

Şyringol, R_1: OCH_3, R_2: OH, R_3: OCH_3, R_4: H, R_5: H, R_6: H

o-Hidroksibenzoik asit, R_1: COOH, R_2: OH, R_3: H, R_4: H, R_5: H, R_6: H

Alilfenol, R_1: OH, R_2: H, R_3: H, R_4: CH_2CHCH_2, R_5: H, R_6: H

Şekil 2.2: Bazı basit fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları

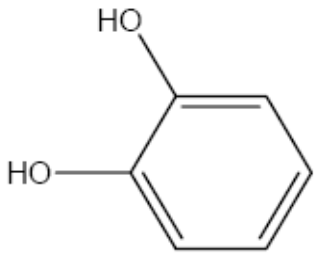
2.3. Fenolik Bileşiklerin Tayin Edilmelerinin Önemi

Dünyada ve ülkemizde 1980'li yıllardan sonra hızlı bir endüstriyel değişim meydana gelmiştir. Bu değişimle birlikte öncelik üretime verilmiş, ancak çevreye verilen atıkların çevre ve canlı hayatı üzerine etkileri pek fazla düşünülmemiştir. Çevreye atılan endüstriyel atıkların artmasıyla birlikte birçok atık türünde doygunluğa ulaşılmış ve zararları görülmeye başlanmıştır. Bu atıklardan en önemlilerinden biriside fenol ve fenol türevleridir. Fenol bileşikleri ve homologlarının çoğu zehirli maddelerdir. Fenolik bileşiklerin tayin edilmeleri bu nedenle önem kazanmıştır.

Önemli bir endüstriyel atık olan fenolün dünyadaki ve ülkemizdeki kullanım alanlarından en önemlisi fenolik reçine üretimidir. Fenolik reçineler, kâğıt endüstrisi, kauçuk işletme endüstrisi ile yalıtım ve yüksek sürtünmeye dayanıklı malzeme üretiminde kullanılmaktadır. Bunun dışında bazı fenolik bileşikler ilaç endüstrisinde de kullanılmaktadır (Sokol, 1998).

Doğada 8.000'e yakın fenolik bileşik bilinmektedir. Bunlardan bazıları fenol, rezorsinol, pirogallol, orsinol, kateşol gibi basit fenoller, gallik asit, şiringik asit gibi hidroksi benzoik asitler, flavonoidler ve diğer komplike fenol ürünleridir. Bu kadar geniş bir sınıfa sahip olan fenolik bileşiklerin tayin edilmelerinde bir fenolik bileşik standart olarak kullanılmaktadır. Biyosensör yöntemi başta olmak üzere fenolik bileşiklerin tayin edilmelerinde tayinler genelde kateşol standardı kullanılarak yapılır (Portaccio vd., 2006).

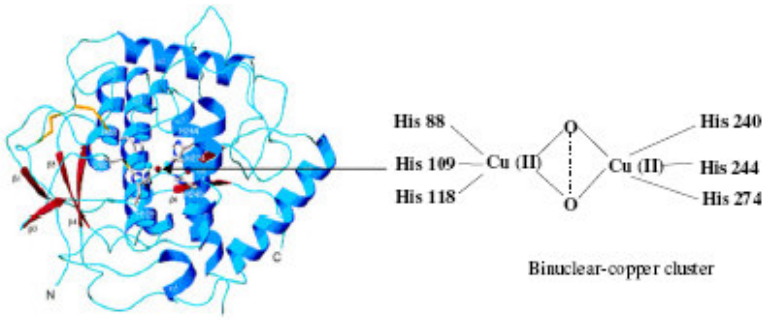
Kateşol ($C_6H_6O_2$; MW: 110,11); bitkilerde doğal olarak bulunan doğal bir fenolik bileşiktir. Gerek kimya endüstrisi gerekse medikal açıdan geniş bir yelpazede kullanım alanı bulmuştur. Deri ve kürk boyamada, kozmetikte parfümlerde ve saç boyalarında, fotoğrafçılıkta geniş bir kullanım alanına sahiptir. Ayrıca pek çok farmosötiğin aktif bileşeni olmakla birlikte önemli antioksidan maddedir (Screeening Assesment for catechol; 2008).



Kateşol

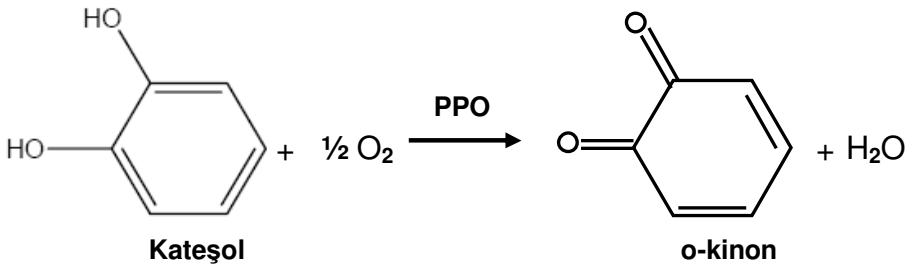
Biyosensör ile tayin yöntemlerinde prensip, tayin edilecek madde yani substratın etkileşebileceği bir enzimle dönüşüme uğratılması sonucu oluşan değişimlerin ölçülmesidir. Biyosensör ile fenolik bileşiklerin tayin edilmelerinde enzim olarak, substrat olan fenolik bileşiği moleküler oksijeni kullanarak dönüşüme uğratan **polifenoloksidazlar** kullanılmaktadır.

Polifenoloksidazlar, oksidoredüktaz sınıfı enzimlerdir. Kofaktör olarak **Şekil 2.3**'te görüldüğü gibi iki adet kompleksleşmiş Cu^{+2} içerirler. Polifenol oksidazlar dışında tirozinaz, fenol oksidaz, kateşolaz olarak da bilinirler. Bu enzimler canlılarda bakterilerden memelilere kadar uzanan geniş bir skalada dağılım gösterirler (Duran vd.; 2002).



Şekil 2.3 : Polifenol oksidaz enziminin yapısı

Polifenol oksidaz enzimi kateşolün **Şekil 2.4**'te gösterilen ortokinon'a yükseltgenme reaksiyonunu katalizler. Biyosensör temelli tayin yöntemlerinde de bu reaksiyon esas alınarak reaksiyon ortamındaki çözünmüş oksijen tüketiminin neden olduğu fiziksel değişimler ölçülmektedir.



Şekil 2.4 : Kateşolün PPO enzimi ile verdiği reaksiyon

2.3.1. Atık sularda tayin edilmelerinin önemi

Fenolik bileşikler; deri, boya sanayileri gibi birçok farklı endüstri tarafından kullanılan ve bu endüstrilerin atık sularıyla çevreye salınması sonucunda çevre kirliliğine yol açan kimyasallardır. Kirli ortamla temas halinde olan hayvan ve insan derisinden, mukoza membranından kolayca emilerek karaciğer, akciğer, böbrek olmak üzere birçok organ ve dokuda toksik etki yaratmaktadır. Bundan dolayı, bazı fenolik bileşiklerin sularda düşük konsantrasyon seviyelerinde bulunması bile canlılar için risk taşımaktadır. Fenol içeren içme suları klorlandığında zehirli poliklorlu fenollere dönüşürler.

Dolayısıyla çevrede yarattıkları istenmeyen toksik etkiler nedeniyle atık sularda, yeraltı sularında fenolik bileşiklerin miktarlarının belirlenmesi insan ve çevre sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır.

2.3.2. Süt ve süt ürünlerinde tayin edilmelerinin önemi

Bazı fenolik bileşikler; yukarıda belirtilen toksik etkileri yanında antioksidan, protein stabilizatörü, doğal pigment gibi yararlı etkilerinden dolayı farmosötik endüstrisinde kullanılmaktadırlar. Örnek olarak, parasetamol (4-asetamidofenol) fenolik bileşiği ağrı kesici özelliğinden dolayı birçok ilacın formülasyonunda vardır. Ayrıca askorbik asit gibi bazı fenolik bileşikler, antioksidan ve vitamin olarak etkilidirler (Gutes vd., 2005). Bu nedenle fenolik bileşiklerce zengin bitkisel ağırlıklı beslenmede, fenoliklerin radikal oluşumunu azaltmalarından dolayı her türlü kanserleşme riskini azaltarak sağlık üzerine olumlu etki yaptıkları açıklanmıştır (Sağıroğlu, 2003).

Fenolik bileşikler, sahip oldukları fenolik gruplar ve aril halkalarından dolayı son derece fonksiyoneldirler. Üretim ve depolama süresince enzimatik reaksiyonları kontrol etmek, bakteriyel büyümeyi ve oksidasyonu önlemek, gıdaların besinsel değerini arttırmak için yiyecek ve içeceklere belirli konsantrasyonlarda

eklenmektedirler. Fenolik bileşik eklenmiş besinlerin insana faydasını araştırmak için yapılan çalışmalarda fenolik bileşik içeren besinlerin kullanılmasıyla insanda düşük yoğunluklu lipid (LDL)'nin oksidasyonunun engellendiği ve bu bileşiklerin antikarsinojenik, antimutojenik ve antioksidatif özellikte oldukları belirlenmiştir. Bu amaçla fenolik bileşik eklenen besinlerden bir tanesi de süt ve süt ürünleridir (O'Connell ve Fox, 2001).

Süt içerdiği önemli proteinler, vitaminler ve minerallerle insan sağlığı için çok önemli besin kaynaklarımızdandır. İnsanlara sağladığı önemli besin maddelerini içermesine rağmen süt ve süt ürünleri çeşitli mikroorganizmalar içinde uygun üreme ve büyüme ortamı sağlamaktadır. Bu yüzden herhangi bir sterilizasyon uygulamasına maruz bırakılmadan içilen çiğ sütler insan sağlığı açısından tehlike taşımaktadır. Bu yüzden pratikte sütler ya kaynatılarak kullanılmakta ya da pastörize edilmektedir. Pastörizasyon işlemi faydalı ancak yüksek sıcaklıklara kadar ısıtılan sütün besin değerlerinin azalması söz konusudur. Oysa fenolik bileşik içeren sütlerin ısı kararlılığının arttığı besin değerini koruduğu yapılan araştırmalarla gösterilmiştir. Bu nedenle sütte belirli konsantrasyonda fenolik bileşiklerin bulunması istenmektedir. Fenolik bileşiklerin bulundukları ortamlarda miktarlarının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır (O'Connell ve Fox, 1999).

2.4. Fenolik Bileşiklerin Tayin Yöntemleri

Çevrede yarattıkları toksik etki ve meyve suları, şarap, süt, yoğurt gibi gıdalarda gıda kalitesinin ve güvenliğinin kontrolü nedeniyle fenolik bileşiklerin bulundukları ortamda miktarlarının belirlenmesi gereksinimi sebebiyle kullanılan standart metodlar şunlardır:

1. Kromatografik yöntemler (HPLC, GC, CLC)
2. Spektrofotometrik yöntemler
3. Elektroforez
4. Titrasyon
5. Diğer teknikler

Bu metotlar örneklerdeki fenolik bileşik miktarlarının kolay bir şekilde ve sürekli izlenmesine izin vermezler. Çünkü bunlar pahalı ve yavaştırlar, iyi yetişmiş operatörlere ihtiyaç duymaktadırlar ve bununla birlikte bazı durumlarda analizin süresini uzatan ön işlemler ya da ekstraksiyon gerektirmektedirler (Mello ve Kubota, 2002).

Son yıllarda geliştirilen ölçüm tekniklerinden en önemlisi olan biyosensörler diğer geleneksel tekniklere göre daha fazla avantaj sağlamaktadırlar. Biyosensörlerde kullanılan biyolojik algılayıcı sistemin seçiciliği, hassasiyeti; örnek ön hazırlığına ve fazla miktarda örneğe bağlı kalmaksızın kompleks karışımlarda bile gerçek zamanlı analiz için çok yüksek spesifiklikte cihazların geliştirilmesine elverişlidir. Biyosensörler ayrıca çok yüksek hassasiyete, ölçüm hızına, basit kullanıma sahip ve çoğaltılabilir analitik cihazlardır. Bu nedenle son yıllarda örnek analizi için biyosensörler tercih edilmeye başlanmıştır.

Bu tez çalışmasında geliştirilen biyosensörde biyomateryal olarak canlı probiyotik bakteri kullanılması, biyosensörlerle ölçümün avantajlarına ek katkılar sağlamaktadır.

2.5. Biyosensör Temelli Yöntemler

2.5.1. Biyosensörlere genel bakış

Canlılar teknologların hayal bile edemeyeceği duyarlık performansı gösterirler. Örneğin bazı köpeklerin koku almaları insanlardan 100.000 kat daha duyarlıdır. Yılan

balıkları tonlarca su içerisine ilave edilen birkaç damla yabancı maddeyi derhal algılarlar. Kelebekler eşlerinin yaydığı birkaç molekülü bile hissederler. Algler ise zehirli maddelere karşı çok duyarlıdırlar (Meral, 2006).

Biyosensörlerin tarihi 50'li yılların ortalarında L.C. Clark'ın Cincinnati Hastanesi'nde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın O_2 miktarını bir elektrod ile izlemesiyle başlar. 1962 yılında Clark ve Lyons Glukozoksidaz (GOD) enzimini O_2 elektrodu ile kombine ederek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başardılar. Böylece yeni bir analitik sistem oluştu. Bu sistem bir yandan biyolojik sistemin yüksek spesifisikliğini (enzim) diğer taraftan ise fiziksel sistemin (elektrod) tayin duyarlılığını birleştirmiş ve geniş spektrumlu bir uygulama olanağı bulmuştur.

Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanabilirken sisteme biyomateryalin de katılması ile diğer birçok organik ve biyolojik maddenin tayini mümkündür. Böylece hazırlanan analiz sistemlerine **BİYOSENSÖRLER** adı verilir (Aykut ve Temiz, 2006).

2.5.2. Biyosensörler ve bileşenleri

Biyosensörler (biyoalgılayıcılar), bünyesinde biyolojik bir materyali bulunan ve bir fizikokimyasal çeviriciyle birleştirilmiş analitik cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Bir biyosensörün amacı, bir veya bir grup analitin (analiz edilecek madde) miktarıyla orantılı olarak sürekli sayısal elektrik sinyali üretmektir.

Biyosensör sistemleri üç temel bileşenden oluşmaktadır. Bunlar **Şekil 2.5**'de verildiği gibi; seçici tanıma mekanizmasına sahip **"biyoaktif tabaka / biyoajan"**, bu biyoaktif tabakanın incelenen maddeyle etkileşmesi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürebilen **"sinyal iletici sistem"** ve bu sinyalleri ölçebilen bir **"kaydedici"** yani bir ölçüm cihazından oluşmaktadır (Meral vd., 2006).



Şekil 2.5 : Biyosensörün genel şematik gösterimi

2.5.2.1. Biyoajanlar (Biyoaktif tabaka)

Biyoajan bir analitin tanınmasında biyosensörün biyolojik hassasiyete sahip kısmıdır. Biyosensörün hassasiyeti ve seçiciliğinde etkilidir. Bu reseptörler tek bir substratı bağlayacak ve diğer substratlara bağlanmayacak özellikte olmalıdır; temel olarak biyoajanlar; biyokatalitik ve biyoaffinite olmak üzere 2 grup altında incelenirler (Mehrvar vd., 2000).

Biyoaffinite ajanları olan antikorlar, hormon almaçları, DNA, lektin gibi moleküller antijenlerin, hormonların, DNA parçacıklarının ve glikoproteinlerin moleküler tanımlanmasında kullanılır. Kompleks oluşumu sonucunda, tabaka kalınlığı, kırınım indisi, ışık emilmesi ve elektriksel yük gibi fizikokimyasal parametrelerin değişimine neden olurlar.

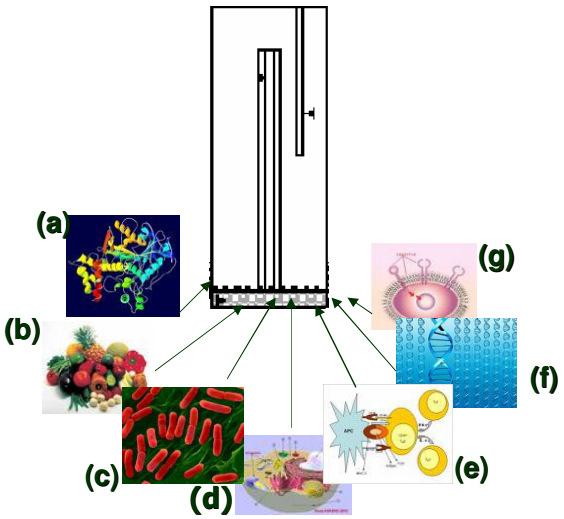
Biyokatalitik ajanlar, analit üzerinde moleküler değişime neden olmakta ve bu dönüşüm sonucu ortamda azalan ya da artan madde miktarı takip edilerek sonuca gidilmektedir. Bu amaçla saf enzim ya da koenzim sistemleri, mikroorganizmalar ve bitkisel ya da hayvansal doku parçaları kullanılmaktadır. Bu nedenle aslında

biyosensörleri de çalışma prensiplerine göre **Tablo 2.2**'deki gibi biyoaffinite sensörleri ve biyokatalitik sensörler olmak üzere iki grupta incelemek mümkündür.

Tablo 2.2 : Biyoaffinite ve Biyokatalitik ajanlar ve bunlarla tayin edilebilen analitler

BİYOAFFİNİTE SENSÖRLER		**BİYOKATALİTİK SENSÖRLER**	
RESEPTÖR	**ANALİT**	**RESEPTÖR**	**ANALİT**
Enzim	**Substrat, İnhibitör**	**Enzim** **Mikroorganizma** **Organel** **Doku kesiti**	**Substrat** **Kofaktör** **Aktivatör** **İnhibitör** **Enzim**
Apoenzim	**Prostetik grup**		
Antikor	**Antigen**		
Reseptör	**Hormon**		
Lektin	**Glikoproteinler** **Sakkaritler** **Protein**		

Günümüzde bir biyosensör geliştirilmesi için biyoajan olarak kullanılabilecek enzim kaynakları **Şekil 2.6**'da gösterilmektedir.

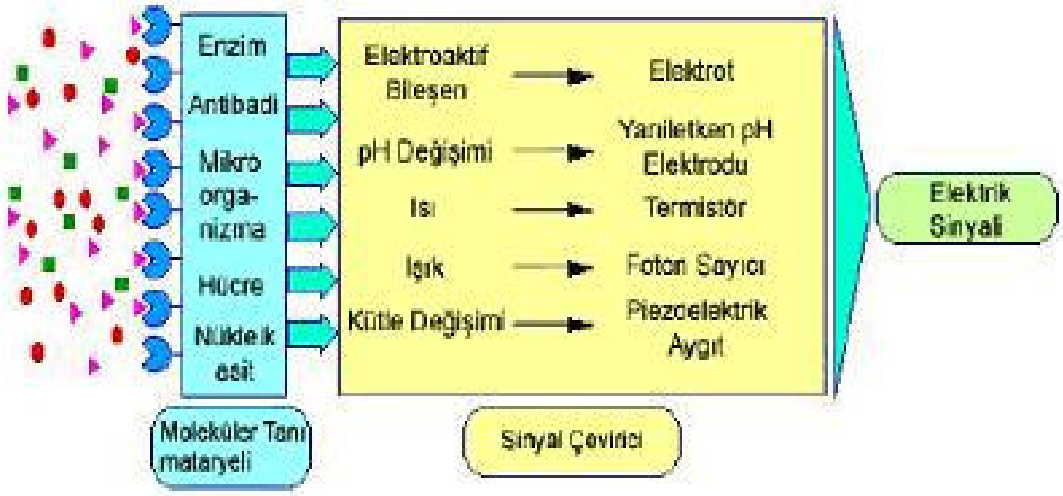


(a) Enzim **(b)** Doku kesitleri **(c)** Mikroorganizmalar **(d)** Organeller
(e) İmmuno ajanlar **(f)** Nükleik asitler **(g)** Reseptör molekülleri

Şekil 2.6 : Biyoajan olarak kullanılan enzim kaynakları

2.5.2.2. Sinyal ileticiler (Transduserler)

Biyolojik ve biyokimyasal sinyalleri veya cevabı belirlenebilir sinyale dönüştürebilen sistemlere transduser denir (Gürsoy vd., 2002). Bir substrat için komponentin aktivitesi O_2 tüketimiyle, H_2O_2 oluşumuyla, NADH konsantrasyonundaki değişimle, floresans, absorbsiyon, pH değişimiyle, kondüktivite, sıcaklık ya da kütledeki değişimle izlenebilmektedir (Luong vd., 1997; Mello ve Kubota, 2002). Sinyal ileticilerde gerçekleşen değişimler ve bu değişimleri ölçebilecek ölçüm cihazları **Şekil 2.7** 'de gösterilmektedir.



Şekil 2.7 : Sinyal ileticilerde gerçekleşen değişimler ve ölçüm cihazları (Aykut ve Temiz, 2006)

Transduserler temelde dört grup altında toplanırlar (Aykut ve Temiz, 2006);

1- Elektrokimyasal transduserler

Amperometrik

Potansiyometrik

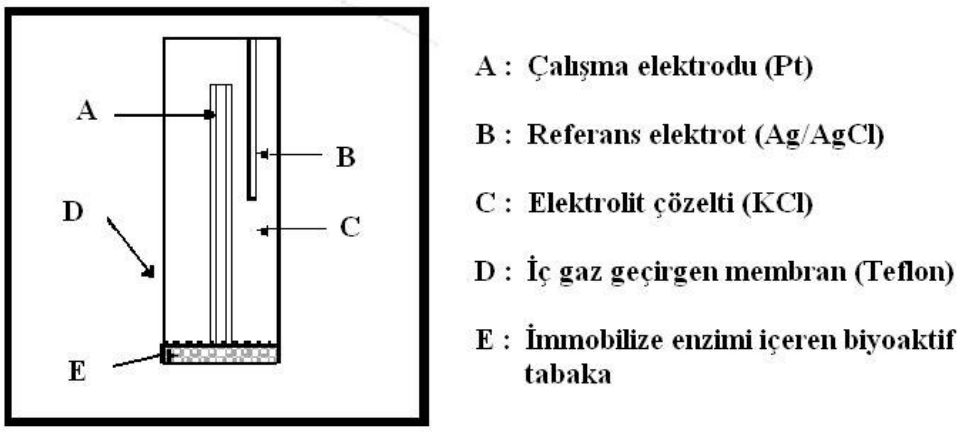
Kondüktometrik

2- Optik transduserler

3- Akustik transduserler

4- Termal transduserler

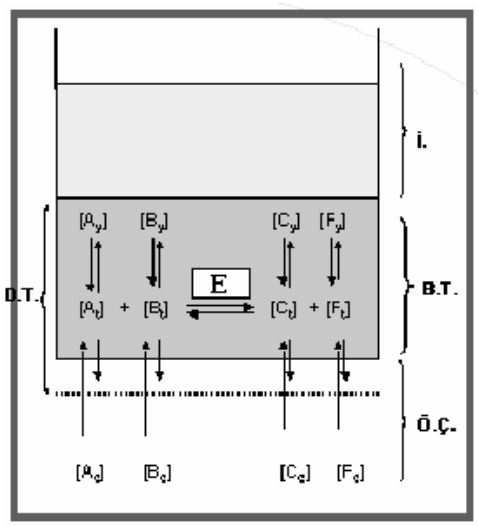
Bu tez çalışmasında elektrokimyasal transduserlerden biri olan Amperometrik temele dayalı Çözünmüş oksijen (DO) elektrot kullanıldı. Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi **Şekil 2.8**'de gösterilmektedir.



Şekil 2.8 : Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi (sci.ege.edu.tr/~eubio/yaz_okulu/biosensor.htm)

Amperometrik temele dayalı çözünmüş oksijen elektrotları, Au (Katod), Ag/AgCl (Anod), yarı doygun KCl (Elektrolit) ve oksijene duyarlı teflon bir membrandan oluşmuştur (Dinçkaya ve Telefoncu, 1993). Membran; gaz geçirgenliğinin yanı sıra sensörün dış çevreden korunmasına da olanak sağlar. Bu koruma sayesinde reaksiyon ortamında olabilecek bir takım safsızlıklardan kaynaklanması muhtemel girişim etkileri de minimize edilmiş olmaktadır (Akyılmaz ve Dinçkaya, 2000). İletici sistem olarak bir amperometrik sensörün kullanılması durumunda ürünlerden sinyal oluşturan tür elektrod yüzeyinde tüketilmektedir (Dinçkaya, 1999).

Bir biyosensörün biyoaktif tabakasındaki reaksiyonlar oldukça kompleks bir kinetiğe sahiptirler. Bu durum **Şekil 2.9**'da özetlenmiştir.



A : Substrat
B : Kosubstrat veya koenzim
C ve F : Ürünler
ç : Ölçüm çözeltisi içindeki
t : Biyoaktif tabakadaki
y : Elektrot yüzeyindeki konsantrasyonlar
D.T : Difüzyon tabakası
B.T : Biyoaktif tabaka
i : İletici

Şekil 2.9 : Biyosensörün biyoaktif tabakasındaki reaksiyonların şematik gösterimi (sci.ege.edu.tr/~eubio/yaz_okulu/biosensor.htm)

2.5.3. Biyoaktif tabakanın elektrot yüzeyine immobilizasyonu

Enzimler, dokular, mikroorganizmalar, hücre reseptörleri, antibadiler, nükleik asitler ya da tüm hücre (bakteri, fungus, hayvan ya da bitki); analitlerin tayini için kullanılan biyoajanlardır.

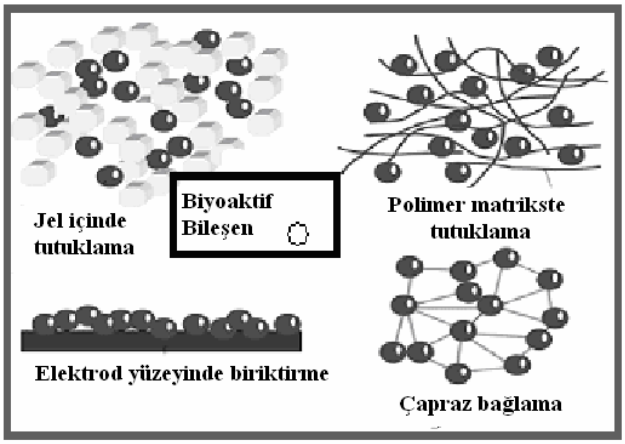
Genel olarak biyoajanlar uygun bir şekilde immobilizasyonla transdusere bağlanır. İmmobilizasyon metodu immobilize edilecek biyoajanın yapısına göre belirlenir. Kullanılan transdüksiyon elementi ve analitin fiziksel durumu da seçilecek immobilizasyon metodu için önemli faktörlerdir. Genel olarak 4 yaygın immobilizasyon metodu kullanılmaktadır **(Şekil 2.10)**. Bunlar:

1-Adsorbsiyon: Selüloz, silikajel, cam, hidroksiapatit, ve kollagen; enzimleri adsorplamak için kullanılan başlıca yapılardır. Hidrojen bağları, multiple tuz köprüleri, Van der walls bağları ve elektron transisyon kompleksleri oluşumu sayesinde bağlanma gerçekleşir. Kararlılığı az olduğundan biyosensörlerde pek tercih edilmeyen bir immobilizasyon metodudur.

2-Tutuklama: Biyomolekülü içeren çözelti içinde polimerik jel hazırlandığı zaman jelin donmasıyla biyomolekül jel matriks içinde tutuklanmış olur. Poliakrilamid, nişasta, naylon ve siliastik jel biyomoleküllerin tutuklanması için biyosensörlerde kullanılabilir.

3-Çapraz bağlama: Glutaraldehit, hekzametilen di-izosiyanat, 1,5-difloro, 2,4 nitrobenzen ve bis-diazobenzidin-2,2'-disülfonik asit gibi bifonksiyonel ve multifonksiyonel reaktiflerin kullanılmasıyla biyomoleküllerin intermoleküler çapraz bağlanması sağlanır. Bu reaktifler, katı desteklere biyomolekülleri bağlayabilirler. Bu nedenle de biyosensörlerde sık kullanılan immobilizasyon yöntemlerinden biridir.

4-Kovalent bağlama: Enzimde katalitik aktivite için gerekli olmayan fonksiyonel grupların bağlanması yoluyla gerçekleştirilir. Genellikle proteinlerin aminoasit yan zincirlerinde bulunan amino, karboksil, imidazol, tiyol, hidroksil gibi nükleofilik fonksiyonel gruplarla kovalent bağlama yapılır (Sharma vd., 2003). Bu yöntemin riski kovalent bağlanmaya bazı durumlarda aktif bölge gruplarının katılmasıdır.



Şekil 2.10 : Biyosensörlerin biyoaktif tabakalarında biyoajanların immobilizasyonunda kullanılan genel teknikler (sci.ege.edu.tr/~eubio/yaz_okulu/biosensor.htm)

2.5.4. Enzim biyosensörleri

Biyosensör teknolojisinin tarihsel geçmişine bakıldığında bu alandaki ilk çalışmaların enzim sensörleriyle başladığı görülmektedir. 1962'de Clark ve Lyons ve 1967'de Updike ve Hick tarafından rapor edilen glukoz tayinine yönelik "glukoz oksidaz enzim elektrodları" bu konudaki ilk örnekleri oluşturmaktadır. Biyosensör hazırlamada enzimleri kullanmak; spesifiklik bakımından avantajlı ancak saf enzimin pahalı oluşuda dezavantajlıdır.

Temel bilimlerdeki ilerlemeler enzimlerin yanı sıra diğer biyolojik materyallerin fonksiyonlarının da çok daha ayrıntılı bir şekilde ortaya çıkarılmasına imkân vermiştir. Bu ilerlemelerin doğal bir sonucu olarak farklı biyolojik materyallerin ve iletim sistemlerinin kombinasyonuyla çok çeşitli biyosensörler geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam edilmektedir. Bugünkü sonuca bakıldığında, hangi temel iletim sistemi söz konusu olursa olsun pratik ve ticari uygulamalarda enzim elektrotlarının büyük bir üstünlüğü göze çarpmaktadır. Ancak elektrokimyasal esaslı olanların tartışılmaz bir ağırlığı söz konusudur. Bu sonuçtaki canlı sistemlerle ilgili en büyük etmen hemen hemen her türlü maddenin doğrudan veya dolaylı olarak analizinde kullanılabilecek binlerce enzimin varlığıdır.

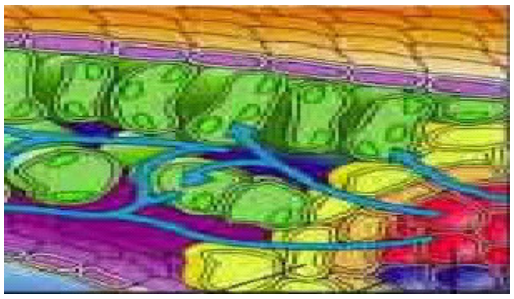
Bilinen enzimlerin yanı sıra bilinmeyenlerin potansiyel varlığı, piyasada yüzlerce ticari enzim preparatının bulunabilirliği ve bu sayının her geçen gün yükselmesi enzim sensörlerinin tartışılmaz üstünlüğünün devam edeceğinin bir göstergesidir (Telefoncu, 1999a; Dinçkaya, 1999).

2.5.5. Doku biyosensörleri

1981' de ilk defa bitki dokusu temelli elektrod hazırlanmasından itibaren, birçok bitki dokusu temelli biyosensör geliştirilmiştir. Bitki doku materyalleri kullanılarak oluşturulan biyosensörler, izole enzimlerle oluşturulan biyosensörlere bir alternatiftir

(Sidwell vd., 1986). Hayvansal ve bitkisel dokuların ve organellerin kimi enzimlerce özellikle zengin olduğu bilinmektedir. İşte bu enzimlerin izole edilmiş preparatları yerine doğrudan yoğun bulundukları bu kaynaklar biyosensör hazırlanmasında kullanılır (Telefoncu, 1999a).





(A) **(B)**

Şekil 2.11 : Bitki dokuları **(A),** Bitki dokusu kesiti **(B)**

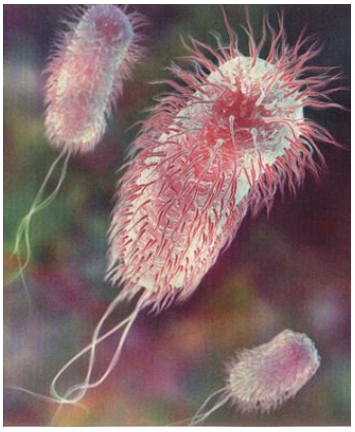
Doku biyosensörlerinde enzimin saflaştırılması gerekliliği ortadan kalkar, ayrıca doku biyosensörleri bazı enzimler için doğal ortamda artan kararlılık ve düşük maliyet gibi avantajlara sahiptirler (Macholan, 1987).

Doku kesitleri kullanıldığında biyosensörün cevap süresi genellikle uzundur. Bu süreyi kısaltmak için direkt doku kesiti yerine doku ezilerek veya iyice homojenize edilerek hazırlanır. Böylece difüzyon problemi de azaltılmış olur (Telefoncu, 1999).

2.5.6. Mikrobiyal biyosensörler

Saflaştırılmış enzimler yüksek spesifik aktivitede olmalarına rağmen pahalı ve kararsız olmaları biyosensör alanında uygulamalarını sınırlandırmaktadır. Mikroorganizmalar ise biyosensörlerin biyoaktif tabaka materyalleri olarak pek çok avantaja sahiptirler.

Bugün **Şekil 2.12**'de görülen bir *Esherichia coli* hücresinde bile 3000'den fazla enzim bulunduğu kabul edilmektedir. Gelişmiş hücrelerdeki enzim sayısının çok daha fazla olacağı açıktır. Saf enzimlerle gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonları elbette bu enzimi içeren hücre ile de gerçekleştirilebilir. Bunun için ana koşul hedeflenen biyotransformasyon reaksiyonunun hücrenin içerdiği diğer enzimler tarafından etkilenmemesidir.



Şekil 2.12 : *E.coli* Bakterisi

Şimdiye kadar bilinen enzimlerin % 90'ından fazlası hücre içidir. Bu bakımdan, hücre içi enzimlerin kaynağı olarak bütün hücrelerin kullanımı, çeşitli endüstriyel işlemlerde saflaştırılmış enzimlere daha iyi bir alternatif olarak gösterilmektedir. Biyosensörlerde enzim kaynağı olarak mikroorganizmaların kullanımı enzim saflaştırılmasının uzun ve pahalı işlemlerini gerektirmez, enzimler doğal çevresinden ayrılmadığından daha uzun süre aktivitelerini kaybetmeden durabilir ve ağır metaller gibi dıştan gelen toksiklerin inaktivasyonundan korunurlar. Ancak mikroorganizmaların bütün hücreler olarak kullanıldığı biyosensörler, enzim esaslı biyosensörlerle karşılaştırıldığında daha yavaş biyosensör cevabı vermektedir. Bunun sebebi hücre çeperi boyunca analitin ve ürünlerin difüzyonudur. Analitlerin hücre zarından difüzyonunu önleme yollarından biri geçirgen hücreler kullanmaktır. Bu hücreler, donma ve erime gibi fiziksel, organik çözücüler ve temizleyiciler ile kimyasal ve lizozim ya da yün kreatini ile enzimatik yollarla geçirgen hale getirilebilirler. En yaygın yöntem, toluen, kloroform, etanol ve bütanol gibi organik çözücüler veya Na-

deoksikolat, digitonin gibi yüzey aktif maddeler kullanarak kimyasal yolla hücreleri geçirgen hale getirmektir. Bu gibi kimyasal muameleler, hücre membranlarından lipidlerin bazılarının uzaklaştırılmasıyla çok küçük porlara yol açar, hücrenin iç kısmındaki enzimler gibi makromoleküller bileşiklerin önemlilerini tutarken hücre membranındaki küçük moleküller analitlerin serbest difüzyonuna izin verir. Ancak bu yollarla hücre zarının daha geçirgen hale getirilmesi hücreye zarar verebilirler ama yinede hücre içi enzimlerin kaynağı olarak kullanılabilirler (D'Souza, 2001).

Mikrobiyal biyosensörlerde ölçümün esası, mikroorganizmaların ölçümü yapılacak olan analiti bir karbon kaynağı olarak enzimleriyle metabolize ederek solunum aktivitesinin ölçülmesi esasına dayanır. Bu nedenle çözünmüş oksijen (DO) elektrodu mikrobiyal sensörler için en yaygın transdüserleridir. Bunun dışında CO_2 elektrodu, NH_3 elektrodu, cam elektrod ve termistör de kullanılmaktadır.

Mikrobiyal biyosensörlerin birçok uygulama alanı vardır ama en yaygın olarak gıda ve çevre analizlerinde kullanılırlar (Telefoncu, 1999a).

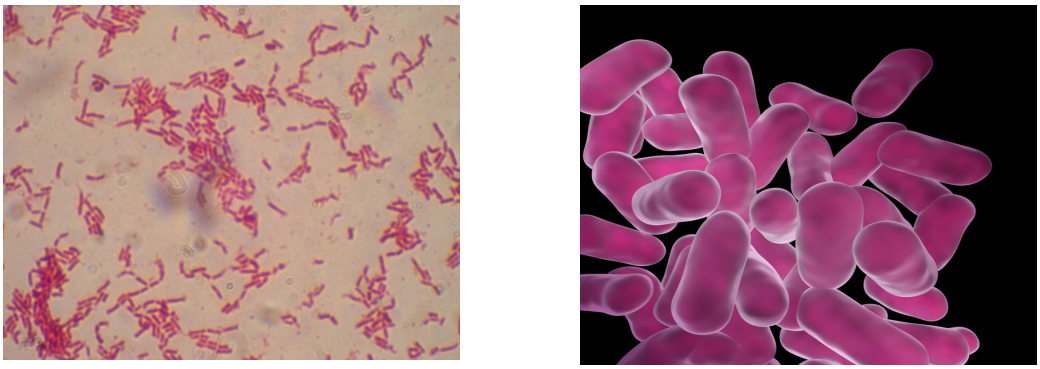
2.6. Tezde Kullanılan Biyomateryallere Genel Bakış

Bu bölümde önce biyosensörde materyal olarak kullanılan temel probiyotik bakteri *L. acidophilus* ve az miktardaki yardımcı bakteriler *L. bulgaricus* ve *S.thermophilus* bakterileri hakkında bilgi verildi. Sonra immobilizasyonda kullanılan jelatin ve glutaraldehid hakkında açıklamalar yapıldı.

2.6.1. Lactobacillus acidophilus

Bilinen en yararlı probiyotik bakterilerden biri olup, ince bağırsakta sağlıklı ve dengeli bir mikroorganizma popülasyonu için gereklidir. Probiyotik amaçlı en sık

kullanılan mikroorganizmadır. Ticari olarak *L. acidophilus*lu yoğurt üretiminde genelde bu bakteri ile birlikte *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* bakterileri de kullanılır. **Şekil 2.13**'te tezde kullanılan liyofilize formdan saflaştırılmış *L. acidophilus*'un mikroskopla çekilmiş görüntüleri verildi.



Şekil 2.13 : *Lactobacillus acidophilus L. m*ikroskobik görüntüleri

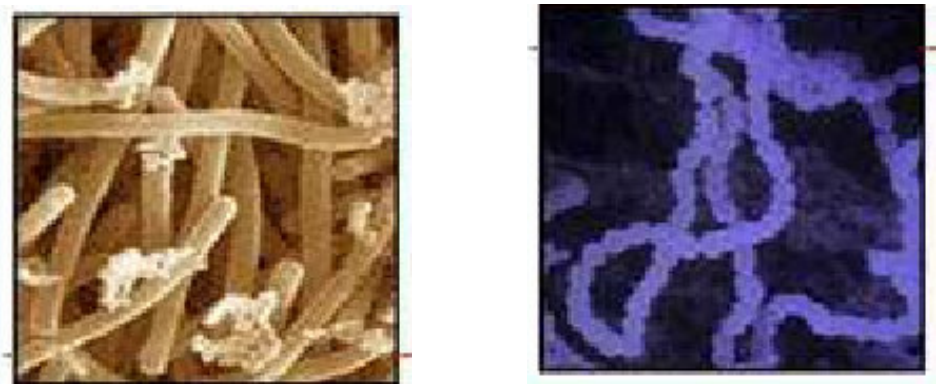
Lactobacillus acidophilus ismini, süt anlamına gelen lacto'dan, şekli gibi çubuk anlamına gelen bacillus'tan ve asit seven anlamına gelen acidophilus'tan alır. Asidik çevrelerde (pH 4-5 veya daha düşük pH'larda) ilgili diğer bakterilerden daha çok gelişir. *L. acidophilus*'un üreme sıcaklığı 35 – 38^{0}C 'dir. Süt şekeri laktozun sindirimini kolaylaştırır, vitamin ve enzimlerin üretimini arttırıcı etkiye sahiptir. Laktik asit üreterek patojen bakterilerin faaliyetlerini baskı altına alır, C*andida* gibi mayaların gelişimini kontrol altına alır. Birçok bakteri gibi, *L. acidophilus* da aşırı ısı, nem ve doğrudan güneş ışığına maruz kaldığında ölebilir.

2.6.2. Lactobacillus dellbrueckii bulgaricus ve *Streptococcus thermophilus*

L. bulgaricus; sütten yoğurt yapmak için kullanılan birkaç bakteri türünden biridir. Adını ilk ortaya çıkarıldığı ülke olan Bulgaristan'dan almaktadır. Bakteri sütte beslenerek laktik asit yapar ve sütü yoğurda dönüştürür. Enzimleriyle bir disakkarit olan

laktozu monosakkaritlere hidrolizler. Ayrıca *L. bulgaricus* fermantasyon yaparken yoğurda kokusunu veren kimyasallardan biri olan asetaldehit sentezlenmesini de katalizler.

L. bulgaricus ve *S. thermophilus'a* ait **Şekil 2.14**'teki koloniler, yoğurt kültüründe "simbiyoz" olarak yaşamakta, yani ikisi birbirinin yaşam şartlarını desteklemektedir bu nedenle ticari olarak liyofilize formları bu iki mikroorganizmanın karışımı halinde de bulunmaktadır.



(a) **(b)**

Şekil 2.14 : (a) *Lactobacillus bulgaricus*, **(b)** *Streptococcus thermophilus*
(www.insanvebilim.com_images_bacteria-jpg)

*Lactobasil*ler adından da anlaşılacağı üzere hareketsiz, uzun ve kısa çomaklar şeklindedir. *Streptokok*lar ise genelde hareketsiz, ikili ve zincir şeklinde dizilen koklardan oluşur ve gelişmeleri için mutlaka karbondioksitli bir ortama ihtiyaç duyarlar. Bu bakteriler için en ideal gelişme sıcaklıkları 41 ile 43 °C olduğundan daha düşük sıcaklılarda tam olarak faaliyet gösteremeyecek, daha yüksek sıcaklıklarda ise canlılıklarını yitirebileceklerdir. Gerekli şartlar tamamlandığı anda, bu bakteriler önce 1 mol glukoz ve 1 mol galaktozdan oluşan süt şekeri laktozu hidrolizler. Sonra özellikle glukoz birimlerinin laktik asite yükseltgenmesini katalizler.

Sütte aslında bu bakterilerin çoğalması için hızlandırıcı olan peptidler ve aminoasitler düşük düzeydedir. Ama *L. bulgaricus* proteolitik bir aktivite göstermekte, yani proteinleri parçalamaktadır. Bu şekilde valin, glisin, histidin gibi aminoasitler

oluşturan *L. bulgaricus*, ilk etapta çoğalma ortamı fazla elverişli olmayan *Streptococcus*'un yaşam şartlarını destekler. *S. thermophilus* ise ürettiği CO_2 ve piruvat ile *L. bulgaricus*'a destek olur (www.insanvebilim.com).

2.6.3. Jelatin

Jelatin, kollajenin hidroliziyle elde edilen bir proteindir ve karakteristik olarak yapısında yüksek oranda glisin, prolin ve hidroksiprolin amino asitlerini içerir. Bu amino asitler jelatinin üçlü heliks bir yapı oluşturmasında ve jelleşme özelliği kazanmasında oldukça etkilidir (Rose vd., 1987).

Ucuz ve kolay bulunur olması yanında, immobilizasyon materyali olarak kullanılan diğer polisakkaritlerin aksine jel oluşumu için herhangi bir moleküle, iyona tuza ya da pH ayarlanmasına gerek duymaması, jelatinin enzim, hücre ve doku immobilizasyonunda sıklıkla tercih edilmesini sağlamaktadır.

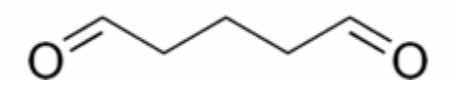
Termal ve mekanik kararlılığının arttırılması amacıyla immobilizasyonda çoğunlukla çapraz bağlayıcı ajan, bir reaktif olan glutaraldehid ile birlikte kullanılır (Scardi, 1987; Esposito vd., 1995).

2.6.4. Glutaraldehid

Glutaraldehid, özellikle enzimlerin kovalent immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan bifonksiyonel bir reaktiftir.

Biyosensör geliştirilmesinde kullanılan enzim, hücre doku vb. biyoaktif materyallerin, jelatin, kollajen, kitosan gibi biyolojik moleküllerle birlikte glutaraldehid ile çapraz bağlar oluşturması esasına dayalı immobilizasyon yöntemi oldukça yoğun bir

şekilde kullanılmaktadır (Guilbault ve Kauffmann, 1987; Scouten vd., 1995). Yöntem kolay uygulanabilir olması yanında immobilize sistemin termal ve operasyonal aynı zamanda da depo kararlılığını arttırması bakımından tercih edilmektedir.



Şekil 2.15 : Glutaraldehit'in yapısı

Glutaraldehitin mikroorganizmalar için kısmen toksik etki göstermesine rağmen biyoaktif sisteme kazandırdığı avantajlardan dolayı, % 1,0'in altındaki konsantrasyonlarda glutaraldehit kullanılarak toksik etkisi en aza indirilip hücre immobilizasyonları da gerçekleştirilmektedir (Hemachander vd., 2001).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyaller

3.1.1. Kimyasallar:

Denemelerde substrat olarak kullanılan fenolik bileşiklerden kateşol, fenol, rezorsin, orsinol, p-kresol, progallol, L-Dopa, gallik asit mono hidrat, laktik asit ve çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan glutaraldehit (% 25 v/v) Merck (Almanya) firmasından temin edildi.

Liyofilize bakteriler (*Lactobacillus acidophilus; Lactobacillus delbrueckii bulgaricus; Streptococcus thermophilus*) PROX (Fransa)'dan MAYSA (İstanbul) aracılığı ile temin edildi ve kullanılmadığı zamanlarda + 4 ºC'de buzdolabında saklandı.

*Lactobacillus*ların besi ortamı olan MRS Broth ise Acumedia Manufacterers (Michigan)'dan temin edildi.

Biyoaktif tabakanın elektroda immobilizasyonu için kullanılan jelatin Sigma-Aldrich Chemical Co. (USA)'den temin edildi.

Tamponların ve diğer çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan tüm kimyasallar Merck (Almanya) firmasından temin edildi.

3.1.2. Cihazlar:

Orion 3 Star model Oksijen metre ve Orion 3 Star 080113 serisi çözünmüş oksijen (DO) problar kullanıldı.

Biyoaktif tabaka materyalinin hazırlanması için ve biyosensörün çalışması süresince reaksiyon hücresinin istenilen sıcaklıkta tutulabilmesi için sabit sıcaklığa ayarlanabilen Nüve BM 302 model sirkülasyonlu bir su banyosu kullanıldı.

Bakterilerin besi yerinden izolasyonu için 5000 rpm ROTINA 38R Soğutmalı santrifüj kullanıldı.

Tampon çözeltileri hazırlamak için 213 Microprocessor pH metre kullanıldı.

Eppendorf otomatik pipetler kullanıldı.

Chiltern HS31 manyetik karıştırıcı ve Gec Avery analitik terazi kullanıldı.

3.2. Metodlar

3.2.1. Çözünmüş oksijen probunun çalışma ilkesi

Amperometrik temele dayalı çözünmüş oksijen probları, Au (Katod), Ag/AgCl (Anod), yarı doygun KCl (Elektrolit) ve oksijene duyarlı teflon bir membrandan oluşmuştur.

Membran, gaz geçirgenliğinin yanı sıra sensörün dış çevreden korunmasına da olanak sağlar bu koruma sayesinde reaksiyon ortamında olabilecek bir takım safsızlıklardan kaynaklanması muhtemel girişim etkileri de minimize edilmiş olmaktadır. İletici sistem olarak bir amperometrik sensörün kullanılması durumunda potansiyometrik sensörlerden en büyük fark ürünlerden sinyal oluşturan türün elektrod yüzeyinde tüketilmesidir (Dinçkaya, 1999).

3.2.2. Mikrobiyal esaslı biyosensörün hazırlanması

Biyoaktif tabaka materyalinin hazırlanması için kuru formdaki bakteri (10 mg) ve jelatin (10 mg) tartılarak bir flakonun içine alındı ve 400 µL fosfat tamponu (pH: 7,5; 50mM) ilave edilerek çalkalandı ve bu karışım 37,5 ºC deki su banyosunda 15 dk jelatin çözününceye kadar bekletildi.

Su banyosunda çözünür hale getirilmiş olan kuru bakteri-jelatin karışımının 200 µL'si çözünmüş oksijen prob membranına yayıldı ve jelatinin donması için +4 ºC'deki buzdolabında 30 dk bekletildi. Bu sürenin sonunda glutaraldehitle çapraz bağlama yapmak için, hazırlanan biyosensör % 0,625'lik (v/v) glutaraldehit çözeltisi (pH: 7,5; 50 mM fosfat tamponu ile hazırlanmış) içine daldırıldı ve bu çözelti içinde 5 dk bekletildi. Glutaraldehit muamelesinden sonra biyosensör destile su ile pek çok kez yıkanarak kullanıma hazır hale getirildi.

3.2.3. Hazırlanan mikrobiyal esaslı biyosensör ile ölçüm ilkesi

Hazırlanan biyosensörde oksijen elektrodunun membranına biyoaktif tabaka immobilize haldedir. Belirlenen çalışma koşullarında tampon çözelti bulunduran reaksiyon kabına substrat ilavesinin ardından, enzimatik reaksiyon başlar. Bu sırada reaksiyon kabındaki çözünmüş oksijenin kullanılmasıyla çözünmüş oksijen miktarında azalma gözlenir. Biyosensörün ölçüm ilkesi de; çözünmüş oksijen miktarındaki bu azalmanın ölçülmesi esasına dayanır.

Hazırlanan biyosensör ile ölçüm çalışmalarının yapıldığı düzeneğin fotoğrafı **Şekil 3.1**'de verilmiştir.



Şekil 3.1 : Tezde kullanılan çözünmüş oksijen (DO) esaslı biyosensör düzeneği

1- Oksijen metre **2-** Biyosensör elektrotu **3-** Su ceketli reaksiyon kabı

4- Termostatlı ve sirkülasyonlu su banyosu **5-** Isıtıcılı karıştırıcı

Liyofilize bakteri esaslı biyosensör, ilk ölçüm alınmadan önce biyoaktif tabaka bileşenlerinin adaptasyonu için manyetik karıştırıcı ile sabit bir hızda karıştırılan 30 ml çalışma tamponu içeren termostatik reaksiyon hücresi içinde 30 dk bekletildi. Daha sonra ilk ölçümü almak için tekrar 30 ml çalışma tamponu içeren termostatik reaksiyon hücresi içine daldırılarak manyetik karıştırıcı ile sabit bir hızda 10 dk karıştırıldı. Bu süre sonunda çalışma tamponu ve çözünmüş oksijen probu arasındaki çözünmüş oksijenin difüzyonundan dolayı çözünmüş oksijen konsantrasyonunun dengeye geldiği değer kaydedildi. Bu anda, substrat standartları veya örnekler, reaksiyon hücresindeki toplam son hacim 30 ml olacak şekilde eklendi. Biyosensörün biyoaktif tabakasındaki liyofilize bakteriler ile ilave edilen substrat arasındaki enzimatik reaksiyon ön çalışmalarda belirlendiği gibi 18 dakikada tamamlandı ve yeni bir denge durumuna ulaşıldı. Bu durumda oksijen metrede okunan çözünmüş oksijen miktarı, substrat yokluğuna kıyasla daha düşüktü. Deneysel çalışmalarda, her iki denge durumunda okunan çözünmüş oksijen miktarının farkı alındı.

Substratın farklı konsantrasyonlarına karşı ölçülen çözünmüş oksijen tüketimi değerleri kullanılarak standart grafikler elde edildi.

3.2.4. Mikrobiyal temelli biyosensör için uygun bakterinin seçilmesi

Biyomateryal olarak kullanılacak olan probiyotik bakterinin mevcut liyofilize formu ile uygun besi ortamında büyütülen yaş formunun ve bu formdan saflaştırılan *L. acidophilus* ve *L. bulgaricus'*un biyosensörlerdeki performanslarının karşılaştırılması yapıldı.

3.2.4.1. *Lactobacillus*lar için besi ortamının hazırlanması

Mikrobiyal biyosensör geliştirilmesi amacıyla kullanılacak olan liyofilize haldeki bakteriler biyosensörlere direkt immobilize edildi. Diğer formların biyosensöre immobilize edilmeden önce besi yerinde yetiştirilmesi amacıyla probiyotik 34 bakteriler *Lactobacillus* türlerinin yetiştirilmesi için uygun olan MRS Broth ortamına alındılar.

Bu amaçla Pepton 10g/l, et ekstraktı 8g/l, maya ekstraktı 4 g/l, D(+)-glukoz 20 g/l, dipotasyum hidrojen fosfat 2 g/l, Tween 80 1 g/l, diamonyum hidrojen sitrat 2 g/l, sodyum asetat 5 g/l, magnezyum sülfat 0,2 g/l, mangan sülfat 0,04 g/l içeren MRS Broth'tan 2,75 g tartıldı ve 250 ml'lik bir erlen içerisinde 50 ml olacak şekilde destile su ilave edildi ve aktivasyonu için 4 saat boyunca otoklavlandı. Aktivasyon işleminin ardından aşılama işlemi için 0,1 g liyofilize haldeki mikroorganizmalar MRS Broth besi ortamına alındı ve 35 °C'de ve 200 rpm'de çalkalamalı olarak 72 saat inkübasyona bırakılarak üremeleri sağlandı. 72 saatlik sürenin sonunda bakterilerin substrata adaptasyonu için substratlı ortama geçildi. Substrat olarak fenolik bileşiklerden kateşol kullanıldı. Bunun için 0,3 g kateşol, 2,75 g MRS Broth ve % 1'lik aşı 250 ml'lik erlen içerisinde 50 ml olacak şekilde ilave edildi. 35 °C'de ve 200 rpm'de 20 saat boyunca inkübasyona bırakıldı (Oh vd.; 1995).

3.2.4.2. Bakterilerin besi ortamından izolasyonu

Spesifik üreme hızının sabit ve maksimum olduğu 20 saatlik inkübasyon süresinin sonunda besi ortamındaki bakteriler besi ortamıyla birlikte 4600 rpm'de + 4 °C'de 25 dk santrifüjlendi. Sıvı kısımlar atıldıktan sonra 10'ar ml fosfat tamponu (50 mm, pH:7,5) ilave edildi ve tekrar santrifüjlendi. Bu işlem iki kez, fosfat tamponuyla tekrarlandı. Sonuçta elde edilen ve bu bakterileri içeren bakteri çökeltisi biyosensör hazırlanması için kullanıldı.

Kullanılmadığı zamanlarda besi ortamından izole edilen bakteriler –17 C°'de derin dondurucuda saklandı.

3.2.4.3. Uygun bakteri formunun seçilmesi

Fenolik bileşiklerin belirlenmesi için geliştireceğimiz mikrobiyal biyosensörün biyoajanının seçilmesi amacıyla aşağıdaki bakteri formları kullanıldı.

- Ticari probiyotik yoğurt üretimi için kullanılan *L. acidophilus, L. bulgaricus ve S. thermophilus* içeren liyofilize form,

- Bu formun *lactobacillus*lar için uygun olan MRS Broth besi yerinde substrat olarak kullanılan fenolik bileşiğe adapte edilmiş formu,

- Mevcut liyofilize formdan saflaştırılmış *L. acidophilus* ve *L. bulgaricus'*un ayrı ayrı MRS Broth besi yerinde substrat olarak kullanılan fenolik bileşiğe adapte edilmiş formları.

Yukarıda belirtilen her bir form için ayrı ayrı bakteri biyosensörleri hazırlandı ve değişen fenolik bileşik konsantrasyonlarına karşılık bu biyosensörlerin verdikleri cevaplar karşılaştırılarak en uygun bakteri formu belirlendi.

Ölçümler 50 mM, pH: 7,5 fosfat tamponunda ve 37,5 °C'de gerçekleştirildi. Substrat olarak ise fenolik bileşiklerden kateşol kullanıldı.

3.2.5. Substrat olarak kullanılacak standart fenolik bileşiğin seçilmesi

Probiyotik bakteri esaslı biyosensörün geliştirilmesinde optimizasyon çalışmalarına geçmeden önce standart grafiğini çıkaracağımız substratın seçimi için aynı konsantrasyondaki (2,5 mM) kateşol, fenol, rezorsin, orsinol, p-kresol, progallol, L-Dopa, gallik asit mono hidrat ve laktik asit gibi fenolik bileşikler hazırlanan karışık mikroorganizma esaslı biyosensörle ölçüldü ve zamana karşı çözünmüş oksijen konsantrasyonu eğrileri elde edildi.

Bu eğrilerden en iyi biyosensör cevabı kateşol ile elde edildiğinden bundan sonraki çalışmalarda standart substrat olarak kateşol kullanıldı.

3.2.6. Mikrobiyal esaslı biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyonu

Biyosensörün çalışma koşullarını optimize ederek en iyi biyosensör cevabını verdiği koşulların bulunması için pH, tampon konsantrasyonu ve sıcaklığın biyosensör cevabına etkileri incelendi ve her birinin % biyosensör cevabına karşı grafikleri çizildi.

3.2.6.1. pH optimizasyonu

pH: 5,0; 6,0; 7,0; 7,5; 8,0 olan 50mM Fosfat tamponları ve pH: 8,5; 9,0; 10,0 olan 50mM Tris-HCl ve Glisin tamponları hazırlandı. En iyi biyosensör cevabının hangi pH değeri ile alındığı belirlendi.

Farklı tamponda ölçüme geçilirken biyosensör o tamponda ve çalışma sıcaklığında 20 dakika bekletildi.

3.2.6.2. Uygun tampon konsantrasyonu

Geliştirilen biyosensörün optimum pH değeri ve bu pH değerindeki uygun tampon sisteminin belirlenmesinden sonra tampon konsantrasyonlarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla, hazırlanan biyosensörler için farklı konsantrasyonlarda ki tamponlarla ölçümler gerçekleştirildi.

Bu amaçla bir önceki çalışmada en uygun tampon sistemi olarak belirlenen fosfat tamponunun (pH: 8,0) 25 mM; 50 mM konsantrasyonları ile çalışıldı.

3.2.6.3. Optimum sıcaklık

Optimum sıcaklığın belirlenmesi için düşük sıcaklıktan yüksek sıcaklığa doğru 21,5; 25; 30; 35; 37,5; 40; 45; 50 °C'de ölçümler gerçekleştirilerek geliştirilen biyosensör için biyosensör cevapları incelendi.

3.2.7. Biyosensörün biyoaktif tabaka materyallerinin optimizasyonu

Liyofilize formda karışık mikroorganizma esaslı biyosensör ile optimum biyosensör cevabının alınacağı en uygun koşulların belirlenmesi için biyoaktif tabakayı oluşturan mikroorganizma miktarının, jelatin miktarının ve çapraz bağlayıcı ajan olan glutaraldehitin biyosensör cevabı üzerine etkileri araştırıldı.

Hazırlanan biyosensörler ile yapılan ölçümlerle elde edilen standart grafiklerden yararlanarak mikroorganizma miktarının, jelatin miktarının ve glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine ne gibi etkileri olduğu incelendi.

3.2.7.1. Bakteri miktarının biyosensör cevabına etkisi

Biyoaktif tabakadaki bakteri miktarının optimizasyonu için jelatin miktarı ve glutaraldehit oranı sabit tutularak bakterinin farklı miktarlarının biyosensör cevabı üzerine etkisi incelendi. Bunun için 200 µl fosfat tamponu (50 mM; pH: 7,5) için 5 mg jelatin, % 0,625'lik glutaraldehit sabit olmak şartıyla 2,5 mg; 5 mg; 10 mg bakteri içeren biyosensörler hazırlandı.

3.2.7.2. Jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi

Geliştirilen biyosensör için en uygun bakteri miktarı 5 mg olarak belirlendikten sonra, yine glutaraldehit oranı sabit tutularak jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi incelendi. Bunun için 5 mg bakteri, % 0,625'lik glutaraldehit sabit tutularak 2,5 mg; 5 mg; 10 mg jelatin içeren biyosensörler hazırlandı.

3.2.7.3. Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi

Biyosensör için en uygun bakteri ve jelatin miktarı belirlendikten sonra glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla 200 µl fosfat tamponu (50 mM; pH: 7,5) için belirlenen optimum bakteri (5 mg) ve jelatin miktarı (5 mg) sabit tutularak sadece glutaraldehid yüzdesi değiştirilerek % 0,25; % 0,625; % 1 oranında glutaraldehit ile biyosensörler hazırlandı.

3.2.8. Biyosensörün karakterizasyon çalışmaları

3.2.8.1. Doğrusal ölçüm aralığının belirlenmesi

Geliştirilen biyosensörün çalışma koşulları ve biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonlarından sonra belirlenen optimum koşullarda bir biyosensör hazırlandı. Kateşolün farklı konsantrasyonları için ölçümler alınarak standart grafikler elde edildi. Lineer bir artışın gözlendiği konsantrasyon aralığı ölçüm aralığı olarak belirlendi.

Ölçümler 5 mg bakteri, 5 mg jelatin (200 µl 50 mM pH: 7,5 fosfat tamponu içinde), % 0,625'lik glutaraldehid olarak belirlenen optimum koşullarda hazırlanan biyosensörle 50 mM Fosfat tamponu (pH 8,0) ve 37,5 °C'de gerçekleştirildi.

3.2.8.2. Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği

Geliştirilen biyosensörle yapılan analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi için belirlenen optimum koşullarda, kateşol'ün 1 mM konsantrasyonu için arka arkaya ölçümler alındı. Ölçümlere ilişkin standart sapma ve varyasyon katsayıları hesaplanarak biyosensörün tekrar kullanılabilirliği incelendi.

3.2.8.3. Operasyonel kararlılık

Belirlenen optimum koşullarda hazırlanan mikrobiyal esaslı biyosensör ile standart kateşolün 1 mM konsantrasyonu için arka arkaya 11 kez ölçüm alındı. Başlangıçta elde edilen biyosensör cevabı % 100 kabul edilerek tekrarlanan ölçümler ile aktivite incelendi ve hazırlanan biyosensör ile arka arkaya kaç kez ölçüm alınabileceğine karar verildi.

3.2.8.4. Depo kararlılığı

Geliştirilen mikrobiyal esaslı biyosensör ile aktivitesini kaybetmeden ne kadar süre boyunca ölçüm alabileceğini belirlemek için optimum koşullarda bir biyosensör hazırlandı. Bu biyosensör ile 22 gün boyunca kateşolün 1 mM konsantrasyonu için ölçümler alındı. Ölçüm alındıktan sonra bir sonraki gün ölçüm almak üzere biyosensör fosfat tamponunun buharında + 4 ºC'de buzdolabında bekletildi. Ölçüm alınmadan önce buzdolabından çıkarılıp 5 dk dışarıda, 30 dk da çalışma sıcaklığındaki (37,5 ºC'de) çalışma tamponunda (50 mM fosfat tamponu; pH 8.0) bekletildi. Bu sürenin sonunda ölçüme geçildi. İlk gün alınan ölçümün aktivitesi % 100 olarak kabul edildi. 22 gün boyunca alınan ölçümlerin biyosensör cevapları % aktivite cinsinden verildi.

3.2.9. Geliştirilen biyosensör ile fenolik bileşiklerin tayin edilebilirliği

3.2.9.1. Sentetik atık sularda ve fabrika atık sularında fenolik bileşiklerin tayini

Örnek analizi için hazırlanan sentetik atık su kompozisyonu $(NH_4)_2SO_4$ (0,5 g), $MgSO_4$ (0,1 g), $MnSO_4$ (0,01 g), $FeSO_4$ (0,0005 g) ve kateşolün bilinen miktarı destile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve hazırlanan bu çözelti 1:50 oranında tamponla seyreltilerek ölçümler alındı (Timur vd., 2003).

Bazı fabrikaların atıklarını ve özellikle fenolik bileşikleri içerdiği bilinen atık su Çerkezköy-Velimeşe Ergene Havzasından alındı. Kateşolün bilinen miktarını ve 1:50 oranında tamponla seyreltilmiş atık suyu içeren örnekler hazırlanarak ölçümler alındı.

.

3.2.9.2. Süt ve süt ürünlerinde fenolik bileşiklerin tayini

Mikrobiyal esaslı biyosensörün süt, yoğurt ve probiyotik katkılı süt ürünlerinde fenolik bileşiklerin tayini için uygulanabilirliğinin belirlenebilmesi amacıyla farklı

sütler ve süt ürünleri seçilerek ölçümler gerçekleştirildi. Standart katma yöntemiyle alınan sonuçların doğruluğu test edildi.

Sırasıyla kullanılan örnekler ve yapılan ön işlemler aşağıda verilmiştir;

- Ticari olarak temin edilen Pınar Süt: 1:50 oranında seyreltilerek kullanıldı
- Ticari olarak temin edilen Sütaş süt 1: 50 oranında seyreltildi.
- Ticari olarak temin edilen Ülker içim Kefir: 1:50 oranında seyreltildi
- Ticari olarak temin edilen Danone doğal yoğurt 1:200 oranında seyreltildi.
- Ticari olarak temin edilen Activia probiyotik yoğurt (sade) 1:200 oranında
- Ticari olarak temin edilen Yovita probiyotik yoğurt 1:200 oranında seyreltildi.

Her bir örnek için kateşolün standart grafiğinde doğrusal ölçüm aralığında ki 1mM ve 2,5 mM konsantrasyonlar için ölçümler alındı ve standart grafiğe göre sonuçları karşılaştırıldı.



Şekil 3.2:Geliştirilen biyosensör ile fenolik bileşiklerin tayini için kullanılan süt ürünleri

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Fenolik Bileşiklerin Tayinine Yönelik Uygun Bakterinin Seçilmesi

Fenolik bileşiklerin tayini için bakteriler 2 form halinde kullanıldı. Bu formlardan biri MRS Broth besi ortamında büyütülmüş ve besi ortamında substrat kateşole adapte edilmiş bakterileri, diğer form ise liyofilize formdaki bakterileri kapsamaktadır. Bu amaçla aşağıda belirtilen bakteriler kullanıldı.

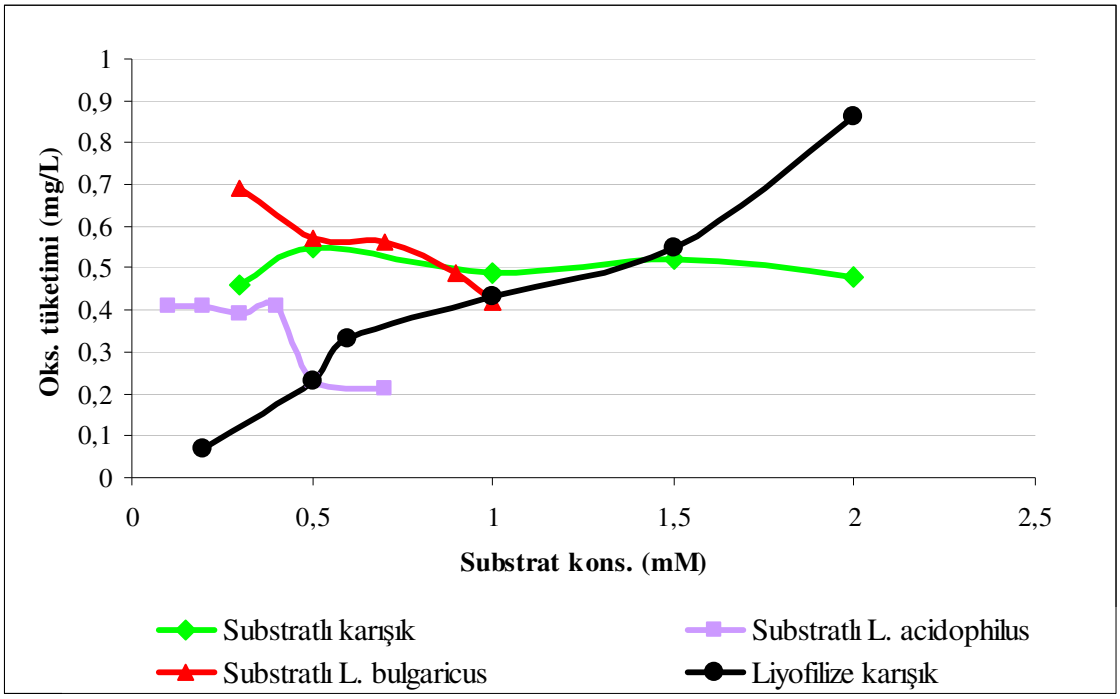
Besi ortamında substrata adapte edilmiş;

- Karışık haldeki *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus*
- Saflaştırılmış *Lactobacillus acidophilus*
- Saflaştırılmış *Lactobacillus bulgaricus*

Liyofilize formda;

- Karışık haldeki *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus*

Bu bakteriler metotlar kısmında 3.2.4.2'de anlatıldığı şekilde MRS Broth besi ortamından izole edildiler ve her biri için 200 µl 50 mM pH: 7,5 fosfat tamponu içinde 10 mg bakteri, 10 mg jelatin olacak şekilde ve % 0,625'lik glutaraldehit ile ayrı ayrı biyosensörler hazırlandı ve kateşolün 0,1-5mM konsantrasyonları aralığında her biri için ölçümler alındı. Alınan ölçümler **Şekil 4.1'**de gösterilmektedir.



Şekil 4.1 : Fenolik bileşik tayini için farklı mikroorganizmaların biyosensör cevapları

Besi ortamında substrata adapte edilmiş saf mikroorganizmaların teorikte daha iyi sonuçlar vermesi bekleniyordu ama görüldü ki saf *L. acidophilus* ile farklı konsantrasyonlarda ki fenolik substrat için doğrusal olarak artan bir biyosensör cevabı alınamadı. Ayrıca farklı konsantrasyonlar için aynı biyosensör cevabını verdi ve 4 ölçümden sonra aktivite kaybetmeye başladı. Besi ortamından izole edilen substrata adapte olmuş saf *L. bulgaricus* ile alınan ölçümlerde ise artan substrat konsantrasyonuna karşı azalan biyosensör cevapları gözlendi ki bu durum biyosensör için istenmeyen bir durumdur. Substrata adapte olmuş karışık bakterilerle ise doğrusal ve tekrarlanabilir sonuçlar alınamadı.

Liyofilize formda *L. acidophilus, L bulgaricus, S. thermophilus*'u içeren bakteri karışımıyla yapılan ölçümlerde ise artan substrat konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artan ve tekrarlanabilen biyosensör cevapları alındı. Bu form ile daha iyi sonuçlar alınmasının nedeni olarak, birlikte simbiyotik bir yaşam sürdürdüğü bilenen *L. acidophilus, L. bulgaricus ve S. thermophilus*'un tamponlu ortamda birlikte

bulunmalarıyla sinerjik etkileşimden dolayı daha aktif olmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yapılan gözlemler ve sonuçlar karşılaştırılarak fenolik bileşiklerin tayini için uygun mikroorganizmaya karar verildi. Uygun mikroorganizma olarak liyofilize edildi karışık *L.acidophilus, L. bulgaricus ve S. thermophilus*'u içeren bakteri formu seçildi.

Bundan sonraki denemelerde mikrobiyal esaslı biyosensörün biyoaktif tabakası bu bakteri kullanılarak hazırlandı.

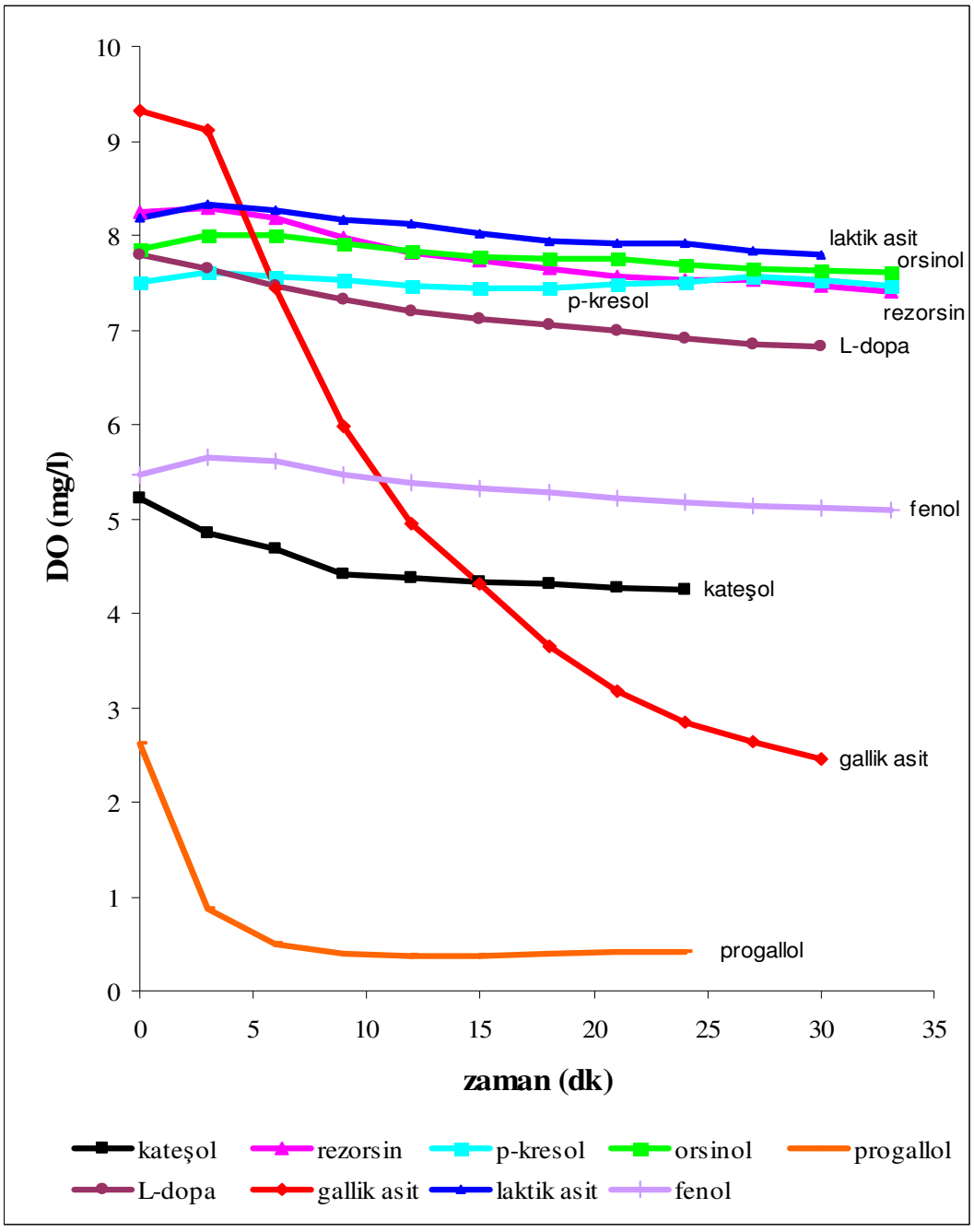
4.2. Substrat Olarak Kullanılacak Standart Fenolik Bileşiğin Seçilmesi

Mikrobiyal esaslı biyosensörün optimizasyon çalışmalarına geçmeden önce standart grafiğini çıkaracağımız substratın seçimi için aynı konsantrasyondaki (2,5 mM) kateşol, fenol, rezorsin, orsinol, p-kresol, pirogallol, L-Dopa, gallik asit monohidrat ve laktik asit gibi fenolik bileşikler hazırlanan biyosensörle ölçüldü ve zamana karşı çözünmüş oksijen konsantrasyonu eğrileri **Şekil 4.2**'de verildi.

Bu amaçla hazırlanan biyosensörün biyoaktif tabakası 5 mg liyofilize formda karışık bakteri, 5 mg jelatin ve 200 µL fosfat tamponu (pH: 7,5; 50 mM) ile hazırlandı. Biyoaktif tabakanın çapraz bağlanması için % 0,625'lik glutaraldehit çözeltisi kullanıldı. Çalışma sıcaklığı olarak 37,5 ºC, çalışma tamponu olarak fosfat tamponu (pH: 7,5; 50 mM) kullanıldı.

Bir biyosensör elektrodunun cevap zamanı elde edilen çözünmüş oksijen kons.-zaman eğrilerinden anlaşılabilir. Örneğin elde edilen eğride basamakların şekli yayvan ve genişse cevap zamanı uzun (yavaş), tersi söz konusu ise cevap zamanı kısa (hızlı)'dır. Buna göre orsinol, rezorsin, p-kresol gibi fenolik bileşikler hemen hemen hiç oksijen tüketimi gösterdi. Bu nedenle hazırladığımız biyosensör için uygun değildirler. Gallik asit monohidrat ise çok yayvan ve geniş bir cevap zamanı gösterdiğinden uygun

değildir. Kateşol ve pirogallol ise hazırladığımız liyofilize bakteri esaslı biyosensör için uygun biyosensör cevapları verdi. Bu nedenle optimizasyon çalışmaları uygun görülen kateşol ile yapıldı.



Şekil 4.2 : Farklı fenolik bileşiklerin (2,5 mM) çözünmüş oksijen kons.- zaman grafiği

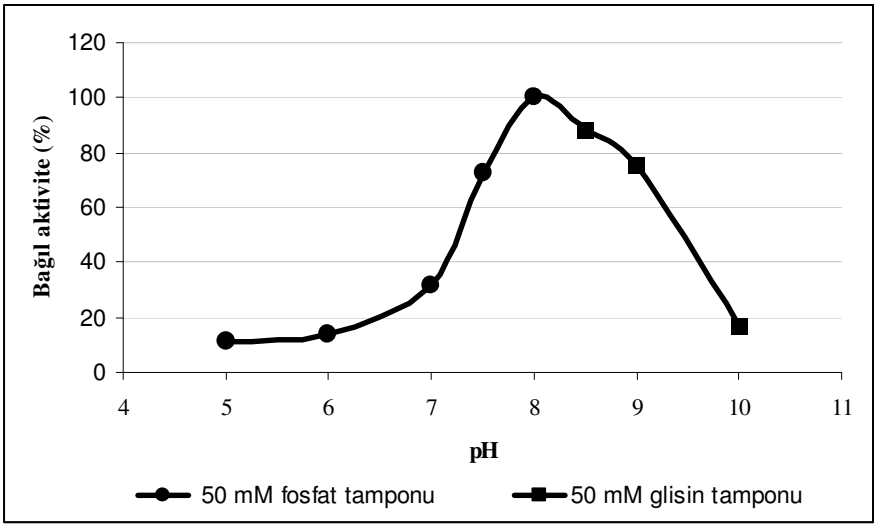
4.3. Mikrobiyal Esaslı Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonuna İlişkin Bulgular

4.3.1. Optimum pH

pH: 5-8 arasında 50 mM Fosfat tamponları ve pH: 8,5-10 arasında 50 mM Glisin tamponları hazırlandı. pH: 8,5-10 arasında Tris-HC1 tamponu hazırlandığında biyoaktif tabaka eridiğinden dolayı bu tampon biyosensörün çalışması için uygun bulunmadı ve bu pH aralığı için Glisin tamponu hazırlandı.

Ölçümler için 200 µl 50 mM pH: 7,5 fosfat tamponu içinde 5 mg bakteri, 5 mg jelatin olacak şekilde ve % 0,625'lik glutaraldehit kullanılarak bir biyosensör hazırlandı. Kateşol konsantrasyonu 2,5 mM, çalışma sıcaklığı 37,5 ºC olarak kullanıldı.

Optimum biyosensör cevabı pH: 8 (50 mM fosfat tamponu) olarak belirlendi. pH: 8'deki biyosensör cevabı % 100 olarak kabul edildi. pH 8 ile karşılaştırıldığında pH 7,5 ve pH 8,5'taki oksijen tüketim oranı sırasıyla % 72,54 ve % 88,42 olarak belirlendi. Daha yüksek ve daha düşük pH'larda ise daha düşük biyosensör cevapları alındı. Bundan sonraki denemelerde pH: 8 fosfat tamponu (50 mM) kullanıldı. Biyosensör cevabı üzerine pH'ın etkisi **Şekil 4.3**'te görülmektedir.



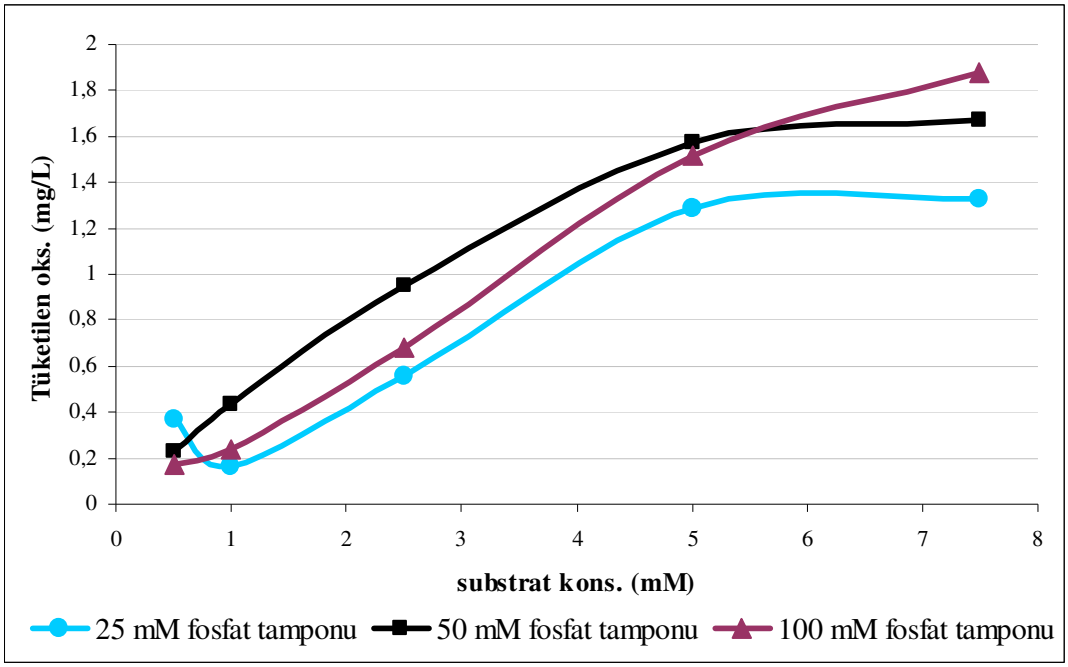
Şekil 4.3 : Biyosensör cevabı üzerine pH'ın etkisi

4.3.2. Optimum tampon konsantrasyonu

pH optimizasyonu çalışmalarından uygun pH ve uygun tampon cinsi pH 8.0 fosfat tamponu olarak belirlendikten sonra bu tampon sisteminin hangi konsantrasyonları ile çalışıldığında en iyi biyosensör cevaplarının alınacağının belirlenmesi amacıyla en uygun tampon konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik çalışmalara geçildi.

Bu amaç doğrultusunda 25 mM, 50 mM ve 100 mM pH: 8.0 fosfat tamponları hazırlandı. Hazırlanan konsantrasyonlardaki tamponların substrat konsantrasyonuna karşı biyosensör cevapları **Şekil 4.4**'te gösterilmektedir.

Ölçümler için 200 µl 50 mM pH: 7,5 fosfat tamponu içinde 5 mg bakteri, 5 mg jelatin olacak şekilde ve % 0,625'lik glutaraldehit kullanılarak bir biyosensör hazırlandı. Çalışma tamponu pH: 8.0 fosfat tamponu, çalışma sıcaklığı 37,5 ºC kullanıldı.



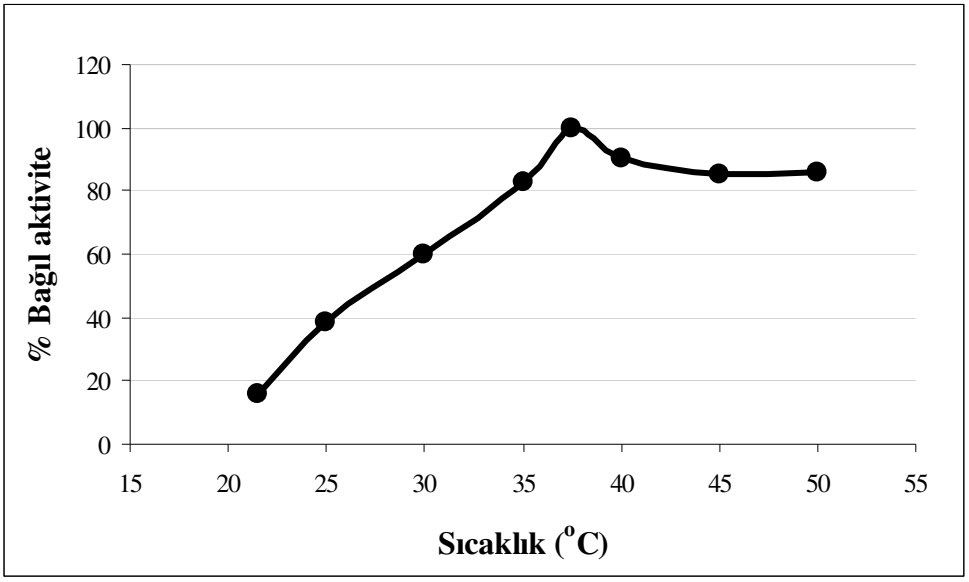
Şekil 4.4 : Biyosensör cevabı üzerine tampon konsantrasyonunun etkisi

Optimum tampon konsantrasyonu **Şekil 4.4**'ten de görülebileceği gibi ilk dört ölçümü doğrusal biyosensör cevabı veren 50 mM fosfat tamponu (pH: 8.0) olarak belirlendi ve bundan sonraki çalışmalarda çalışma tamponu olarak 50 mM pH: 8.0 fosfat tamponu kullanıldı.

4.3.3. Optimum sıcaklık

Şekil 4.5'te biyosensör cevabı üzerine sıcaklığın etkisi gösterilmektedir. En iyi biyosensör cevabı 37,5 ºC'de ölçüldü ve grafikte biyosensör cevabı % 100 olarak kabul edilerek diğer sıcaklıklar içinde biyosensör cevapları % bağıl aktivite cinsinden verildi.

Ölçümler 200 µl 50 mM pH: 7,5 fosfat tamponu içinde 5 mg bakteri ve 5 mg jelatin olacak şekilde % 0,625'lik glutaraldehit ile hazırlanmış biyosensörle kateşol'ün 2,5 mM konsantrasyonu için gerçekleştirildi.



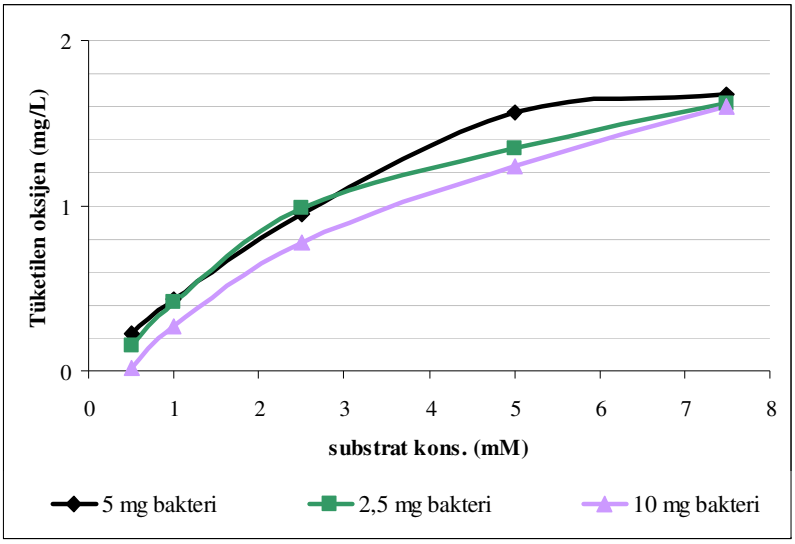
Şekil 4.5 : Biyosensör cevabı üzerine sıcaklığın etkisi

Şekil 4.5'te de görüldüğü gibi sıcaklığın 37,5 ºC'ye artmasıyla biyosensör cevabının da arttığı ve bu dereceden sonra düştüğü gözlendi. Bu, sonuç olarak enzim aktivitesi ve sıcaklık ilişkisinin önemli bir prensibidir. Sıcaklık artışıyla paralel olarak çözünmüş oksijen konsantrasyonunda da azalma dolayısıyla biyosensör cevabında düşme beklenirken 37,5 °C'ye kadar artış kaydedilmesi enzim aktivitesinin optimum sıcaklığa kadar artış göstermesiyle, 37,5 °C'den daha yüksek sıcaklıklarda biyosensör cevabında düşme gözlenmesini ise optimum sıcaklığın aşılmasıyla birlikte gerek enzim aktivitesinde ve gerekse sıcaklık artışıyla çözünmüş oksijen konsantrasyonundaki azalmayla açıklamak mümkündür. Ancak çalıştığımız bakteriler sıcaklığa dayanıklı olduğu için yüksek sıcaklıklarda çok fazla aktivite kaybı gözlenmedi. Sonuç olarak çalışma sıcaklığı 37,5 ºC olarak belirlendi ve bundan sonraki denemelerde bu sıcaklıkta çalışıldı.

4.4. Biyosensörün Biyoaktif Tabaka Materyallerinin Optimizasyonuna İlişkin Bulgular

4.4.1. Bakteri miktarının biyosensör cevabına etkisi

Bakteri miktarının optimizasyonu için 200 µl 50 mM pH: 7,5 fosfat tamponu içinde 2,5 mg, 5 mg ve 10 mg bakteri içeren biyosensörler hazırlandı. Ölçümler belirlenen optimum pH, optimum sıcaklık ve optimum tampon konsantrasyonunda gerçekleştirildi. Bakteri miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi **Şekil 4.6**'da gösterilmektedir.

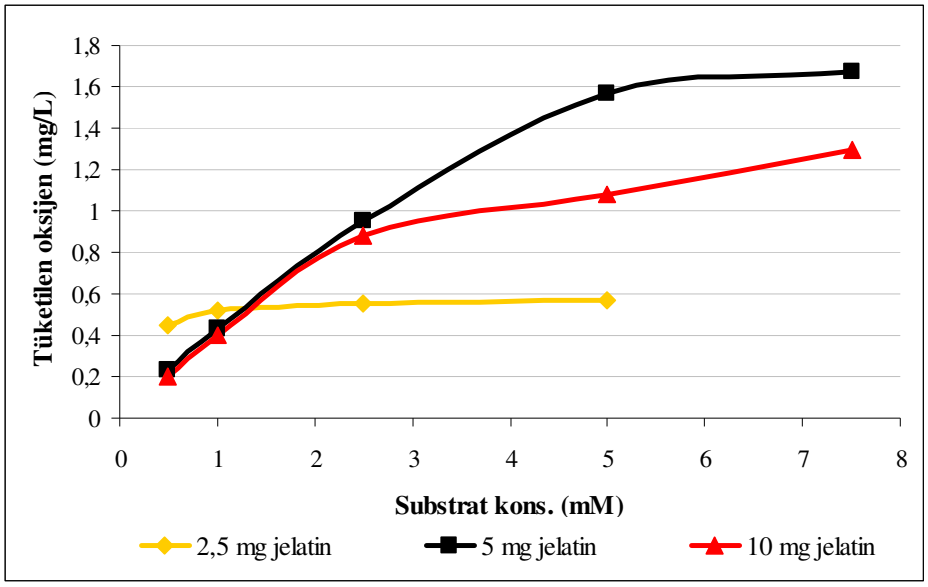


Şekil 4.6 : Biyosensör cevabı üzerine bakteri miktarının etkisi

Bakteri miktarının optimizasyonu için alınan ölçümlerde 10 mg bakteri ile hazırlanan biyosensörde difüzyon engelinden dolayı düşük biyosensör cevapları elde edildi. 2,5 mg ve 5 mg bakteri ile hazırlanan biyosensörlerde ise başlangıçta yakın cevaplar alındı ama substrat konsantrasyonu arttıkça 2,5 mg bakteri içeren biyosensör substrata doyduğundan sabit değerler vermeye başladı. 5 mg bakteri içeren biyosensörle ise substrat konsantrasyonu artışıyla doğru orantılı bir grafik elde edildi. En iyi biyosensör cevabı veren 5 mg bakteri optimum bakteri miktarı olarak belirlendi. Bundan sonraki denemelerde bakteri miktarı olarak 5 mg kullanıldı.

4.4.2. Jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi

Jelatin miktarının optimizasyonu için 200 µl 50 mM pH: 7,5 fosfat tamponu içinde optimum bakteri miktarı olarak belirlenen 5 mg bakteri ve 2,5 mg, 5 mg, 10 mg jelatin içeren biyosensörler % 0,625'lik glutaraldehit çözeltisi kullanılarak hazırlandı. Ölçümler belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirildi ve elde edilen sonuçlar **Şekil 4.7**'de grafik olarak verildi.



Şekil 4.7 : Biyosensör cevabı üzerine jelatin miktarının etkisi

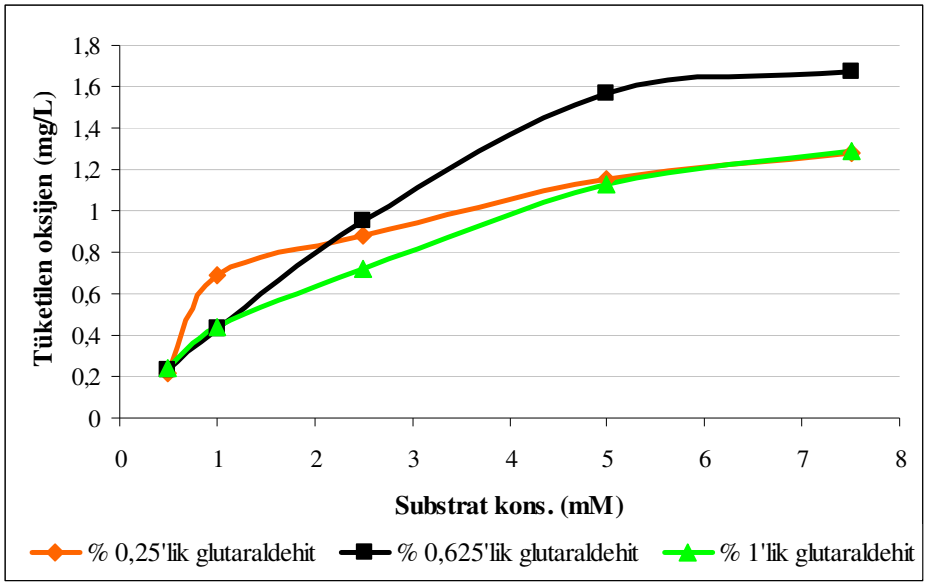
Jelatin miktarının optimizasyonunda 2,5 mg jelatin ile hazırlanan biyosensörde difüzyon engeli diğerlerine göre daha az olduğundan düşük konsantrasyonlar için yüksek biyosensör cevabı verdi ama konsantrasyon artışıyla doğru orantılı bir artış gözlenmedi. Jelatin miktarı çok düşük olduğu için de fiziksel olarak dayanıklı bir biyoaktif tabaka hazırlanamadı.

10 mg jelatin ile hazırlanan biyosensörün biyoaktif tabakası daha dayanıklıydı ama 5 mg ile hazırlanan biyosensör substrat konsantrasyonuyla doğru orantılı ve daha yüksek biyosensör cevabı verdi. Bu nedenle optimum jelatin miktarı 5 mg olarak belirlendi ve bundan sonraki denemelerde jelatin miktarı 5 mg olarak kullanıldı.

4.4.3. Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi

Glutaraldehit yüzdesinin optimizasyonu için 200 µl 50 mM pH: 7,5 fosfat tamponu içinde optimum olarak belirlenen 5 mg bakteri ve 5 mg jelatin içeren biyosensörler farklı yüzdelerdeki glutaraldehit çözeltileri ile hazırlandı. Bu amaçla % 0,25'lik, %0,625'lik ve % 1'lik glutaraldehit çözeltileri kullanıldı. Ölçümler

belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirildi ve elde edilen sonuçlar **Şekil 4.8**'de grafik olarak verildi.



Şekil 4.8 : Biyosensör cevabı üzerine glutaraldehit yüzdesinin etkisi

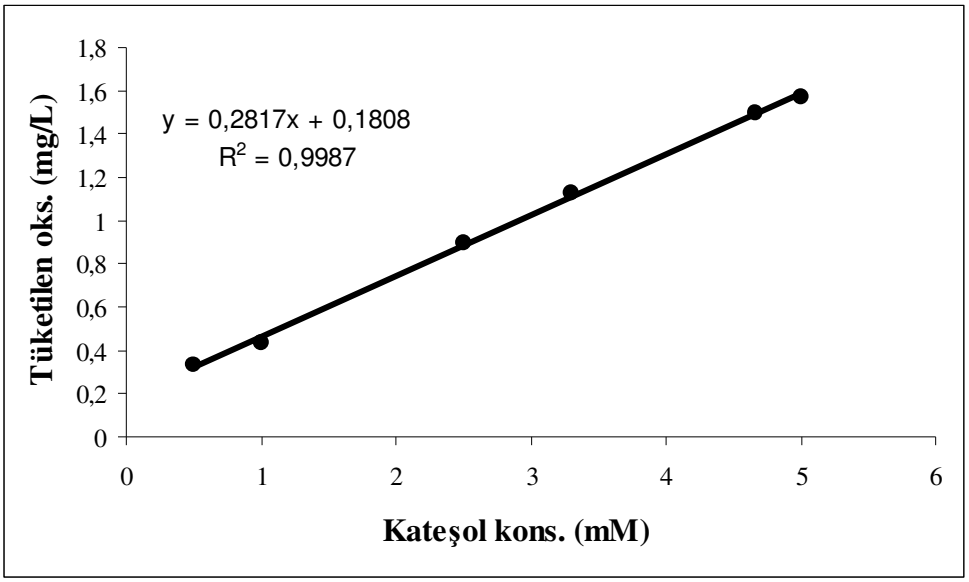
Glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisini belirlemek için alınan ölçümlerde % 0,25'lik glutaraldehitle hazırlanan biyoaktif tabaka fiziksel olarak dayanıksızdı. % 1'lik glutaraldehit ile hazırlanan biyosensörde çapraz bağlanma oranının fazla olmasından dolayı difüzyon engeli nedeniyle daha düşük biyosensör cevapları verdi. Daha doğrusal biyosensör cevapları veren % 0,625'lik glutaraldehid optimum olarak belirlendi. Bundan sonraki denemelerde çapraz bağlayıcı ajan olarak % 0,625'lik glutaraldehid çözeltisi kullanıldı.

4.5. Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular

4.5.1. Kateşol için doğrusal ölçüm aralığı

Belirlenen optimum koşullarda hazırlanan mikrobiyal esaslı biyosensör ile fenolik bileşiklerin belirlenebileceği tayin aralığının tespit edilmesi için standart olarak

kullanılan kateşolün farklı konsantrasyonlarında ölçümler alındı. Bu ölçümler arasında doğrusal bir eğri veren 0,5 – 5 mM kateşol konsantrasyonu aralığı fenolik bileşiklerin tayin sınırı olarak belirlendi. Geliştirilen bu mikrobiyal esaslı biyosensörün doğrusal ölçüm aralığı kateşolün standart grafiği olarak **Şekil 4.9**'da verildi.



Şekil 4.9. Kateşol standart grafiği

4.5.2. Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği

Geliştirilen mikrobiyal esaslı biyosensörle yapılan analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi için kateşolün 1 mM konsantrasyonunda aktivite kaybı olmadan (n = 7) ölçümler alındı ve ortalama değer (X_{ort}) 1,022 mM; standart sapma (S.D) ± 0,045 ve varyasyon katsayısı (C.V) % 4,39 olarak hesaplandı.

Tablo 4.1: Standart kateşolün tayini için alınan ölçüm sonuçları

Standart Kateşol için	Bilinen kons.	Ölçülen kons.	Standart sapma	% Varyasyon katsayısı
	1 mM	1,022 mM	± 0,045	% 4,39

Bir biyosensör sisteminin güvenilebilirliğinin belirlenmesinde standart sapma ve varyasyon katsayıları önemlidir. Bir biyosensör sisteminin kullanılabilir olduğunu söylemek için varyasyon katsayısının % 5'ten küçük olması istenir. **Tablo 4.1**'de verilen sonuçlardan da görüldüğü üzere elde edilen standart sapma ve varyasyon katsayısı kabul edilebilir sınırlar içerisindedir.

4.5.3. Operasyonel kararlılık

Belirlenen optimum koşullarda hazırlanan mikrobiyal esaslı biyosensör ile 1 mM standart kateşol için arka arkaya 11 kez ölçüm alındı. 6 – 7 ölçümden sonra biyosensör aktivite kaybetmeye başladı. Biyosensör ile alınan ilk ölçümün aktivetesi % 100 olarak kabul edilerek ard arda alınan ölçümlerdeki aktivite kayıpları **Şekil 4.10**'da gösterilmektedir.

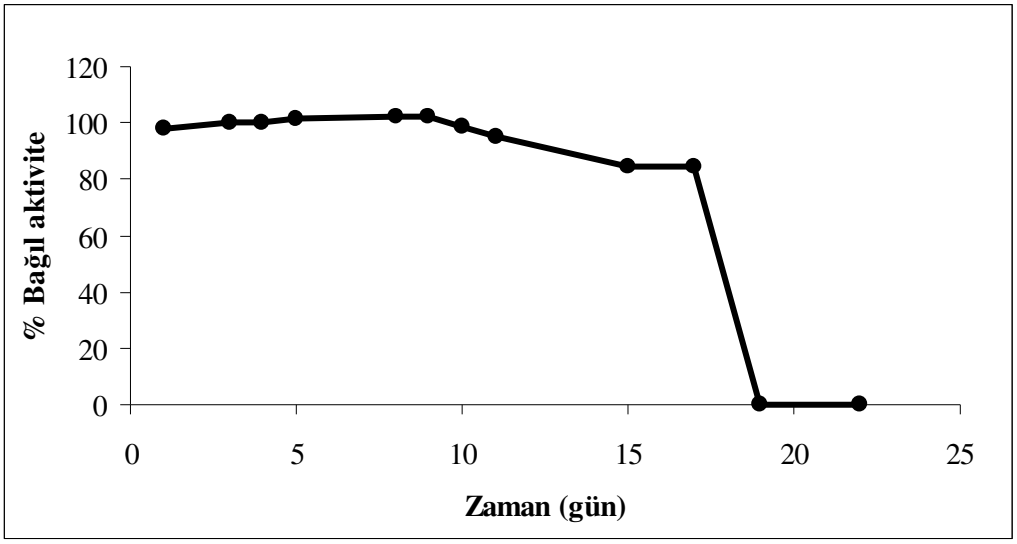


Şekil 4.10 : Operasyonel kararlılık

4.5.4. Depo kararlılığı

Geliştirilen mikrobiyal esaslı biyosensörün depo kararlılığını belirlemek için optimum koşullarda biyosensör hazırlandı. Bu biyosensör ile 22 gün boyunca standart

kateşolün 1 mM konsantrasyonu için ölçümler alındı ve bu ölçümlerde ilk gün alınan biyosensör cevabı % 100 kabul edilerek **Şekil 4.11**'de verildi.



Şekil 4.11 : Depo kararlılığı

Geliştirilen mikrobiyal esaslı biyosensörün depo kararlılığının belirlenmesi için alınan ölçümlerde başlangıçta biyosensörün bekledikçe aktivitesinin az miktarda arttığı gözlendi. Bu artışın, biyosensörün biyoaktif tabakasındaki mikroorganizmaların yaşamlarını sürdürebilecekleri ortamda gün geçtikçe adaptasyonlarının artmasına bağlı olduğu düşünüldü. 22 gün boyunca alınan ölçümlerde 9 günden sonra biyosensör aktivite kaybetmeye başladı. 18 gün boyunca aktivitesinin % 22'sini kaybetti. Ancak 19. günün sonunda hiç cevap vermemeye başladı ve kontrol amaçlı olarak ölçümlere 22. günün sonuna kadar devam edildi ve aynı şekilde hiç cevap vermedi.

4.6. Çeşitli Örneklerde Fenolik Bileşiklerin Tayini

Geliştirilen mikrobiyal esaslı biyosensör ile farklı örneklerde fenolik bileşiklerin tayininin ne ölçüde mümkün olduğunun belirlenmesi için sentetik olarak hazırlanan atık su, Çerkezköy-Velimeşe Ergene havzasından alınan atık su ve ticari olarak temin edilen

Pınar süt, Sütaş süt, Ülker İçim kefir, Danone doğal yoğurt, Activia probiyotik yoğurt (sade) ve Yovita probiyotik yoğurt (sade) kullanıldı. Her bir örnek için standart katma yöntemiyle biyosensör ölçümleri alındı.

Örnekler, herhangi bir ön işlem yapılmaksızın, direkt olarak kullanıldığında yapılarından dolayı oldukça yüksek bir sinyale neden olmaktadır, dolayısıyla analiz öncesi farklı ön işlemlere gereksinim duyulmaktadır. Bu nedenle her bir örneğe metodlar kısmında 3.2.9.2'de belirtildiği oranlarda seyreltmeler yapıldı. Standart katma işlemleri bu oranda seyreltilmiş örnekler üzerine uygulandı. Elde edilen sonuçlar aşağıda **Tablo 4.2**'de verilmiştir.

Tablo 4.2 : Çeşitli örneklerde kateşol tayini

Örnek	Eklenen miktar (mM)	Ölçülen miktar (mM)	Standart sapma
Sentetik atık su	1	0,87	± 0,04
	2,5	2,11	± 0,07
Atık su (ergene havzası)	1	1,72	± 0,12
	2,5	3,09	± 0,44
Pınar süt	1	1,41	± 0,03
	2,5	2,61	± 0,08
Sütaş süt	1	1,09	± 0,37
	2,5	2,56	± 0,24
Ülker İçim Kefir	1	1,38	± 0,22
	2,5	2,76	± 0,31
Danone doğal yoğurt	1	1,10	± 0,12
	2,5	2,61	± 0,24
Activia probiyotik yoğurt (sade)	1	1,27	± 0,19
	2,5	2,69	± 0,20
Yovita probiyotik yoğurt (sade)	1	1,25	± 0,18
	2,5	2,56	± 0,37

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Fenolik bileşiklerin çeşitli örneklerde tayini için probiyotik bakteri esaslı biyosensör hazırlanmasında 3 tanesi besi ortamında substrata adapte edilmiş bakteri formu ve *Lactobacillus acidophilus* ağırlıklı *Lactobacillus bulgaricus ve Streptococcus thermophilus bakterileri'*ni *de içeren* probiyotik bakterilerin liyofilize formu kullanıldı.

Biyosensör geliştirmede biyoajan olarak mikroorganizmaların kullanıldığı birçok literatür bulunmaktadır. Bunlara örnek olarak; C*andida tropicalis* maya hücrelerini kullanarak etanol tayini için hazırlanmış bir biyosensör çalışması (Akyılmaz ve Dinçkaya, 2004) ve *Pseudomunas putida* bakterisini kullanarak fenolik bileşiklerin tayini için hazırlanmış bir biyosensör çalışması (Timur vd., 2003) verilebilir. *Lactobacillus* bakterileri kullanılarak hazırlanmış biyosensör çalışmalarına ise literatürlerde çok az sayıda rastlanmıştır. Bu literatürlere örnek olarak ise; B1 vitaminin tayini için S*accharomyces cerevisiae* probiyotik mayasını kullanan bir biyosensör çalışması (Akyılmaz vd., 2006), orto-fosfat tayini için L*actobacillus brevis* probiyotik bakterisi kullanılarak hazırlanan bir biyosensör çalışması (Hüwel vd., 1997) verilebilir. Fenolik bileşiklerin tayini için bitki dokusu esaslı çok sayıda biyosensör literatürüne rastlanmıştır ancak biyosensör geliştirmede *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* bakterilerinin kullanıldığı bir literatüre rastlanılmadığı için sonuçların karşılaştırılması yukarıda bahsedilen literatürlere göre yapılmıştır.

Besi ortamında substrata adapte edilmiş *Lactobacillus acidophilus* ağırlıklı *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus;* besi yerinden saflaştırılmış *L. acidophilus* ve *L. bulgaricus; L. acidophilus* ağırlıklı *L. bulgaricus ve S. thermophilus* bakterilerini de içeren probiyotik mikroorganizmalarının liyofilize formların her biriyle hazırlanan biyosensörler; fenolik bileşiklerin tayininde kullanıldığında fenolik bileşiklerin konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak doğrusal bir şekilde artan, en iyi biyosensör cevabı *L. acidophilus, L. bulgaricus, S. thermophilus* probiyotik bakterilerini içeren mevcut liyofilize form ile elde edilmiştir. MRS Broth'ta büyütülen ve substrata

adapte edilmiş formlarla elde edilen ölçümlerle biyosensör cevaplarında doğrusallık elde edilmemiş ve biyosensör aktivitesinde hızlı azalma gözlenmiştir.

Biyosensörde immobilize haldeki liyofilize bakterilerin, pH: 7,5 fosfat tamponlu ortama değişen miktarda eklenen substratla karşılaşmaları zamana yayılmıştır. Bakterilerin bu ortamda sinerjik etkileşmeleri, bakterilerin içerdiği enzimlerin substratın ürüne dönüşümünü hızlı katalizlemesi, buna bağlı olarak O_2 tüketiminin doğrusal artışı, belli konsantrasyon aralığında doğru ölçümü mümkün kılmaktadır. MRS Broth'ta büyütülmüş karışık ve saf formları içeren biyosensörle bu durum sağlanamadı.

Liyofilize bakteri ile hazırlanan biyosensörün optimizasyon ve karakterizasyon çalışmalarında standart olarak kullanılacak fenolik bileşiğin belirlenmesi için orsinol, rezorsin, p-kresol, laktik asit, L-dopa, fenol, kateşol, gallik asit, pirogallolün hazırlanan biyosensörle verdiği biyosensör cevapları incelendi. Elde edilen eğrilerde basamakların şekli yayvan ve genişse cevap zamanı uzun (yavaş), tersi söz konusu ise cevap zamanı kısa (hızlı)'dır. Bunların ikisi de istenmeyen durumdur. Buna göre orsinol, rezorsin p-kresol gibi fenolik bileşikler nerdeyse hiç oksijen tüketimi göstermedi. Gallik asit monohidrat ise çok yayvan ve geniş bir cevap zamanı gösterdi. Kateşol ve pirogallol ise yeterli hızda ve genişlikte biyosensör cevapları verdiler. Bu nedenle biyosensörün optimizasyon ve karakterizasyon çalışmalarında pirogallol'e göre daha iyi sonuç veren kateşol substrat olarak kullanıldı.

Odacı v.d (2004) fenolik bileşiklerin tayini için geliştirdikleri biyosensörde şeftali dokusu için en uygun substratın belirlenmesi için orsinol, rezorsin, p-kresol, laktik asit, L-dopa, fenol, kateşol, gallik asit ve pirogallolün verdiği biyosensör cevaplarını karşılaştırmış ve en iyi biyosensör cevabını pirogallolde aldığını bildirmiştir. Portaccio vd.'in (2006) fenolik bileşiklerin tayini için geliştirdikleri biyosensörde ise en uygun substratın kateşol olduğunu rapor etmişlerdir.

Biyosensörün pH optimizasyonu için; pH: 5,0; 6,0; 7,0; 7,5; 8,0 olan 50mM Fosfat tamponları ve pH: 8,5; 9,0; 10,0 olan 50mM Tris-HCl ve Glisin tamponları hazırlandı. pH: 8,5-10 arasında Tris-HC1 tamponu hazırlandığında biyoaktif tabaka

eridiğinden kullanılmadı ve bu pH aralığı için Glisin tamponu kullanıldı. Optimum biyosensör cevabı pH: 8'de (50 mM fosfat tamponu) elde edildi ve optimum pH 8.0 olarak belirlendi.

Timur v.d.'in (2004) yer elması dokusu ile hazırladıkları bir biyosensör ile fenol tayini için yaptıkları bir çalışmada optimum pH'ı 8.0 olarak bildirmişlerdir. Aynı şekilde Polifenol Oksidaz enzimi esaslı biyosensörlerde optimum pH'ın 7,5- 8 arasında bulunduğu bildirilmiştir (Akyılmaz ve Dinçkaya; 2004).

Tampon kopnsantrasyonunun optimizasyonu için 25 mM, 50 mM ve 100 mM pH:8.0 fosfat tamponları hazırlandı. Hazırlanan biyosensör ile alınan ölçümlerde en iyi biyosensör cevabı 50mM'lık fosfat tamponu (pH: 8.0) ile sağlandı.

Telefoncu v.d'in (2003) fenolik bileşiklerin belirlenmesi için *Pseudomunas putida* bakterisi ile geliştirdikleri biyosensör çalışmalarında da en iyi tampon sistemi, jelatinle immobilizasyonda uygun sonuçlar veren 50 mM fosfat tamponu olarak rapor edilmiştir.

Biyosensörün sıcaklık optimizasyonu için 21,5; 25; 30; 35; 37,5; 40; 45; 50 °C'de alınan ölçümlerden en iyi biyosensör cevabının 37,5 °C'de elde edildiği görüldü. Sıcaklık artışıyla paralel olarak çözünmüş oksijen konsantrasyonunda da azalma dolayısıyla biyosensör cevabında düşme beklenirken 37,5 °C'ye kadar artış kaydedilmesi enzim aktivitesinin optimum sıcaklığa kadar artış göstermesiyle, 37,5 °C'den daha yüksek sıcaklıklarda biyosensör cevabında düşme gözlenmesi ise optimum sıcaklığın aşılmasıyla birlikte gerek enzim aktivitesinde ve gerekse sıcaklık artışıyla çözünmüş oksijen konsantrasyonundaki azalmayla açıklanabilir. Biyosensördeki immobilize bakteriler ile yüksek sıcaklıklarda çok fazla aktivite kaybı gözlenmedi. Bu beklenen bir sonuçtur. İmmobilizasyon işleminin, enzim ve bakterilerin sıcaklık kararlılığını arttırdığı bilinmektedir (Telefoncu, 1999b).

Hüwel v.d'in (1997) orto-fosfatların belirlenmesinde biyosensör geliştirmek için *Lactobacillus brevis* bakterisini kullandıkları çalışmada optimum sıcaklık 36 ºC olarak rapor edilmiştir.

Biyosensörün biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonu için sırasıyla bakteri miktarı, jelatin miktarı ve glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevapları üzerine etkisi incelendi.

Bakteri miktarının optimizasyonunda biyosensöre 2,5 mg; 5 mg; 10 mg bakteri immobilize edildi. 10 mg bakteri ile hazırlanan biyosensörde difüzyon engelinden dolayı düşük biyosensör cevapları elde edildi. 2,5 mg ve 5 mg bakteri ile hazırlanan biyosensörlerde ise başlangıçta yakın olan cevaplar alındı ama substrat konsantrasyonu arttıkça 2,5 mg bakteri içeren biyosensör substrata doyduğundan değerler sabitlendi. Substrat konsantrasyonu artışıyla doğru orantılı biyosensör cevabı 5 mg bakterili biyosensörle elde edildi.

Akyılmaz ve Dinçkaya'nın (2004) etanolün belirlenmesi için geliştirdikleri biyosensörde biyoajan olarak kullanılan *Candida tropicalis* maya hücrelerinin 5, 10, 20 mg miktarlarının biyosensör cevapları üzerine etkileri incelenmiştir. Optimum bakteri miktarı olarak 10 mg *Candida tropicalis* rapor edilmiştir.

Jelatin miktarının optimizasyonunda 2,5 mg; 5 mg; 10 mg jelatin ile biyosensörler hazırlandı. 2,5 mg jelatin ile hazırlanan biyosensörde difüzyon engeli diğerlerine göre daha az olduğundan düşük konsantrasyonlar için yüksek biyosensör cevapları verdi ancak konsantrasyon artışıyla doğru orantılı bir değişim gözlenmedi. Ayrıca jelatin miktarının azlığı biyoaktif tabakanın fiziksel dayanıklılığını azalttı. 10 mg jelatin ile hazırlanan biyosensörün biyoaktif tabakası daha dayanıklıydı ancak 5 mg jelatinli biyosensör ile substrat konsantrasyonuyla lineer değişen ve daha yüksek biyosensör cevapları elde edildi. Bu nedenle optimum jelatin miktarı 5 mg olarak belirlendi.

Scardi (1987), enzimlerin ve microbiyal hücrelerin jelatine immobilizasyonunu incelediği bir çalışmada immobilizasyon için jelatinin uygun bir materyal olduğunu rapor etmiştir. Biyosensörlerin biyoajanlarının immobilizasyonu için jelatinin kullanıldığı birçok literatüre rastlanmıştır. Bu literatürlerden etanol tayini için *candida tropicalis* hücrelerinin kullanıldığı oksijen elektrot esaslı bir biyosensörde 200 µl biyoaktif tabaka için optimum jelatin miktarı 5 mg olarak belirlenmiştir (Akyılmaz ve Diçkaya, 2004).

Glutaraldehit yüzdesinin optimizasyonu için, % 0,25'lik, % 0,625'lik, % 1'lik glutaraldehit çözeltileri kullanıldı. % 0,25'lik glutaraldehitle hazırlanan biyoaktif tabaka fiziksel olarak dayanıksızdı. % 1'lik glutaraldehit ile hazırlanan biyosensörde çapraz bağlanma oranının fazla olmasından dolayı difüzyon engeli nedeniyle daha düşük biyosensör cevapları elde edildi. Daha doğrusal biyosensör cevapları veren % 0,625'lik glutaraldehid optimum değer olarak belirlendi.

Biyosensörün karakterizasyon çalışmalarında belirlenen optimum koşullar kullanıldı. İlk karakterizasyon çalışması fenolik bileşiklerin ölçüm aralığının belirlenmesi oldu. Substrat olarak kullanılan kateşol için standart bir grafik elde edildi ve lineer tayin aralığı 0,5-5 mM olarak belirlendi.

Akyılmaz ve Dinçkaya'nın (2004) etanol tayini için C*andida tropicalis* hücrelerini içeren bir biyosensör geliştirdiği çalışmasında etanol için tayin aralığı 0,5-7,5 mM olarak belirlenmiştir. Pirogallol tayini için geliştirilen şeftali dokusu esaslı bir biyosensörde tayin sınırı 0,05-0,75 mM olarak belirlenmiştir (Hüwel vd., 1997).

Geliştirilen biyosensörün tekrarlanabilirliğinin ve operasyonel kararlılığının belirlenmesi için 1 mM standart kateşol ile arka arkaya 11 ölçüm alındı. İlk 7 ölçümde hiç aktivite kaybı olmadı. Sonraki ölçümlerde yaklaşık % 20 aktivite kaybı oldu. Ortalama değer (X_{ort}) 1,022 mM; standart sapma (S.D) ± 0,045 ve varyasyon katsayısı (C.V) % 4,39 olarak hesaplandı. Varyasyon katsayısının % 5'in altında hesaplanması geliştirilen bu biyosensörün kullanılabilirliğini göstermektedir.

Geliştirilen depo kararlılığı çalışmalarında, 22 gün boyunca belirli periyotlarda ölçümler alındı ve ilk 10 gün hiç aktivite kaybı olmadı. 18. gün % 22 aktivite kaybı oldu.

Etanol tayini için candida tropicalis hücrelerinin kullanıldığı bir biyosensörün tekrarlanabilirlik çalışmalarında varyasyon katsayısı % 3,39, operasyonel kararlılığı 10 ölçüm, depo kararlılığı ise 9 gün olarak rapor edilmiştir (Akyılmaz ve Dinçkaya, 2004).

Geliştirilen biyosensör ile farklı örneklerde fenolik bileşiklerin tayininin ne ölçüde mümkün olduğunun belirlenmesi için sentetik olarak hazırlanan atık su, Ergene havzasından alınan atık su, ticari markalardan Pınar süt, Sütaş süt, Ülker İçim kefir, Danone doğal yoğurt, Activia probiyotik yoğurt (sade) ve Yovita probiyotik yoğurt (sade) örnekleri kullanıldı. Bütün örnekler için standart katma yöntemiyle biyosensörle ölçümleri alındı. Tablo 4.2'deki sonuçlar incelendiğinde geliştirilen bu biyosensörün endüstriyel olarak kullanılabilirliği ölçümlerin standart sapmaları dikkate alındığında açık bir şekilde görülmektedir. Örnek analizlerinde özellikle fenolik yapı olarak sadece kateşolü içeren preparatlarda ölçümün yapılabileceği gibi PPO enzimi grup spesifikliğine sahip olduğundan diğer fenoliklerin tayininde de analiz sonuçları total fenol yükü olarak verilebilir. Dolayısıyla saflaştırma adımlarına gerek duymayan oldukça pratik bir sistem elde edilmiştir.

Geliştirilen probiyotik bakteri esaslı biyosensörün biyoaktif tabakasında doğal enzim kaynağı olarak kullanılan liyofilize formda ki *L. acidophilus.* ağırlıklı *L. bulgaricus, S. thermophilus* bakterilerini de içeren formun kullanılması, biyosensörün hazırlanmasında bakterinin büyütülmesi, sterilizasyonu, besi yerinden izolasyonu gibi ön işlemlere gerek duyulmaması ve bu işlemlerden kaynaklanabilecek hataları ortadan kaldırdığı için büyük bir avantajdır.

Diğer taraftan biyosensörün biyoajanı olarak doğrudan liyofilize probiyotik bakteri kullanımı: insan sağlığı için patojenik riskin olmaması, hazırlama, kullanım, temizleme, taşıma, depolama kolaylıkları, zaman ve maliyet ekonomisi bakımından çok avantajlı bir biyosensör hazırlamasına imkân sağlar.

Bunun yanında, çok küçük miktarlarda bakteri kullanılarak, az miktardaki örneklerde bile 0,5 – 5 mM aralığında fenolik bileşik tayinlerinin yapılabildiği bir biyosensör geliştirilmiştir.

Çalışmanın devamında, geliştirilen biyosensör ile atık sularda ve süt-süt ürünlerinde fenolik bileşiklerin hassas tayinleri için başarı ile kullanılması yanında, kan, idrar gibi vücut sıvılarındaki fenolik bileşiklerin tayinlerinde kullanım çalışmaları ve geliştirilen biyosensörün tek kullanımlık minyatürize forma dönüştürme çalışmaları düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Akyılmaz E. ve Dinçkaya E., 2000, A Mushroom (*Agaricus bisporus*) Tissue Homogenate based Alcohol Oxidase Electrode for Alcohol Determination in Serum, Talanta, (53), 505–509.

Akyılmaz E. ve Dinçkaya E., 2004, An Amperometric Microbial Biosensor Development based on *Candida tropicalis* Yeast Cells for Sensitive Determination of Ethanol, Biosensors and Bioelectronics, (20), 1263–1269.

Akyılmaz E., Yaşa İ., Dinçkaya E., 2006, Whole Cell Immobilized Amperometric Biosensor based on *Saccharomyces cerevisiae* for Selective Determination of Vitamin B1 (thiamine), Analytical Biochemistry, (354), 78-84.

Aykut U. ve Temiz H., 2006, Biyosensörler ve Gıdalarda Kullanımı, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, (3), 51-59.

Bozdoğan D., 2006, Probiyotikler, Gazi Üniversitesi, Ankara.

Çon A. H. ve Gökalp H. Y., 1997, Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Metabolitleri ve Etki şekilleri, Türk mikrobiyolog cemiyeti dergisi, (30), 180-190.

Davis C. R., Wibowo D., Eschenbruch R., Lee T. H., Fleet G. M., 1985, Practical Implications of Malolactic Fermentation: a Review, Am. J. Enol. Vitic., (36), 290-300.

Odacı D., 2004, Pirogallol Tayinine Yönelik Doku Biyosensörü Hazırlanması ve Karakterizasyonu, Doktara Tezi, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi.

Dinçkaya E. ve Telefoncu A., 1993, Enzyme electrode based on oxalate oxidase immobilized in gelatin for specific determination of oxalate, Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, (30), 282-284.

Dinçkaya E., 1999, Enzim sensörleri, Biyosensörler (Ed. Azmi Telefoncu), Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir, 81-142.

Doillet P. A. ve Langdon C. J., 1994, Use of a Probiotic for the Culture of Larvae of Pacific Oyster (*Crassostrea gigas* Thurnberg), Aquaculture, (119), 25-40.

D'Souza S. F., 2001, Microbial Biosensors: Review, Biosensors and Bioelectronics, (16), 337-353.

Duran N., Rose A. M., D'Annibale A., Gianfreda C., 2002, Applications of Laccases and Tyrosinases (Polyphenoloxidases) Immobilized on Different Supports: a Rewiev, Enzyme and Microbial Technology, (31), 907-931.

Esposito E., Cortesi R., Nastrazzi C., 1995, Gelatin Microspheres: Influence of Preparation Parameters and Thermal Treatment on Chemico-Physical and Biopharmaceutical Properties, Biomaterials, (20), 2009-2020.

Geredeli S. ve Anlı E., 2005, Şaraptaki Laktik Asit Bakterilerinin Malolaktik Fermantasyondaki Önemleri, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, (3), 1-14.

Guilbault G. G. ve Kauffmann J. M., 1987, Enzyme-based Electrodes as Analytical Tools, Biotechnology and Applied Biochemistry, (9), 95-113.

Gutes A., Cespedes F., Alegret S., del Vale M., 2005, Determination of Phenolic Compounds by a Polyphenoloxidase Amperometric Biosensor and Artificial Neutral Network Analysis, Biosensors and Bioelectronics, (20), 1668-1673.

Harborneg J. B., 1973, Phytochemical Methods, A quide to Modern Techniques of plant analysis, (5), 25-28.

Hemachander C., Bose N., Puvanakrishnan R., 2001, Whole Cell Immobilization of *Ralstonia pickettii* for lipase production, Process Biochemistry, (36), 629-633.

Hüwel S., Haalck L., Conrath N., Spener F., 1997, Maltose Phosphorylase from *Lactobacillus brevis:* Purification, Characterization and Application in a Biosensor for Ortho-Phosphate, Enzyme and Microbial Technology (21), 413-420.

İnanç N., Şahin H., Çiçek B., 2005, Probiyotik ve Prebiyotiklerin Sağlık Üzerine Etkileri, Erciyes Tıp Dergisi, 27(3), 122-127.

Korkut A. Y., Hoşsu B., Ferhatoğlu M., 2003, Probiyotikler ve Su Ürünlerinde Kullanımı, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, İzmir, (20), 551-556.

Macholan L., 1987, Recent Progress in Developing Enzyme and Tissue-based Membrane Electrodes, Acta-Biotechnol, 7(69), 547-553.

Mehrvar M., Bıs C., Scharer J. M., Moo-Young M., Luong, J. H., 2000, Fiber-Optic Biosensors-Trends and Advances, Analytical Science July, (16), 677-692.

Mello L. D. ve Kubota L. T., 2002, Review of the Use of Biosenssors as Analytical Tools in the Food and Drink Industries, Food Chemistry, 77, 237-256.

Meral B., Öcal C., Özbek F., Öney R. G., 2006, Kimya mühendisliğine giriş ders kitabı, Biyosensörler, Ankara Üniversitesi, Ankara, 30-35.

O'Connell J. E. ve Fox P. F., 1999, Effects of Phenolic Compounds on the Heat Stability of Milk and Concentrated Milk, *Journal of Dairy Research,* (66), 399-407.

O'Connell J. E. ve Fox P. F., 2001, Significance and Applications of Phenolic Compounds in the Production and Quality of Milk and Dairy Products: a Review, International Dairy Journal, (11), 103-120.

Oh S., Rheem S., Sim J., Kim S., Baek Y., 1995, Optimizing Conditions for the Growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in Tryptone-Yeast Extract-Glucose Medium by Using Response Surface Methodology, Applied and Environmental Microbiology, (61), 3809–3814.

Portaccia M., Di Martino S., Maiuri P., Durante D., De Luca P., Lepore M., Bencivenga U., Rossi S., De Maioc A., Mita D. G., 2006, Biosensors for Phenolic Compounds: The Catechol as a Substrate Model, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (41), 97-102.

Rose P. J., Mark H. F., Bikales N. M., Overberg C. G., Menges G., Kroschwitz J. I., 1987, Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, 2nd. Ed., Wiley Interscience, New York, (7), 89.

Rotariu L., Bala C., Magearu V., 2004, New Potantiometric Microbial Biosensor for Ethanol Determination in Alcoholic Beverages, Analytica Chimica Acta, 513, 119-123.

Sağıroğlu A., 2003, Bitkisel Doğal Bileşikler Kimyası, Trakya Üniversitesi, Edirne,12-13.

Scardi V., 1987, Immobilization of Enzymes and Microbial Cells in Gelatin, Methods in Enzymology, (135), 293-294.

Scouten H. W., Luong J. H. T., Brown R. S., 1995, Enzyme or Protein Immobilization Techniques for Application in Biosensor Design, Trends in Biotechnology, (13), 178-185.

Screening assesment for 1,2-benzenediol, 2008, Chemical Abstract Service Registry Number 120-80-9.

Shape M. E., Fryer T. F., Smith D. G., 1966, Identification of the Lactic Acid Bacteria, Academic Press, New York, 245.

Sharma S. K., Sehgal N., Kumar A., 2003, Biomolecules for Development of Biosensor and their Applications, Current Applied Physics, (3), 307-316.

Shihata A. ve Shah N. P., 2000, Proteolytic Profiles of Yogurt and Probiotic Bacteria, International Dairy Journal, (10), 401-408.

Sidwell J. S. ve Rechnitz G. A., 1986, Progress and Challenges for Biosensors using Plant Tissue Materials, Biosensors, 2 (4), 221-233.

Sokol W., 1998, Uptake Rate of Phenol by *Pseudomonas putida* Grown in Unsteady State, Biotechnology and Bioengineering, 32, 1097-1103.

Srisawasdi P., Jearanaikoon P., Wetprasit N., Sriwanthana B., Kroll M. H., Lolekha P. H., 2006, Aplication of *Streptomyces* and *Brevibacterium* Cholesterol Oxidase for Total Serum Cholesterol Assay by the Enzymatic Kinetic Method, Clinica Chimica Acta, 372, 103-111.

Surawicz C. M., 2003, Probiotics, Antibiotics-Associated Diarrhoe and *Clostridium difficile* Diarrhoea in Humans, Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, (17), 775–783.

Şahin İ., 1990, Mikrobiyolojiye Giriş, Eser Matbaası, Samsun, 237.

Tannock G. W., 1999, Probiotics: A Critical Review, Horizon Scientific Press, Trends in Food Science & Technology, (10), 113

Telefoncu A., 1999a, Biyosensörlere Genel Bakış, Biyosensörler (Ed. Azmi Telefoncu), Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir, 1-9.

Telefoncu A., 1999b, Biyoreseptörlerin immobilizasyonu, Biyosensörler (Ed. Azmi Telefoncu), Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir, 42-65.

Timur S., Pazarlıoğlu N., Pilloton R., Telefoncu A., 2003, Detection of Phenolic Compounds by Thick Film Sensors based on *Pseudomonas putida*, Talanta, (61), 87-93.

Tkac J., Vostiar I., Gemeiner P., Sturdik E., 2002, Monitoring of Ethanol during Fermentation using a Microbial Biosensor with Enhanced Selectivity, Bioelectrochemistry, 56, 127-129.

http://www.wikipedia.com/Lactobacillusacidophilus (Mayıs, 2008)

http://www.sci.ege.edu.tr/~eubio/yaz_okulu/biosensors.htm (Eylül, 2008)

http://www.insanvebilim.com_images_bacteria-jpg (Kasım, 2008)

ÖZGEÇMİŞ

21.10.1984 Edirne'de doğdum. 1990-1995 yılları arasında ilköğrenimimi Edirne Şehit Asım İlköğretim Okulunda tamamladım. 1995 yılında başladığım Edirne Atatürk Orta Okulunda orta öğrenimimi tamamlayıp, 1998 yılında mezun oldum. 1998 yılında lise öğrenimime başladığım Edirne Anadolu Lisesinden 2002 senesinde mezun oldum. 2002 yılında Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesinin Kimya bölümünü kazanarak lisans eğitimime başladım. 2006 senesinde lisans eğitimimi tamamladıktan sonra aynı sene Eylül döneminde mezun olduğum Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim dalında yüksek lisans eğitimime başladım.