T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FENOLİK BİLEŞİKLERİN TAYİNİNE YÖNELİK AMPEROMETRİK ESASLI BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI

Hakkı Mevlüt ÖZCAN

DOKTORA TEZİ

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ KİMYA BÖLÜMÜ

Danışman: Doç Dr. Ayten SAĞIROĞLU

EDİRNE-2010

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FENOLİK BİLEŞİKLERİN TAYİNİNE YÖNELİK AMPEROMETRİK ESASLI BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI

Hakkı Mevlüt ÖZCAN

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. AYTEN SAĞIROĞLU

EDİRNE-2010

ÖZET

Günümüzde fenolik bileşik tayininde çeşitli kromatografik, spektrofotometrik ve enzimatik yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bunlar özel ekipmanlar gerektiren zaman alıcı sistemlerdir.

Biyosensörler enzim, hücre ve doku gibi biyolojik unsurların uygun bir iletim sistemi ile birleştirilmesiyle oluşan biyoanalitik cihazlardır. Biyosensörlerin diğer yöntemlere karşı en önemli avantajı, tayin edilecek maddeler için ekonomik, pratik ve spesifik ölçümlere imkan vermesidir.

Saf enzimleri içeren dokuların kullanılmasıyla hazırlanan doku temelli biyosensörler, saf enzimlerin immobilize edilmesiyle hazırlanan biyosensörlerle kıyaslandıklarında, oldukça ucuz, yüksek kararlılıklı ve yüksek aktiviteli tayin sistemlerini oluşturmaktadır.

Bu çalışmada fenolik bileşikleri substrat olarak kullanan polifenoloksidaz enzimince zengin taze bakla ve Anamur muzu kabuğu bitki dokuları kullanılarak fenolik bileşik tayini için doku temelli biyosensörler geliştirilmiştir.

Bu amaç doğrultusunda bitki dokuları, immobilizasyon materyali olarak jelatin ve çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehitin kullanılmasıyla camsı karbon elektrot yüzeyinde immobilize edildi. Ölçümler, fenolik bileşik konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak azalan akımın belirlenmesiyle elde edilen standart grafikler yardımıyla gerçekleştirildi.

İmmobilizasyon ve çalışma koşullarının optimizasyonu için, optimum glutaraldehit yüzdesi, doku miktarı, jelatin miktarı, pH, tampon konsantrasyonu ve sıcaklık değerleri muz kabuğu biyosensörü için sırasıyla % 1.25, 7.96 mg/cm^2, 0.88 mg/cm^2, 7.0, 66 mM, 35 ^{o}C ve taze bakla biyosensörü için sırasıyla % 1.25, 10.60 mg/cm^2, 0.98 mg/cm^2, 7.0, 66 mM, 37.5 ^{o}C olarak bulundu. Bunun yanı sıra, her iki biyosensör için de 12 farklı fenolik bileşiğin tayin aralıkları kalibrasyon grafikleri ile elde edildi. Ayrıca biyosensörlerin depolama kararlılıkları ve tekrarlanabilirlikleri, inhibitör olabilecek bazı maddelerin etkileri araştırıldı. Muz kabuğu ve taze bakla biyosensörleri için kateşol lineer tayin aralıkları kalibrasyon grafiklerinden sırasıyla 10-80 μM ve 5-60 μM olarak bulundu.

Biyosensörlerin standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri, muz kabuğu biyosensörü için $1.44x10^{-3}$, % 2.69 ve taze bakla biyosensörü için $0.64x10^{-3}$, % 1.59 olarak bulundu. Çalışmanın son kısmında çeşitli içecek örneklerinde fenolik bileşik miktarları standart ekleme metoduyla belirlendi.

ABSTRACT

Nowadays, several methods can be used for phenolic compounds determination such as chromatographic , spectrophotometric and enzymatic methods. However, these methods are time consuming and require expensive equipments.

Biosensors are defined as an analytical device incorporating a biological sensing element such as enzyme, cell and tissue with a transducer. In contrast the other methods, the most important advantage of the biosensor is to offer specific, economic and portable diagnostics for the target biological substances.

As compared with prepared biosensors with immobilized isolated and pure enzymes, tissue based biosensors, which have including these enzymes, show potential advantages of low cost, high stability and activity.

In this study, tissue based biosensors were developed for determination of phenolic compounds by using fresh broad and Anamur banana peel including polyphenoloxidase which chooses phenolic compounds as a substrate.

For this purpose, by using gelatin as the immobilization material and glutaraldehyde which is cross-linking agent, the tissues were immobilized on the surface of glassy carbon electrode. Measurements were taken by standard curves which were obtained by the determination of decreasing current level related to phenolic compounds concentration.

For the optimization of the immobilization and experimental parameters such as optimum glutaraldehyde percentages, amounts of tissue homogenate, amounts of gelatin, pH, buffer concentrations and temperatures were founded as 1.25 %, 7.96 mg/cm^2, 0.88 mg/cm^2, 7.0, 66 mM, 35 ^{o}C for banana peel based biosensor and 1.25 %, 10.60 mg/cm^2, 0.98 mg/cm^2, 7.0, 66 mM, 37.5 ^{o}C for fresh broad based biosensor, respectively. Besides, the detection ranges of twelve different phenolic compounds were obtained with the calibration graphs for both of the biosensors. Storage stability and repeatability of the biosensor, inhibitory effects were also investigated. The typical calibration curves for the banana peel based biosensor and fresh broad biosensor revealed a linear range of 10-80 μM, 5-60 μM catechol, respectively. Standart deviation and variation coefficient of the biosensors were calculated as 1.44x10^{-3}, 2.69 % for

banana peel based biosensor and $0.64x10^{-3}$, 1.59 % for fresh broad based biosensor, respectively. Finally, concentration of phenolic compounds were determined by using biosensors in real drink samples using by standart addition method.

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca, tezimin planlanması ve yürütülmesinde zamanını, bilgisini, desteğini ve tecrübesini esirgemeyen danışmanım Sayın Hocam Doç. Dr. Ayten SAĞIROĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın başlangıcından bitimine kadar desteklerini esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma, laboratuar çalışmaları aşamalarında değerli katkılarını aldığım Ege Üniversitesi Biyokimya Bölümü Öğretim Elemanlarına çok teşekkür ederim.

Bana her zaman güvenip destekleyen başta eşim olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkürler…

Bu çalışma T.Ü. Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklenen "İçeceklerde Antioksidan Etkili Fenolik Maddelerin İzlenmesinde Kullanılmak Üzere Bitkisel Doku Temelli Biyosensör Geliştirilmesi" başlıklı TÜBAP-843 no'lu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Hakkı Mevlüt ÖZCAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET …… i

ABSTRACT…… iii

TEŞEKKÜR…… v

İÇİNDEKİLER…… vi

ŞEKİLLER DİZİNİ…… x

SİMGELER VE KISALTMALAR…… xv

1. GİRİŞ…….. 1

2. KURAMSAL TEMELLER…….... 3

2.1 Biyosensörler…….. 3

2.1.1 Biyosensörlerin yapısı ve fonksiyonu…….. 3

2.1.2 Fiziksel bileşenler……..... 4

2.1.3 Biyolojik bileşenler…….. 5

2.1.3.1 Enzim biyosensörleri…… 7

2.1.3.2 DNA biyosensörleri……... 8

2.1.3.3 İmmünosensörler…… 8

2.1.3.4 Mikrobiyal biyosensörler……... 8

2.1.3.5 Doku biyosensörleri……... 9

2.1.4 İdeal bir biyosensörde istenilen özellikler…… 10

2.1.5 Biyobileşenlerin birbirlerine göre kıyaslanması…….. 12

2.1.6 Biyolojik bileşenlerin immobilizasyonu…….. 13

2.1.7 Biyosensörlerin genel çalışma ilkesi……. 15

2.2 Fenolik Bileşikler…… 16

2.2.1 Antioksidan etkili fenolik bileşikler…….. 17

2.2.2 Kateşol…….. 20

2.2.3 Fenolik bileşiklerin tayin yöntemleri…… 21

2.2.3.1 Spektrofotometrik yöntemler……. 21

2.2.3.2 Kromatografik yöntemler…….. 22

2.2.3.3 Enzimatik yöntemler……. 23

2.2.3.4 Biyosensör temelli yöntemler…… 23

2.3 Polifenol Oksidazlar…….. 24

2.4 Biyosensör Hazırlanmasında Kullanılan Bitkisel Dokular……... 26

3. MATERYAL VE METODLAR……... 30

3.1 Materyaller…… 30

3.2 Metodlar…… 31

3.2.1 Biyosensörlerin çalışma ilkesi……. 31

3.2.2 Biyosensörün hazırlanması…….. 31

3.2.3 Biyosensörlerin ölçüm prosedürü…… 33

3.2.4 Biyosensörün immobilizasyon parametrelerinin optimizasyonu…… 35

3.2.4.1 Doku miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi……... 35

3.2.4.2 Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi……. 36

3.2.4.3 Glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisi…….. 37

3.2.5 Biyosensörlerin çalışma koşullarının optimizasyonu……. 38

3.2.5.1 En uygun pH değerinin belirlenmesi…… 38

3.2.5.2 En uygun tampon konsantrasyonunun belirlenmesi……. 39

3.2.5.3 En uygun sıcaklık değerinin belirlenmesi…….. 39

3.2.6 Biyosensörün karakterizasyonu…… 39

3.2.6.1 Biyosensörlerin lineer ölçüm aralıkları…….. 40

3.2.6.2 Biyosensör cevablarının tekrarlanabilirliği…… 40

3.2.6.3 Biyosensörlerin operasyonel kararlılığı……. 40

3.2.6.4 Biyosensörlerin depo kararlılığı……. 40

3.2.6.5 Farklı fenolik bileşiklerin tayin aralıkları…….. 41

3.2.6.6 Biyosensörlerin cevabı üzerine bazı kimyasal maddelerin inhibisyon etkisi… 41

3.2.7 Biyosensörlerin farklı örneklere uygulanabilirliğinin incelenmesi……. 41

4. SONUÇLAR 43

4.1 Biyosensörlerin Hazırlanma Koşullarının Optimizasyonuna Ait Bulgular 43

4.1.1 Doku miktarının biyosensör cevapları üzerine etkisi……..... 43

4.1.2 Jelatin miktarının biyosensör cevapları üzerine etkisi…….. 44

4.1.3 Glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevapları üzerine etkisi…….. 46

4.2 Biyosensörlerin Çalışma Koşullarının Optimizasyonuna Ait Bulgular…… 48

4.2.1 En uygun pH değerleri…….. 48

4.2.2 En uygun tampon konsantrasyonları……. 49

4.2.3 En uygun sıcaklık değerleri…….. 51

4.3 Biyosensörlerin Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular…… 52

4.3.1 Kateşol lineer tayin aralıkları…… 52

4.3.2 Biyosensör cevaplarının tekrarlanabilirlikleri……... 54

4.3.3 Biyosensörlerin işlem kararlılıkları……... 55

4.3.4 Biyosensörlerin depo kararlılıkları…… 56

4.3.5 Farklı fenolik bileşiklerin tayin aralıkları……. 57

4.3.6 Biyosensör cevapları üzerine bazı kimyasal maddelerin inhibisyon etkisi……. 83

4.3.7 Biyosensörlerin farklı örneklere uygulanabilirliklerinin incelenmesi……. 84

4.3.7.1 Muz kabuğu biyosensörü ile fenolik bileşik tayinleri sonuçları…….. 85

4.3.7.2 Taze bakla biyosensörü ile fenolik bileşik tayinleri sonuçları……. 88

5. TARTIŞMA……. 93

6. KAYNAKLAR……... 99

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil.2.1 Biyosensörlerin şematik gösterimi…… 3

Şekil 2.2 Biyosensörlerin bileşenleri…….. 4

Şekil 2.3 Biyosensörlerin genel çalışma ilkesi……... 15

Şekil 2.4 Bazı fenolik bileşikler……. 19

Şekil 2.5 Kateşolün kimyasal yapısı…….. 20

Şekil 2.6 Muz bitkisi (Musa *cavendish*)……. 27

Şekil 2.7 Taze bakla bitkisi (Vicia *faba*)…… 28

Şekil 3.1 Biyosensör sistemlerinde meydana gelen reaksiyonlar……... 31

Şekil 3.2 Bitki dokusu biyosensörleri ile yapılan ölçümlerde kullanılan düzenek…… 33

Şekil 3.3 Bitki dokusu temelli çalışma elektrodu…….. 34

Şekil 3.4 Reaksiyon hücresi ve daldırılmış elektrotlar……... 34

Şekil 4.1 Muz kabuğu biyosensörü için doku miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi…….. 43

Şekil 4.2 Taze bakla biyosensörü için doku miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi…….. 44

Şekil 4.3 Muz kabuğu biyosensörü için jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi…….. 45

Şekil 4.4 Taze bakla biyosensörü için jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi…….. 45

Şekil 4.5 Muz kabuğu biyosensörü için glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisi……. 46

Şekil 4.6 Taze bakla biyosensörü için glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisi……. 47

Şekil 4.7 Muz kabuğu biyosensörü için optimum pH grafiği…….. 48

Şekil 4.8 Taze bakla biyosensörü için optimum pH grafiği……. 49

Şekil 4.9 Muz kabuğu biyosensörü için optimum tampon konsantrasyonu grafiği……. 50

Şekil 4.10 Taze bakla biyosensörü için optimum tampon konsantrasyonu grafiği…… 50

Şekil 4.11 Muz kabuğu biyosensörü için optimum sıcaklık grafiği…….. 51

Şekil 4.12 Taze bakla biyosensörü için optimum sıcaklık grafiği……. 52

Şekil 4.13 Muz kabuğu biyosensörü için kateşol kalibrasyon grafiği…… 53

Şekil 4.14 Taze bakla biyosensörü için kateşol kalibrasyon grafiği…….. 53

Şekil 4.15 Muz kabuğu biyosensörünün işlem kararlılığı…….. 55

Şekil 4.16 Taze bakla biyosensörünün işlem kararlılığı…… 55

Şekil 4.17 Muz kabuğu biyosensörünün depo kararlılığı……... 56

Şekil 4.18 Taze bakla biyosensörünün depo kararlılığı…….. 57

Şekil 4.19 Muz kabuğu biyosensörünün progallol tayin sınırları……... 58

Şekil 4.20 Muz kabuğu biyosensörü için progallol standart grafiği…….. 58

Şekil 4.21 Taze bakla biyosensörünün progallol tayin sınırları……. 59

Şekil 4.22 Taze bakla biyosensörü için progallol standart grafiği…… 59

Şekil 4.23 Muz kabuğu biyosensörünün p-kresol tayin sınırları…… 60

Şekil 4.24 Muz kabuğu biyosensörün için p-kresol standart grafiği……. 60

Şekil 4.25 Taze bakla biyosensörünün p-kresol tayin sınırları…….. 61

Şekil 4.26 Taze bakla biyosensörü için p-kresol standart grafiği……. 61

Şekil 4.27 Muz kabuğu biyosensörünün hidrokinon tayin sınırları……... 62

Şekil 4.28 Muz kabuğu biyosensörü için hidrokinon standart grafiği…….. 62

Şekil 4.29 Taze bakla biyosensörünün hidrokinon tayin sınırları…….. 63

Şekil 4.30 Taze bakla biyosensörü için hidrokinon standart grafiği……... 63

Şekil 4.31 Muz kabuğu biyosensörünün fenol tayin sınırları…… 64

Şekil 4.32 Muz kabuğu biyosensörü için fenol standart grafiği…… 64

Şekil 4.33 Taze bakla biyosensörünün fenol tayin sınırları…… 65

Şekil 4.34 Taze bakla biyosensörü için fenol standart grafiği……... 65

Şekil 4.35 Muz kabuğu biyosensörünün L-dopa tayin sınırları……. 66

Şekil 4.36 Muz kabuğu biyosensörü için L-dopa standart grafiği……. 66

Şekil 4.37 Taze bakla biyosensörünün L-dopa tayin sınırları……. 67

Şekil 4.38 Taze bakla biyosensörü için L-dopa standart grafiği…… 67

Şekil 4.39 Muz kabuğu biyosensörünün gallik asit tayin sınırları…….. 68

Şekil 4.40 Muz kabuğu biyosensörü için gallik asit standart grafiği……. 68

Şekil 4.41 Taze bakla biyosensörünün gallik asit tayin sınırları……. 69

Şekil 4.42 Taze bakla biyosensörü için gallik asit standart grafiği…… 69

Şekil 4.43 Muz kabuğu biyosensörünün kaffeik asit tayin sınırları…… 70

Şekil 4.44 Muz kabuğu biyosensörü için kaffeik asit standart grafiği…… 70

Şekil 4.45 Taze bakla biyosensörünün kaffeik asit tayin sınırları……... 71

Şekil 4.46 Taze bakla biyosensörü için kaffeik asit standart grafiği…….. 71

Şekil 4.47 Muz kabuğu biyosensörünün rutin tayin sınırları…….. 72

Şekil 4.48 Muz kabuğu biyosensörü için rutin standart grafiği……. 72

Şekil 4.49 Taze bakla biyosensörünün rutin tayin sınırları……. 73

Şekil 4.50 Taze bakla biyosensörü için rutin standart grafiği……. 73

Şekil 4.51 Muz kabuğu biyosensörünün sinnamik asit tayin sınırları……. 74

Şekil 4.52 Muz kabuğu biyosensörü için sinnamik asit standart grafiği…… 74

Şekil 4.53 Taze bakla biyosensörünün sinnamik asit tayin sınırları…… 75

Şekil 4.54 Taze bakla biyosensörü için sinnamik asit standart grafiği…… 75

Şekil 4.55 Muz kabuğu biyosensörünün rezorsin tayin sınırları……. 76

Şekil 4.56 Muz kabuğu biyosensörü için rezorsin standart grafiği……. 76

Şekil 4.57 Taze bakla biyosensörünün rezorsin tayin asit sınırları……. 77

Şekil 4.58 Taze bakla biyosensörü için rezorsin standart grafiği…… 77

Şekil 4.59 Muz kabuğu biyosensörünün kuersetin tayin sınırları…… 78

Şekil 4.60 Muz kabuğu biyosensörü için kuersetin standart grafiği…… 78

Şekil 4.61 Taze bakla biyosensörünün kuersetin tayin sınırları…….. 79

Şekil 4.62 Taze bakla biyosensörü için kuersetin standart grafiği…….. 79

Şekil 4.63 Muz kabuğu biyosensörünün askorbik asit tayin sınırları…….. 80

Şekil 4.64 Muz kabuğu biyosensörü için askorbik asit standart grafiği……. 80

Şekil 4.65 Taze bakla biyosensörünün askorbik asit tayin sınırları……. 81

Şekil 4.66 Taze bakla biyosensörü için askorbik asit standart grafiği…… 81

Şekil 4.67 Muz kabuğu biyosensörü için inhibitör denemeleri…….. 83

Şekil 4.68 Taze bakla biyosensörü için inhibitör denemeleri…….. 84

Şekil 4.69 Muz kabuğu biyosensörü ile kolada fenolik bileşik analizi…….. 85

Şekil 4.70 Muz kabuğu biyosensörü ile portakallı gazlı içecekte fenolik bileşik analizi 85

Şekil 4.71 Muz kabuğu biyosensörü ile beyaz şarapta fenolik bileşik analizi…… 86

Şekil 4.72 Muz kabuğu biyosensörü ile üzüm suyunda fenolik bileşik analizi…….. 86

Şekil 4.73 Muz kabuğu biyosensörü ile birada fenolik bileşik analizi…… 87

Şekil 4.74 Muz kabuğu biyosensörü ile elma suyunda fenolik bileşik analizi…… 87

Şekil 4.75 Taze bakla biyosensörü ile kolada fenolik bileşik analizi…….. 88

Şekil 4.76 Taze bakla biyosensörü ile portakallı gazlı içecekte fenolik bileşik analizi... 88

Şekil 4.77 Taze bakla biyosensörü ile beyaz şarapta fenolik bileşik analizi……. 89

Şekil 4.78 Taze bakla biyosensörü ile üzüm suyunda fenolik bileşik analizi…… 89

Şekil 4.79 Taze bakla biyosensörü ile birada fenolik bileşik analizi……. 90

Şekil 4.80 Taze bakla biyosensörü ile elma suyunda fenolik bileşik analizi……. 90

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 2.1 İletim ve ölçüm sistemleri……... 5

Tablo 2.2 Biyoreseptörlerin sınıflandırılması……. 6

Tablo 2.3 Biyolojik bileşenlerin avantaj ve dezavantajları…… 12

Tablo 2.4 Kateşolün kimyasal ve fiziksel özellikleri……. 20

Tablo 2.5 PPO aktivitesi bakımından taranan dokular ve kullanılan kısımları……. 29

Tablo 3.1 Muz kabuğu biyosensörünün hazırlanması…… 32

Tablo 3.2 Taze bakla biyosensörünün hazırlanması…….. 33

Tablo 4.1 Bitki dokusu temelli biyosensörlerde analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği.. 54

Tablo 4.2 Muz kabuğu biyosensörü için farklı substrat denemeleri……... 82

Tablo 4.3 Taze bakla biyosensörü için farklı substrat denemeleri……. 82

Tablo 4.4 Muz kabuğu biyosensörü ile çeşitli örneklerde fenolik bileşik tayini…… 91

Tablo 4.5 Taze bakla biyosensörü ile çeşitli örneklerde fenolik bileşik tayini…….. 92

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
Cu^{+2}	Bakır (II) İyonu
O_2	Oksijen
H^+	Hidrojen İyonu
Ag	Gümüş
Ag/AgCl	Gümüş / Gümüş Klorür
Pt	Platin
Fe^{+3}	Demir (III) İyonu

Kısaltmalar	**Açıklama**
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatoğrafisi
GC	Gaz Kromatoğrafisi
CZE	Kapiler Zone Elektroforezi
PPO	Polifenol Oksidaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
Phen	Fenantrolin
L-DOPA	Levo Dihidroksifenilalanin
E.C.	Enzim Kodu
UV	Ultra Viole
^{o}C	Santigrad derece
V	Volt
[S]	Substrat konsantrasyonu
mM	Milimolar
m	metre
nm	Nanometre
Cm^2	Santimetrekare
g	gram
mg	miligram
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
dk	Dakika
ΔI	Akım değişimi
I	Akım
nA	Nanoamper

1. GİRİŞ

Tüm canlılar yaşadıkları ortamdaki değişimleri derhal algılayıp yaşamlarını sürdürebilmek için değişimlere uymak zorundadırlar. İşte bu algılama mekanizması biyosensörlerin in vitro uygulaması için temel oluşturmuştur (Coulet, 1991).

Canlılarla ilgili mesajları algılamayı sağlayan sistemlerin, fiziksel analiz sistemleriyle birleştirilmesi biyosensörleri oluşturur. Biyosensörler biyolojik bir sistemin yüksek spesifikliği ile fiziksel bir sistemin tayin duyarlılığının birleştirilmesi ile oluşturulan ölçüm ve analiz sistemleridir (Timur, 2003).

1962 yılında Clark ve Lynos'un kan örneklerindeki glikoz konsantrasyonunun belirlenmesi için fiziksel ölçüm sistemi olarak amperometrik oksijen elektrodunu ve algılayıcı sistem olarak glikoz oksidaz enzimini kullanarak hazırladıkları sistem, tanımlanan ilk biyosensördür (Clark ve Lyons,1962).

Son yıllarda bilim ve teknolojideki hızlı gelişmeler biyosensör kavram ve tanımlarında da önemli genişlemelere yol açmıştır. Canlı yaşamının önemli unsurlarından olan görme, işitme, koklama, tat alma, dokunma gibi algılama mekanizmaları doğal ve en mükemmel biyosensörik sistemler olarak düşünüldükleri için biyosensör çalışmalarına güzel örnekler oluşturmaktadırlar. Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyebilen sensörler hazırlanabilirken, sisteme biyomateryalin de katılmasıyla diğer birçok maddenin tayini mümkün hale gelmiştir.

Biyosensörler; tıp, tarım, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma ve birçok endüstriyel aktivitede özellikle otomasyon, kalite kontrolü, durum tespiti ve enerji saklanmasında çok önemli rol oynarlar. Ayrıca, gıda maddeleri, metabolitler, vitaminler, antibiyotikler, ilaçlar gibi organik maddeler, bazı anorganik bileşikler, enzimler, virüsler ve mikroorganizmaların tayininde de kullanılırlar (Telefoncu, 1999).

Doğal bitkisel bileşiklerin en büyük sınıfı olan fenolik bileşikler, bitkilerde farklı fonksiyonları üstlenmişlerdir. Örneğin, ligninlerin bir yapı elementi olarak hücre duvarındaki işlevi, antosiyaninlerin birçok çiçek cinsinin renk pigmenti olarak işlevi ve

flavanoidlerin antioksidan ve bitkileri enfekte edicilere karşı koruma işlevleri bilinmektedir.

Bitki biyokimyasına göre de bitki fenolleri insan beslenmesinde de önemlidirler. İnsan diyeti için de önemli bir yere sahip olan bitkiler ve bitkilerden hazırlanan hazır gıdaların çoğu bu bileşikleri bünyesinde bulundururlar. Bazı fenolik bileşikler antioksidan etkili olduklarından bitkisel ağırlıklı beslenme ile fenolik bileşiklerin yoğun alınmasından dolayı radikal oluşumunu azaltarak kanser ve damar hastalıkları riskini düşürürler (Sağıroğlu, 2003). Bu bakımdan gıdalarda ve içeceklerde fenolik bileşiklerin güvenilir ve pratik yöntemlerle tayin edilmesi çok önemlidir.

Günümüzde fenolik bileşiklerin tayinine yönelik olarak, kromatografik, spektrofotometrik ve enzimatik yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bunlar pahalı kimyasal ve cihazlara gereksinimi olan zaman alıcı yöntemlerdir. Son yıllarda bu tür bileşiklerin analizleri için pratik ve çabuk sonuç veren biyosensörik metotlara olan ilgi giderek artmaktadır. Özellikle saf enzim biyosensörlerinin yerine uygun enzimleri içeren doku biyosensörlerinin tercih edilmesi pratik ve ekonomik olması bakımından avantajlı görünmektedir.

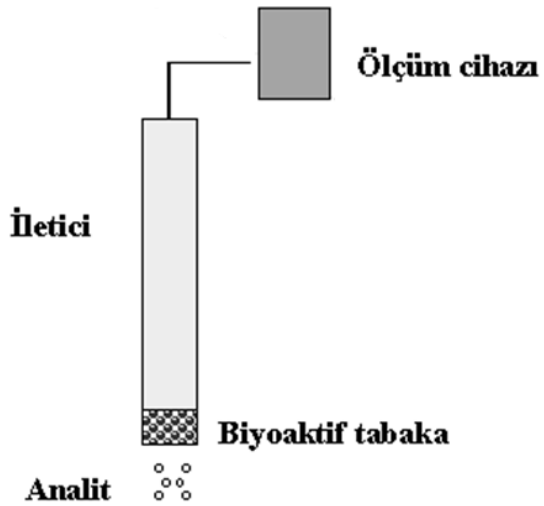
Bu doktora çalışmasının amacı; polifenol oksidaz enzimini yüksek oranda bulunduran dokuların kullanılmasıyla, fenolik bileşiklerin tayinine yönelik hazırlanması kolay, ucuz, pratik uygulamaya olanak sağlayan, güvenilir ve hassas amperometrik esaslı biyosensörlerin oluşturulması ve hazırlanan bitkisel doku temelli biyosensörlerin karakterizasyonu, optimizasyonu ve uygulanabilirliğinin incelenmesidir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Biyosensörler

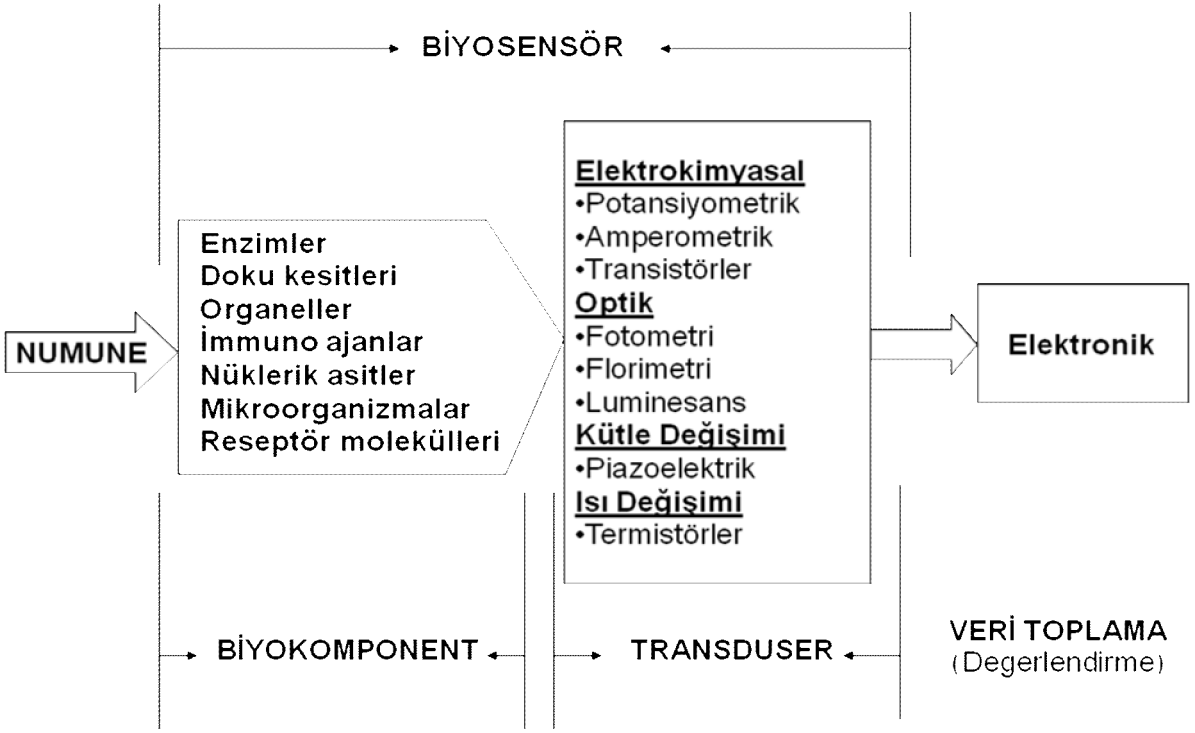
2.1.1 Biyosensörlerin yapısı ve fonksiyonu

Biyosensörler; biyobileşenler ile fiziksel bileşenlerin kombine kullanılmasıyla oluşturulurlar. Biyosensörün temel görevi, biyolojik bir olayın elektrik sinyaline dönüştürülmesidir. Şekil 2.1'de bir biyosensörün kısımları gösterilmiştir. Sistemin özelliklerine bağlı olarak bir biyosensör; yükseltici, mikro işlemci, dijital görüntüleyici gibi kısımları bulundurabilir.



Şekil 2.1 Biyosensörlerin şematik gösterimi

Biyosensörlerde biyolojik bileşen olarak kullanılan maddeler analizi yapılacak olan madde ile etkileşime girerler ve bu etkileşim sonucu meydana gelen değişimler fiziksel bileşen tarafından tespit edilir ve sonuçlar elektriksel bir sinyale çevrilir. Şekil 2.2'de biyosensörlerde kullanılabilecek tüm bileşenler toplu halde gösterilmiştir.



Şekil 2.2 Biyosensörlerin bileşenleri

2.1.2 Fiziksel bileşenler

Fiziksel bileşenin görevi, biyolojik sistemin fonksiyonunu tanımlanabilir hale getirmektir. Bir biyosensör sisteminde kullanılacak olan fiziksel sistem biyokimyasal reaksiyon sonunda oluşan değişimin türüne göre seçilir. Amperometrik ve potansiyometrik ölçümlerde farklı elektrot türleri kullanılabilir, O_2 elektrodunda çözünmüş oksijen , pH elektrodunda H^+ iyonu belirlenir. Optik sensörlerde hedef; ışık, piezoelektrik sensörlerde kristalin salınım rezonansının kütle yüklenimi nedeniyle değişimi, termal biyosensörlerde ise enerji değişimleridir (Sharma vd., 2003, Velasco-Garcia ve Monttram, 2004). İletim ve ölçüm sistemleri Tablo 2.1' de toplu halde gösterilmiştir.

Tablo 2.1 İletim ve ölçüm sistemleri

İLETİM VE ÖLÇÜM SİSTEMLERİ			
Elektrokimyasal esaslı	**Optik esaslı**	**Kalorimetri esaslı**	**Piezoelektrik esaslı**
Amperometri Potansiyometri Yarı iletken	Fotometri Florumetri Biyolüminesans	(Termistörler)	(Piezoelektrik kristaller)

Bu doktora tezi kapsamında hazırlanmış olan bitkisel doku temelli biyosensörler; elektrokimyasal esaslı sensörlerden amperometrik biyosensörlerdir. Amperometri genel anlamda sabit bir potansiyelde devreden geçen akım miktarının ölçülmesini esas alır. Sistem üç farklı elektrottan oluşur. Söz konusu akım yoğunluğu biyolojik bileşeni içeren çalışma elektrodunda yükseltgenen ya da indirgenen elektroaktif türlerin konsantrasyonunun bir fonksiyonudur. İkinci elektrot Ag/AgCl referans elektrottur. Kalibrasyondan sonra akım yoğunluklarından ilgili türlerin konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılır, üçüncü elektrot ise Pt karşıt elektrottur (Yıldız, 1999, Killard ve Smith, 2000).

2.1.3 Biyolojik bileşenler

Biyosensörlerin yapısında yer alan biyolojik bileşenler genellikle biyoreseptör olarak adlandırılır. Bunların içinde en yaygın olarak kullanılanları enzimler ve antikorlardır. Enzim-substrat ve antikor-antijen arasındaki etkileşimin ilk adımı analitlerin protein molekülüne bağlanmasıdır. Hidrolazlar dışındaki enzimler koenzim yokluğunda sadece substratı kendilerine bağlarlar. Aynı durum inhibitörler için de geçerlidir. Son yıllarda geliştirilen katalitik antikorlar yalnızca antikoru bağlamakla kalmaz, kimyasal bir dönüşümü de katalizlerler. Tek bir enzimle istenilen maddenin analizi gerçekleştirilemiyorsa ikili veya üçlü enzim sistemlerinin biyolojik bileşen olarak birlikte kullanılmasıyla bienzim ve multi enzim sistemleri oluşturulur. Örneğin,

kreatinin amino hidrolaz, kreatin amino hidrolaz ve sarkonin hidrolaz, kreatinin tayini için, L-malat dehidrojenaz ve salisilat hidrolaz malat tayini için ve glikoz-6-fosfat dehidrojenaz ve salisilat hidrolaz, glikoz-6-fosfat tayini için birlikte kullanılmıştır (Graoviç vd., 1998, Tombach vd., 2001, Cui vd., 2006).

Biyolojik membranlar içerisine yerleştirilmiş kimyasal reseptörler ise hücre metabolizması tarafından yönlendirilir ve biyolojik aktif maddeler tarafından kontrol edilir. Bu durum toksinler, ilaçlar, hormonların seçimli tayini için mükemmel bir olanak sağlar. Protein yapılı makromoleküllere ek olarak nükleik asitler ve karbonhidratlar da, genom zincir analizleri ve hücre yüzeyi karakterizasyonu gibi özel alanlarda kullanılan biyosensörlerin yapısına girmektedir.

Aslında biyosensörleri çalışma prensibine göre biyoaffinite reseptörleri ve biyokatalitik reseptörler olmak üzere iki grupta incelemek mümkündür. Tablo 2.2' de biyoreseptörlerin sınıflandırılması gösterilmiştir.

Tablo 2.2 Biyoreseptörlerin sınıflandırılması

BİYOAFFİNİTE SENSÖRLERİ		**BİYOKATALİTİK SENSÖRLER**	
Reseptör	**Analit**	**Reseptör**	**Analit**
Enzim	Substrat-inhibitör	Enzim	Substrat
Apoenzim	Prostetik grup	Mikroorganizma	İlgili enzimin
Antikor	Antijen	Organel	substratı
Reseptör	Hormon	Doku Kesiti	İlgili enzimin
Lektin	Glikoprotein	Katalitik antikor	substratı
	Sakkaritler Protein		İlgili enzimin
			substratı

Biyoaffinite sensörleri; boyalar, lektinler, antikorlar veya hormon reseptörleri matrikse bağlı olarak enzimler, glikoproteinler, antijenler ve hormonların moleküler tanımlanmaları amacıyla kullanılırlar. Biyoaffinite sensörleri analit ile kimyasal bir reaksiyon vermezler ve analiti değişime uğratmazlar. Bağlanma sonucunda tabaka kalınlığı, refraktif indeks, ışık absorbsiyonu ve elektriksel yük gibi fizikokimyasal parametreler değişir ve bu değişimler fiziksel bileşenler tarafından saptanır.

Diğer taraftan enzimler, organeller, doku kesitleri, katalitik antikorları ve mikroorganizmaları kapsayan, biyokatalitik sensörler tarafından gerçekleştirilen moleküler değişimlere analitlerin kimyasal dönüşümü eşlik eder (Telefoncu, 1999).

Biyosensörler biyolojik bileşenin türüne göre enzim sensörleri, doku sensörleri, mikrobiyal sensörler, immuno sensörler ve DNA sensörleri olmak üzere beş sınıfa ayrılırlar.

Yüksek spesifiklikleri nedeniyle enzimler en yaygın kullanılan biyolojik bileşenlerdir. Uygun bir enzim bulunamaması, enzimin kararsız olması veya birden çok maddenin tayini durumlarında doku kesitleri veya mikroorganizmalar kullanılır (Lei vd., 2005). Doku kesitlerinin, ucuz olması ve kolay temin edilebilmesi, enzimin doğal ortamında bulunması gibi avantajları nedeniyle kullanımı gün geçtikçe artmaktadır.

2.1.3.1 Enzim biyosensörleri

Temel bilimlerdeki ilerlemeler enzimlerin yanı sıra diğer biyolojik materyallerin fonksiyonlarının da çok daha ayrıntılı bir şekilde ortaya çıkarılmasına imkan vermiştir. Bu ilerlemelerin doğal bir sonucu olarak farklı biyolojik materyallerin 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 sensörlerinin büyük bir üstünlüğü göze çarpmaktadır. Bu sonucun en büyük nedeni canlı sistemlerle ilgili hemen hemen her türlü maddenin doğrudan ya da dolaylı analizinde binlerce enzimin varlığıdır. Bilinen enzimlerin yanı sıra bilinmeyenlerin potansiyel varlığı, piyasada binlerce enzim preparatının bulunabilirliği ve bu sayının her geçen gün yükselmesi enzim sensörlerinin tartışılmaz üstünlüğünü devam ettireceğinin bir göstergesidir (Dinçkaya, 1999). Enzim sensörlerinin hazırlama ve kullanım kolaylığı, yüksek tekrarlanabilirlik ve yüksek aktivite gibi avantajları yanı sıra enzimlerin mikroorganizma ve doku kesitlerine göre daha pahalı olması dezavantajı da vardır**.** Enzim sensörleri pek çok amaçla kullanıldığı gibi fenolik bileşik analizi için de kullanılmıştır (Wciso vd., 2006, Karakuş vd., 2005, Portaccio vd., 2006, Zhou ve Zhi, 2006).

2.1.3.2 DNA biyosensörleri

Biyosensör tasarımında kullanılan dizi tanıma yüzeyleri, analitik kimya alanında yeni ve ilgi çekicidir (Wang vd., 1997a). Bu tür tanıma yüzeyleri, sahip olduğumuz bilinen elektrokimyasal biyosensörlere yeni boyutlar kazandıracak ve gelecekte doktor gözetimindeki analizlerde önemli bir rol oynayacaktır (Wang vd., 1997b).

Tanıma yüzeyi olarak DNA'nın kullanıldığı biyosensörlere DNA biyosensörleri adı verilir (McGown vd.,1995, Wang vd.,1998). DNA tanıma yüzeyleri, dizisi belli hibridizasyon olaylarının izlenmesinde (Wang vd., 1997c, Meriç vd., 2002) veya bu yüzey ile etkileşime giren analizlenecek maddelerin (karsinojen maddeler, ilaçlar, vb.) tayininde kullanılabilir (Brett vd., 1998).

DNA biyosensörleri ölçüm yöntemine göre optik, elektrokimyasal, piezoelektrik olarak sınıflandırılabilirler (Junhui vd., 1997).

2.1.3.3 İmmunosensörler

Yüksek seçimlilikteki antijen-antibadi etkileşiminden yararlanılarak hazırlanan biyosensörler immunosensörlerdir. Her iki bileşik de diğerinin analizi için biyolojik bileşen olarak kullanılabilir. Bu tip sistemler antijen-antibadi etkileşimine dayandığı için mükemmel seçiciliğe sahiptirler.

İmmunolojik sensörler ile hücreler, sporlar, toksinler, mikroorganizmalar, virüsler, pestisidler ve endüstriyel kirleticiler analizlenebilir (Malhotra ve Chaubey, 2003, Leonard vd., 2003). İmmunosensörlerde elektrokimyasal, optik, kütle ve termal özellikli fiziksel bileşenler kullanılabilir (D'Orazio, 2003).

2.1.3.4 Mikrobiyal biyosensörler

Biyosensör uygulamalarında en yaygın biyolojik materyal olan enzimlerin pahalı olması yanı sıra bazı saflaştırma proseslerine ve ilave kofaktörlere ihtiyaç duyması araştırmacıları alternatif arayışlara yönlendirmiştir (D'Souza, 2001, Freeman ve Lilly, 1998).

Mikrobiyal biyosensörler pek çok bileşiğin analizine uygun olmak, geniş bir pH ve sıcaklık aralığında etkin olmak, genetik modifikasyonlara açık olmak, kofaktörlere ihtiyaç duymamak ve pahalı saflaştırma adımlarını gerektirmemek gibi pek çok avantajından dolayı günümüzde biyosensör uygulamaları için ideal bir duruma gelmiştir (Lei vd., 2005).

Mikroorganizmaların kullanılmasıyla geliştirilen biyosensörlerle başarılı çalışmaların yapılması mikroorganizmaların biyosensör uygulamalarında daha yoğun kullanılmasını sağlamıştır. Çok çeşitli bileşiklerin analizleri yanında fenolik bileşikler için de mikrobiyal biyosensör çalışmaları yapılmıştır (Abdullah vd., 2005, Mulchandani vd., 2005, Kochana vd., 2008).

2.1.3.5 Doku biyosensörleri

İlk defa 1981 yılında bitkisel doku temelli biyosensör hazırlanmasından bu yana birçok bitkisel doku temelli biyosensör geliştirilmiştir. Bitkisel doku temelli biyosensörlerin çoğu potansiyometrik ve amperometrik elektrotlar ya da bu sistemlerin oksijen, azot gibi gaz duyar elementlerle birleştirilmesiyle oluşturulmaktadır. Bitkisel doku kullanılarak hazırlanan biyosensörler, izole enzimler kullanılarak hazırlanan biyosensörlere iyi bir alternatiftir (Sidwell ve Rechnitz, 1986). Hayvansal ve bitkisel dokular ve organeller bazı enzimlerce oldukça zengindirler. Bu enzimlerin izole edilmiş saf halleri yerine direkt olarak bulundukları dokular biyosensör hazırlanmasında kullanılır (Telefoncu, 1999).

Doku biyosensörlerinde enzim saflaştırılma zorunluluğu yoktur, ayrıca doku biyosensörleri bazı enzimler için doğal ortamda artan kararlılık ve düşük maliyet gibi avantajlara sahiptirler (Wang ve Naser, 1991). Doku kesitleri kullanıldığında biyosensörün cevap süresi genellikle uzundur. Bu süreyi kısaltmak için doku ezilip homojenize edildikten sonra kullanılmalıdır (Macholan,1987).

İlk doku temelli sensörün yapımından günümüze kadar avantajları nedeniyle pek çok analitin kantitatif tayinine yönelik bitkisel doku temelli biyosensör geliştirilmiştir

(Sezgintürk ve Dinçkaya 2004b, Akyılmaz ve Dinçkaya, 2000, Fatibello-Filho vd., 2001, Vieria ve Fatibello-Filho, 2000).

Gerek atık sular gibi çevresel konular için gerekse şarap gibi gıda maddelerinde fenolik bileşiklerin tayini amacıyla başarılı doku biyosensörleri hazırlanmıştır (Topcu vd., 2004, Gomes vd., 2004, Timur vd., 2003, Gutes vd., 2004, Portaccio vd., 2006, Odacı, vd., 2004).

Doku temelli biyosensör hazırlanırken kullanılacak olan doku, ölçümü yapılacak olan analit ile ölçülebilir bir sinyal oluşturacak olan enzimatik reaksiyonu gerçekleştirecek enzim yada enzimleri yüksek aktivitede içermelidir. Bu amaçla bu doktora tezi çalışmasında polifenol enzimini aktif olarak fazla miktarda bulunduran anamur muzu kabuk dokusu ve taze bakla dokusu seçilmiştir.

2.1.4 İdeal bir biyosensörde istenilen özellikler

Seçicilik: İdeal bir biyosensörde en önemli parametrelerden birisi seçicilik özelliğidir. Eğer yeterli seçicilik mevcut değilse bu eksiği giderecek uzun ek işlemler gerekir.

Kullanım Ömrü: Biyosensörün kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli faktör biyolojik çeviricinin aktivitesindeki azalmadır. Ayrıca bu durum biyosensörün kalibrasyon sıklığı, stabilite, tekrarlanabilirlik gibi diğer parametrelerini de etkilemektedir.

Kalibrasyon Gereksinmesi: İdeal bir biyosensörün hiç kalibrasyona gerek duymaması ya da en az kalibrasyona gereksinmesi istenir. Fakat bu özellik, teorikte planlandığı gibi, pratikte gerçekleştirilememiştir. Kullanım ömürleri boyunca biyosensörler, sıklıkla kalibre edilmelidirler.

Tekrarlanabilirlik: İdeal bir biyosensör için, elektrodun aynı koşullar altında arka arkaya yapılan ölçümlerde hemen hemen aynı sonuçların okunması istenir. Pratikte pek mümkün olmayan bu durum göz önüne alınarak yapılan çalışmalarda tekrarlanabilirlik parametresi mutlaka incelenmelidir. Tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa biyosensörün uygulamalarının da o denli iyi olduğundan söz edilebilir.

Stabilite: Elektrot stabilitesinin (kararlılığının) yüksek olması ideal biyosensörler için gereklidir. Stabilite, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır. Ayrıca; pH, ısı, nem, ortam, O_2 derişimi gibi parametrelerden de etkilenmektedir.

Yüksek duyarlılık: Biyosensöre immobilize edilmiş biyolojik materyalin yalnız belirli maddelere karşı duyarlı olması ideal biyosensörlerin özelliklerindendir.

Yeterli düzeyde tayin sınırı: Tasarlanan bir biyosensörün tayin sınırının belirli bir derişim değerinin altında olması gerekmektedir. Belirtilen bu sınır, elektrot yüzeyinin büyüklüğü, biyolojik materyalin tayin edilecek maddeye affinitesi, immobilize edilen madde miktarı gibi faktörlerden etkilenir.

Geniş ölçüm aralığı: Biyosensör uygulamalarında ölçüm aralığı olarak adlandırılan bölge biyosensörlerden alınan akım-derişim eğrilerinin lineer olduğu derişim aralığıdır.

Hızlı cevap zamanı: Bir biyosensör elektrodunun cevap zamanı elde edilen akım-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.

Hızlı geriye dönme zamanı: Geriye dönme zamanı örneğin amperometrik çalışmalarda ilk örnekten ne kadar süre sonra ikinci örneğin ölçülebileceğini belirler. Yani ilk örneğin ilavesinden sonra sabit akım değerleri kısa sürede gözlenebiliyorsa ikinci örnek de aynı süre sonra ilave edilebilecektir.

Basitlik ve ucuzluk: Tasarımı basit ve ucuz, kullanımı rahat biyosensörler ideal biyosensörlerdir. Bu nedenle ilk biyosensörlerdeki karmaşık ve de pahalı olan yapılar daha sonra basitleştirilmiş ve mümkün olduğunca da maliyeti düşürülmüştür.

Küçültülebilirlik ve sterilize edilebilirlik: Elektrotlarının sterilize edilebilmesi ve boyutlarının küçültülmesi biyosensör tasarımında önemlidir. Buna karşın, biyosensör yapısına giren biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, sterilizasyonu kısıtlayan en önemli parametredir.

Doğal olarak tüm biyosensörlerin bu özelliklerin hepsine sahip olması olası değildir. Ancak doğru, duyarlı ve tekrarlanabilir sonuçlar kesinlikle olması gereken özelliklerdir.

Bunların dışındaki parametrelerdeki değişiklikler hazırlanan biyosensörün diğer yöntemlere göre avantaj ve dezavantajları olarak yorumlanır (Telefoncu, 1999).

2.1.5 Biyobileşenlerin birbirlerine göre kıyaslanması

Biyosensör hazırlanması amacıyla kullanılan mikroorganizmalar, dokular ve saf enzimlerin birbirlerine kıyasla farklı avantaj ve dezavantajları vardır. Bu durum Tablo 2.3'de toplu olarak gösterilmiştir.

Tablo 2.3 Biyolojik bileşenlerin avantaj ve dezavantajları

Kaynak	Avantajlar	Dezavantajlar
Saf Enzimler	• Yüksek spesifiklik • Difüzyon sorunu yok • Hızlı analiz süresi • Kullanım miktarı az	• Pahalı • Aktivatör ya da kofaktöre ihtiyaç var • Kararlılığı düşük • İmmobilizasyon problemli • Kullanım süresi kısa
Doku Kesitleri	• Yüksek kararlılık • Yüksek aktivite • Kullanım kolaylığı • Kofaktör ya da aktivatör gerektirmez • Çoklu enzim sistemi kullanımı	• Difüzyon sorunu vardır • Daha uzun analiz süresi • Mikroorganizma üremesine açık • Gaz geçirgenliği az
Mikroorganizmalar	• Mekanik dayanıklılık • Hazırlama kolaylığı • Yüksek aktivite • Çoklu enzim sistemi kullanımı • Yüksek kararlılık • İstenilen yönde geliştirebilme	• Difüzyon sorunu vardır • Daha uzun analiz süresi • Mikroorganizma üremesine açık • Gaz geçirgenliği az • Mikroorganizma ölmesi ya da üremesi

2.1.6 Biyolojik bileşenlerin immobilizasyonu

Uygun biyolojik bileşen ve fiziksel ölçüm sistemi seçildikten sonra bunların en uyumlu ve işlev görecek şekilde birbirlerine bağlanmaları gerekir. Bu bağlanma işlemi biyolojik bileşenin immobilizasyonu olarak adlandırılır. Bu amaçla çok değişik yöntemler kullanılabilir. Hangi yöntemin kullanılacağı seçilen biyolojik ve fiziksel bileşenin türüne göre belirlenir.

İmmobilizasyon, biyosensörün kararlılığı ve tekrar kullanımı açısından büyük avantajlar sağlar. Biyolojik bileşenin immobilizasyonu için başlıca beş yöntem kullanılır. Bu yöntemler klasik enzim immobilizasyon yöntemlerini esas almaktadır (Telefoncu,1997).

a) **Kovalent bağlama**: Biyolojik bileşenin doğrudan fiziksel ölçüm sisteminin yüzeyine ya da uygun bir film veya tabaka ile kaplanmış fiziksel bileşene kimyasal bir reaksiyon sonucu kovalent bağlanmasıdır.

b) **Tutuklama:** Biyolojik bileşenin polimer jel matrikslerde ya da basitçe dializ membranlarda hapsedilmesidir. Tutuklama yoluyla immobilizasyonda polimerleşme biyolojik bileşen varlığında gerçekleştirilebilir, bu durumda polimerleşme ve tutuklama aynı anda yapılmış olur.

c) **Çapraz bağlama:** Tutuklama yöntemi ile kimyasal bağlanmanın birleştirilmiş şekli olarak uygulanır. Tutuklama ile hapsedilmiş biyolojik bileşen glutaraldehit, hegzametilen, diizosiyanat veya difloronitrobenzen gibi bifonksiyonel reaktiflerle film, tabaka, destek materyal ya da tutuklama ajanına kovalent olarak bağlanır.

d) **Adsorpsiyon:** İmmobilizasyonda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Biyolojik bileşenin film yada tabaka ile hidrofilik, hidrofobik veya iyonik etkileşim sonucu yüzeyde tutulmasıdır. Güvenilirliği diğer yöntemlere göre daha azdır.

e) **Biyolojik bağlama:** Biyolojik bileşenin film veya tabakaya spesifik biyokimyasal bağlama ile tutturulmasıdır.

Bu doktora çalışmasında hazırlanmış olan bitki dokusu temelli biyosensörlerde immobilizasyon işlemleri tutuklama ve çapraz bağlama işlemlerinin kombine kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla tutuklayıcı kimyasal olarak jelatin, çapraz bağlayıcı olarak ise glutaraldehit kullanılmıştır.

Jelatin; Kollajenin hidroliziyle elde edilen bir proteindir. Jelatinin karakteristik özelliği, glisin, prolin ve hidroksiprolin aminoasitlerini yapısında çok bulundurmasıdır. Yapısı genel olarak tekrarlayan glisin-X-Y triplet yapısını içerir ve genel olarak X prolin Y ise hidroksiprolindir. Bu amino asitler, jelatinin üçlü bir heliks yapı oluşturmasında ve jelleşme özelliği kazanmasında oldukça etkilidir. Jelatin oda sıcaklığında katıdır, tamponda çözülüp ısıtıldıktan sonra oda sıcaklığına getirildiğinde jöle kıvamını alır. Bu özelliğinden dolayı iyi ve kolay kullanılabilir bir immobilizasyon materyalidir. (Rose vd., 1987).

Ucuz ve kolay bulunabilir olmasının yanında, immobilizasyon için kullanılan polisakkaritlerin aksine jel oluşumu için herhangi bir moleküle, iyon ya da pH ayarlanmasına gerek duymaz. Bu nedenle de enzim, hücre ve doku immobilizasyonunda sıkça kullanılır.

Jelatin eğer biyomateryal olarak kullanılmak isteniyorsa çapraz bağlı olmak zorundadır. Son zamanlarda jelatin filminin çapraz bağları fiziksel olarak termal ısı ve ultraviyole ışınlar yardımıyla oluşturulmaktadır. Jelatinin çapraz bağları kimyasal olarak ise formaldehit, glutaraldehit, suda çözünen karbodiimid, diepoksi bileşenleri, diizosiyanatlar gibi çapraz bağlayıcı ajanlar kullanılarak elde edilir. Biyosensör çalışmalarında ise termal ve mekanik kararlılığının arttırılması amacıyla immobilizasyonda çoğunlukla çapraz bağlayıcı glutaraldehit ile birlikte kullanılır (Sezgintürk vd.,2005, Odacı, vd., 2004, Espisito, vd., 1995).

Glutaraldehit; Virüs ve bakterilere karşı tıpta yaygın olarak kullanılan renksiz, sıvı bir dezenfektan ve sterilizasyon kimyasalıdır. Aynı zamanda elektron mikroskoplarında doku belirleyici olarak da kullanılmaktadır (HSDB, 1996, Thomas ve Russel,1974).

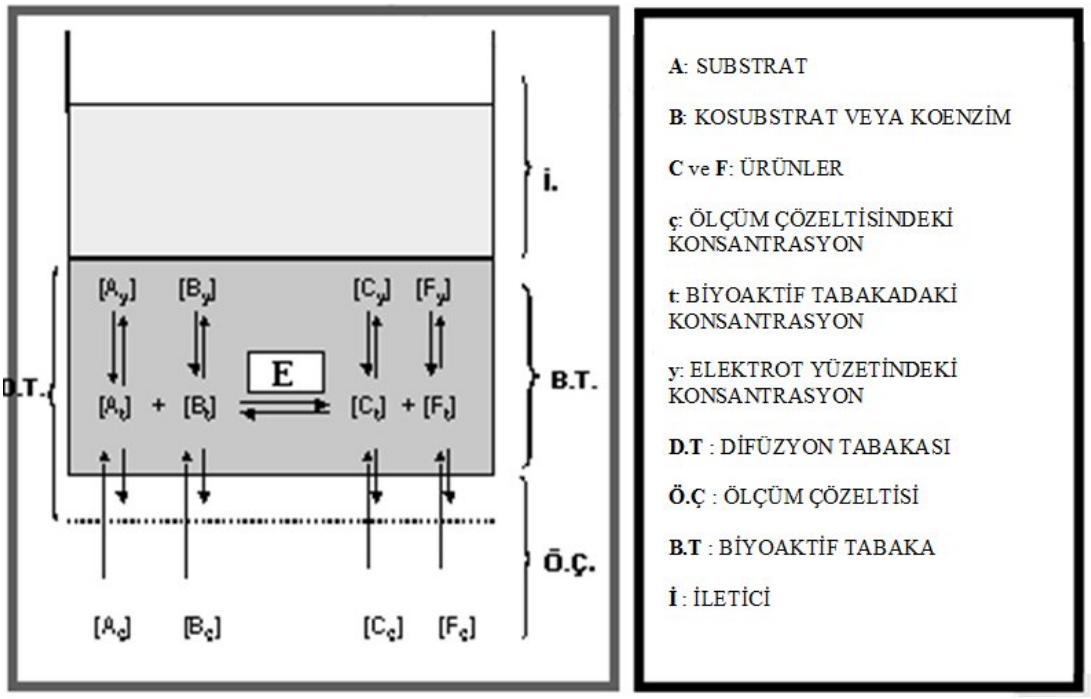
Glutaraldehit özellikle enzimlerin kovalent immobilizasyonunda sıkça kullanılan homo bifonksiyonel bir kimyasaldır. Homo bifonksiyonel maddeler, proteindeki lizin

kalıntısının amino grupları gibi primer aminlerle spesifik olarak etkileşime girerler. Suda ve benzen, alkol gibi susuz ortamda kararlı ve çözünebilir olması nedeniyle kullanımı çok yaygındır (Kapoor, 1996).

Biyosensör geliştirilmesinde kullanılan enzim, mikroorganizma ve doku kesitleri gibi biyolojik bileşenlerin, kolajen, kitosan, jelatin ve karragenan gibi biyolojik moleküllerle birlikte glutaraldehit ile çapraz bağlar oluşturması esasına dayalı immobilizasyon yöntemi oldukça sık kullanılmaktadır (Sezgintürk ve Dinçkaya 2004a, Akyılmaz ve Dinçkaya, 2000). Yöntem kolay uygulanabilir ve genellikle sistemin termal, işlem ve depo kararlılıklarını da arttırmaktadır.

2.1.7 Biyosensörlerin genel çalışma ilkesi

Bir biyosensörün çalışma ilkesinin anlaşılabilmesi için biyolojik bileşenin immobilize edildiği biyoaktif tabakadaki olayların anlaşılması gerekir. Biyolojik bileşen olarak saf enzim, mikroorganizma ve doku kesiti kullanılması durumlarında biyokimyasal reaksiyonun gerçekleşmesi enzim tarafından sağlanır. Şekil 2.3'de bu tür bir biyosensörün çalışma ilkesi gösterilmiştir.



Şekil 2.3 Biyosensörlerin genel çalışma ilkesi

Şekil 2.3’ de görüleceği gibi enzimi içeren biyoaktif tabaka, enzimin katalizlediği reaksiyona uygun bir iletim ve ölçüm sisteminin uzantısı olan bir iletici ile birleştirilmiştir. İletim sistemi biyoaktif tabakada gerçekleşen enzimatik reaksiyon sonucu substrat ve kosubstrat konsantrasyonundaki azalışı ya da ürün konsantrasyonundaki artışı tespit edebilecek şekilde seçilir. Konsantrasyonların hızlı bir şekilde dengeye ulaşabilmesi için difüzyon engelini en aza indirmek amacıyla tabaka kalınlığının mümkün olduğu kadar ince ayarlanması gerekmektedir. Bunun yanı sıra biyoaktif tabakada sabit bir substrat konsantrasyonu sağlayabilmek için ölçüm çözeltisinin biyoaktif tabakaya zarar vermeyecek yeterli hızda karıştırılması gerekir. Doğal olarak tayini yapılacak ürünlerin ölçüm çözeltisindeki, biyoaktif tabakadaki ve biyoaktif tabaka-iletici ara yüzeyindeki konsantrasyonları farklı olur. İletici sistemin ölçeceği sinyal biyoaktif tabaka-iletici ara yüzeyindeki konsantrasyonlara ilişkindir. Ancak söz konusu konsantrasyonlar denge halinde ölçüm çözeltisindeki konsantrasyonlarla orantılı olduğu için genellikle bağıl bir yolla sonuca ulaşılır (Dinçkaya, 1999).

2.2 Fenolik Bileşikler

Fenolik maddeler bitkisel doğal bileşiklerin geniş bir kısmını kapsar, en az bir aromatik halka ve halkada çok miktarda hidroksil grupları bulunduran bileşiklerin tümüne denir. Fenolik bileşikler, suda çözünebilirler, şekerlerle glikozidler şeklinde çok sıkı bir şekilde birleşmiş halde olurlar ve genellikle hücrenin vakuollerine yerleşmişlerdir. Bir milyonun üzerinde nötral fenolik bileşik yapısı olduğu bilinmektedir.

Bitkilerdeki fenolik bileşiklere ait ilk modern sınıflandırma; basit fenolleri, fenolik asitleri, sinnamik asitleri, kumarinleri, izokumarinleri, lignanları, flavanoidleri, ligninleri, tanninleri, benzofenonları, ksantonları, stilbenleri, kinonları ve betasiyaninleri içermektedir (Harborne, 1964).

Fenolik ve polifenolik terimi kimyasal olarak kısaca, sahip olduğu aromatik halkada çeşitli fonksiyonel grupları (ester, metil esteri, glukozid vb.) taşıyan, ek olarak hidroksil grubu bulunduran maddeler olarak tanımlanırlar. Çoğu fenolik bileşik iki veya daha

fazla hidroksil grubu bulundurur. Bitkisel fenolik bileşikler iki yolla oluşurlar (Dey ve Harborne, 1989).

1- Doğrudan hidroksi sinnamik asit ve kumarinler gibi fenil propanoidleri veren şikimik asit yolu
2- Pek çok kinonların ve basit fenollerin oluştuğu poliketit yolu

Fenolik bileşiklere bakterilerde, alglerde ve mantarlarda sık rastlanmaz. Gosipetin türevi olan klorflovanin *Aspergillus candidus* mantarı tarafından üretilmesine rağmen, aslında flavanoidler mantarlarda hemen hemen hiç bulunmazlar (Harborne, 1964).

2.2.1 Antioksidan etkili fenolik bileşikler

Bitki dokularında gerçekleşen oksidatif bozunmalar yağların parçalanmasına, acılaşmaya, kötü tat ve kokuların oluşmasına ve ürünün raf ömrü ve besin değerini azaltan diğer reaksiyonlara neden olur. Antioksidanlar, oksidasyondan kaynaklanan acılaşmayı ve diğer tat bozulmalarını geciktirme veya önleme özelliğine sahip olan maddelerdir (Meyer vd., 2000, Heinonen, 2002, Maslarova, 2001).

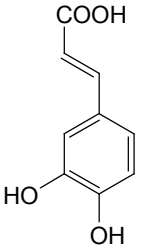
Meyve antioksidanları, dokuları stres ve çeşitli hastalıklara karşı korumaktadırlar. Hasat sonrası hastalıklara karşı direnç, fitoaleksinler ve proantosiyanidinler gibi bazı spesifik bileşikler ile arttırılabilmektedir (Zavala vd., 2004). Meyve ve sebzeler, farklı biyoaktif özellikler gösteren çok sayıda fitokimyasalı içermektedir. Doğal antioksidanlar, bitki ve hayvan dokularında bulunan veya bitkisel ve hayvansal kaynaklı bileşiklerin pişirilmesi ya da işlem görmesi sonucu oluşan maddelerdir. Hemen hemen tüm bitkilerde, bazı mikroorganizmalarda ve bazı hayvansal dokularda bulunurlar. Doğal antioksidanların büyük çoğunluğu fenolik bileşiklerdir ve en önemlileri arasında tokoferoller, askorbik asit, flavonoidler ve fenolik asitler bulunmaktadır (Meyer vd., 2000, Heinonen, 2002, Maslarova, 2001).

Antioksidanların oksidatif stres sonucu oluşan dejeneratif ve yaşla ilgili çeşitli hastalıkları önlemedeki rolü deneysel, klinik ve epidemiyolojik çalışmalar ile ortaya konmaya başlandıkça antioksidanlar daha da çok önem kazanmaya başlamışlardır.

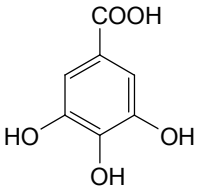
Yapılan çeşitli epidemiyolojik çalışmalarla yüksek miktarda meyve ve sebze tüketiminin kanser ve kalp damar hastalıkları riskini düşürdüğü gösterilmiştir. (Shi vd., 2001)

En sık tüketilen sebzelerin içerdiği antioksidanlar arasında askorbik asit, tokoferoller, karotenoidler, flavanoller ve fenolik asitler gibi fenolik bileşikler sayılabilmektedir. Ancak meyvelerle karşılaştırıldığında sebzelerin genellikle daha düşük oranda antioksidan bileşik içerdikleri bilinmektedir (Heinonen, 2002).

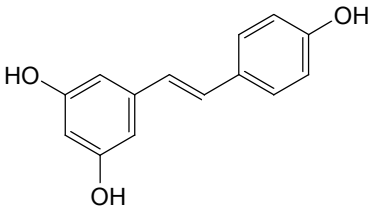
Meyvelerde bulunan başlıca antioksidanlar C vitamini, organik asitler, fenolik asitler, flavanoidler, antosiyaninler ve karotenoidlerdir. Meyvelerin antioksidatif aktivitesi ile ilgili veriler kullanılan oksidasyon sistemlerine ve analiz metotlarına göre farklılık göstermektedir (Meyer vd., 2000). Antioksidan etkili bazı fenolik bileşiklerin formülleri Şekil 2.4'de gösterilmiştir.



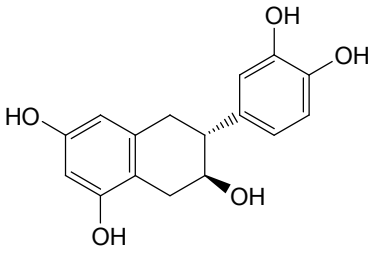
kafeik asit



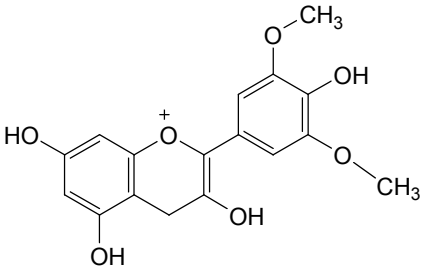
gallik asit



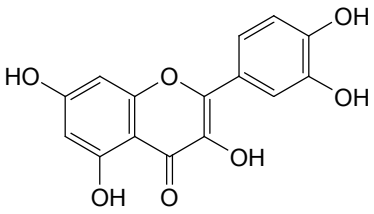
trans-resveratrol



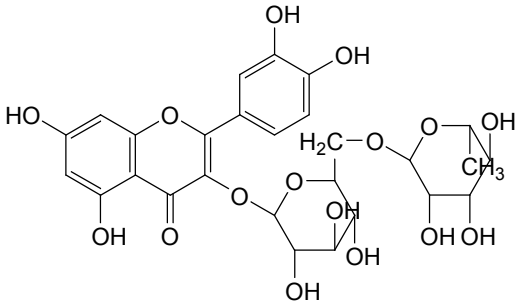
katesin



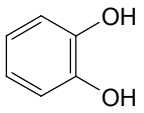
malvidin



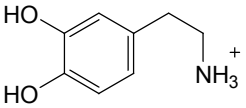
quersetin



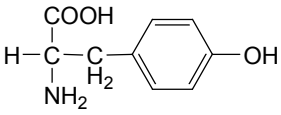
rutin



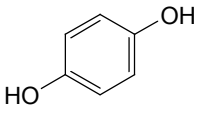
katesol



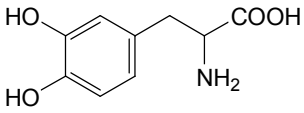
dopamin



tirozin



hidrokinon



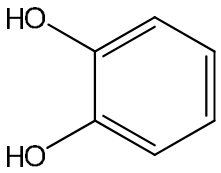
DOPA (dihidroksifenilalanin)

Şekil 2.4 Bazı fenolik bileşikler

2.2.2 Kateşol

Genellikle kateşol olarak bilinen pirokateşol $C_6H_6O_2$ formülüne sahip bir organik bileşiktir. Üç izomerik benzen-diolden biridir. Bu renksiz bileşik doğal olarak meydana gelir. Peptisitlerin, çeşnilerin (tatların) ve güzel kokuların öncüsüdür (http://en.wikipedia.org/wiki/Catechol).

Şekil 2.5'de kateşolün kimyasal formülü, Tablo 2.4'de de kateşolün kimyasal ve fiziksel özellikleri gösterilmiştir.



Şekil 2.5 Kateşolün kimyasal yapısı

Tablo 2.4 Kateşolün kimyasal ve fiziksel özellikleri

IUPAC İsmi	● pirokateşol
Diğer isimleri	● Kateşol ● Benzen 1,2-diol ● 2-Hidroksi fenol ● α- Hidroksi fenol ● o- Hidroksi fenol ● o-benzen diol ● 1,2-dihidroksi benzen ● Pirokateşin
Molekül formülü	● $C_6H_6O_2$
Molekül ağırlığı	● 110,11 gr/mol
Görüntüsü	● Beyaz-katı
Yoğunluğu	● 1,344 gr/cm^3
Erime noktası	● 105 ^{0}C
Kaynama noktası	● 245,5 ^{0}C
Sudaki çözünürlüğü	● 43 g/100ml
Asiditesi (pKa)	● 9,5

Kateşol çok farklı endüstrilerde kullanım alanı bulmuş bir fenolik bileşiktir. Bu endüstri dallarından bazıları şöyle sıralanabilir; tıp (kanama durdurucu, antiseptik olarak), fotoğraf, elektro kaplama prosesleri ve diğer bazı kimyasalların üretimidir.

1,2- benzendiol olarak da bilinen kateşol, mycorrhiza (kök mantarı) ve Douglas pine de (*Pinaceae* ailesinden bir çam türü) ince bir tabaka halinde (tannin katmanı içinde); meşe ve söğütlerin dal ve yapraklarında doğal olarak bulunur. Elma, patates ve rafine zeytinyağı gibi çeşitli yiyeceklerde de bulunmaktadır (Brenes v.d, 2004, Sternitzke v.d., 1992, Singh v.d., 1994, McDonald v.d. , 2001).

Bu doktora çalışmasında kateşol, fenolik bileşik tayininde standart olarak kullanılmıştır. Fenolik bileşikler, bitkisel bileşiklerin en geniş sınıflarından biri olduğu göz önüne alındığında, bir kaynaktaki fenolik bileşiklerin miktarının tek tek belirlenmesi oldukça zaman alıcı ve zor bir işlem olduğu açıktır. Bu nedenle pek çok fenolik bileşik tayin yöntemi standart bir fenolik bileşiği baz alarak sonuca ulaşır. Bu amaçla en çok kullanılan standart fenolik bileşiklerden biri de kateşoldür.

2.2.3 Fenolik bileşiklerin tayin yöntemleri

Fenolik bileşiklerin tayini; spektrofotometrik, florometrik, HPLC, GC ve enzimatik esaslı olmak üzere farklı yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Son yıllarda bu metotlara ek olarak biyosensörlere dayalı ölçüm yöntemlerinde hızlı bir gelişme gözlenmektedir.

2.2.3.1 Spektrofotometrik yöntemler

Folin-Ciocalteu Yöntemi

Toplam fenolik bileşik tayini için uygulanan kimyasal bir yöntemdir. Folin tarafından geliştirilen bu yöntemin prensibi; folin reaktifinin indirgenmesiyle renk değişiminin 660 nm de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (Gamez-Meza vd., 1999).

1-10 Fenantrolin Yöntemi

Redoks reaksiyonları ile oluşturulan renkli reaksiyon ürünleri spekrofotometrik ölçümlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Fe^{+3}/1-10 fenantrolin sistemi (Fe^{+3}/Phen) indirgen özelliklere sahip maddeler için önemli bir reaktiftir. Çünkü son ürün yoğun renkli ekstrakte edilebilen bir şelat olan [$Fe(Phen)_3$] dir. Fenoller indirgen özellik gösterdiğinden bu reaktif sistemi ile koyu renkli bileşikler verir. Çeşitli fenollerin Fe^{+3}/Phen ile spektrofotometrik tayinleri üzerine çalışmalar yapılmıştır (Gonzalez v.d, 2003).

2.2.3.2 Kromatografik yöntemler

Fenolik bileşiklerin tayini amacıyla yüksek basınç sıvı kromatografisi ve gaz kromatografisi gibi değişik kromatografik yöntemler kullanılmaktadır.

Yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC)

HPLC, çevre ve besin örneklerinde fenolik bileşiklerin tayini için sıkça kullanılmaktadır. HPLC metotlarının oldukça hassas ve spesifik olması gibi önemli avantajları yanında, zaman alıcı bazı ön işlemlere ve pahalı sistemlere ihtiyaç duyması gibi dezavantajları da vardır. Buna yönelik bir çalışmada bazı elma türlerinde ve elmadan elde edilen ürünlerde bulunan fenolik bileşikler HPLC kullanılarak belirlenmiştir (Markowski ve Plorcharski, 2006).

Kapiler elektroforez

Elektroforez, iletken bir çözelti içindeki yüklü-yüksüz parçacıkların veya moleküllerin bir elektriksel alan varlığında göç etmesine dayanan bir ayırma ve tayin yöntemidir.

Kapiler elektroforezin uygulandığı bir çalışmada moleküllerin göç zamanı, sıcaklık, voltaj, elektrolit cinsi, organik materyalin içeriği gibi kullanılacak materyaller,

lignin benzeri fenolik bileşikler için Kapiler Zone Elektroforezi' nde (CZE) optimize edilmiştir. (Lima vd., 2007).

Gaz kromatografisi (GC)

GC fenolik bileşiklerin tayini amacıyla kullanılan kromatografik yöntemlerden bir tanesidir. Günümüzde idrarda fenol, krezol, ksilenol izomerleri ve naftol tayini için geliştirilen ve kullanılan gaz kromatografisi yöntemleri bulunmaktadır. Bu yöntemle farklı fenolik bileşik analizleri gerçekleştirilmiştir (Heiniö vd., 2008; Minuti ve Pallegrino, 2008).

2.2.3.3 Enzimatik yöntemler

Fenolik bileşiklerin tayininde serbest ve immobilize polifenol oksidaz sınıfı enzimlerin kullanıldığı enzimatik yöntemler mevcuttur. İmmobilize enzimlerin kullanıldığı yöntemler avantajları nedeniyle tercih edilmektedirler. Buna yönelik bir çalışmada kültür mantarından (*Agaricus bisporus)* izole edilen polifenol oksidaz enzimi kullanılarak doğal meyve sularının fenolik bileşik içerikleri tayin edilmiştir (Ercivan vd.,1997). Buna yönelik yapılan başka bir çalışmada da saf olarak izole edilmiş polifenol oksidaz enzimi kullanılarak kırmızı şarap içerisindeki toplam fenol miktarı tayin edilmiştir (Yıldız v.d. , 2006).

2.2.3.4 Biyosensör temelli yöntemler

Biyosensörlerin oluşturulması, dizaynı ve geliştirilmesi esnasındaki problemler birçok çalışmada incelenmiştir (Bogdanovskaya ve Tarasevich, 1996). Biyosensörler uzun depo kararlılığı, yüksek spesifiklik, yüksek duyarlılık ve kısa ölçüm süreleri gibi pek çok avantajlara sahiptir. Tüm labaratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilir. Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği oldukça yüksektir. Ayrıca pahalı cihaz ve kimyasallara ihtiyaç duyulmaz (Akyılmaz,1996). Bunlara ilave olarak biyosensörlerin çoğunluğu yerinde analize imkan verecek şekilde taşınabilir niteliktedir.

2.3 Polifenol Oksidazlar

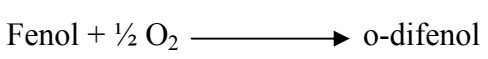
Literatürde polifenol oksidazlar farklı tip fenolik bileşikleri oksitleme yeteneklerine göre üç farklı sınıfa ayrılırlar.

Trozinazlar (monofenol monooksijenaz E.C. 1.14.18.1) trozin ve p-kresol gibi mono fenolik bileşiklerin oksitlenmesini katalizleyen enzimlerdir. Trozinazlar daha çok hayvansal organizmalarda bulunurlar ve özellikle deri, saç ve göz rengi oluşumunda etkilidirler (Whitaker, 1994).

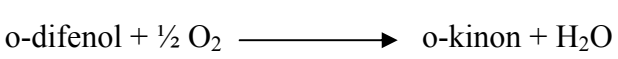
Polifenol oksidazların ikinci sınıfı (1,2- benzendiol: oksijen oksidoredüktaz; E.C 1.10.3.1) polifenolaz, fenolaz, kateşolaz, kateşoloksidaz, yada krezolaz olarak bilinir ve yüksek bitkilerden mantar, şeftali, elma, avakado, havuç, tütün ve çay yapraklarında bol miktarda bulunur (Whitaker, 1994; Rensburg vd.,2000; Duran ve Espasito, 2000; Garcia ve Barett, 2002).

Genel olarak reaksiyonları 2 basamakta katalizlerler (Climent vd.,2001; Ziyan ve Pekyardımcı, 2003; Duran vd.,2002).

1. Basamak: Krezolaz aktivitesi; monofenollerin o-difenollere o-hidroksilasyonu



2. Basamak: Kateşolaz aktivitesi; o-difenollerin o-kinonlara tamamen oksidasyonu



Bu grupta yer alan üçüncü sınıf ise lakkazdır (E.C. 1.10.3.2). Lakkaz en yaygın olarak fungilerde bulunur. Monofenollerin, o ve p- fenollerin, amino fenollerin ve diamino aromatik bileşiklerin oksidasyonunu katalizler ve polifenol oksidaz enzimleri arasında en geniş substrat spesifitesine sahiptir (Mayer, 1987).

Bitkilerdeki kararma bu enzimlerin aktiviteleri sayesinde geçekleşmektedir (Aydın ve Kadıoğlu, 2001). Polifenol oksidaz aktivitesi sonucunda oluşan o-kinonlar, bitkilerde bulunan diğer bileşiklerle reaksiyon vererek koyu renkli pigmentleri ve bazen de istenmeyen tatlara sahip bileşikleri oluştururlar. Polifenol oksidazlar hücre içinde plastidlerde yerleşmişlerdir ve substratları olan fenolik bileşikler vakuolde bulunur. Bu nedenle hücreye dışarıdan fiziksel bir etki olduğunda membranlar zarar görür, enzim, substrat ve hava oksijeninin bir araya gelmesi kararmayı oluşturur. Bu yüzden bitkisel ürünlerin toplanması ve depolanması sırasında basınç, darbe, donma ve preslenme gibi mekanik bir etki ile zarar görmemesi istenir (Chavalier vd., 1999). Ayrıca, bitkilerde fenolik bileşiklerin sentezinin düzenlenmesinde indirekt olarak etkilidirler. Bitkilerin kök gelişimleri ve organizasyonlarında rol oynarlar, buna ek olarak hücre bölünmesi ve farklılaşmasında önemli görev üstlendikleri bilinmektedir (Yılmaz vd., 2003).

Polifenol oksidazlar her birim için bir bakır atomu içeren tetramer yapılı proteinlerdir ve fenolik substratları olan aromatik bileşikleri için iki bağlanma bölgesine sahiptir. Oksijen için ayrıca bağlanma bölgesi vardır. Enzim 128 000 dalton moleküler ağırlığına sahiptir (Cliement vd.,2001).

Polifenol oksidazlar aktivitelerini göstermek için kofaktöre ihtiyaç duymazlar ancak spektroskopik çalışmalar bakır içeren aktif bölgenin varlığını göstermiştir (Duran ve Espasito,2000). Optimum pH ları 6,0-7,0 aralığındadır (Climent vd., 2001). Ancak pH 4.5'un altında da aktivite gösterebilirler. pH 3.5'un altında polifenol oksidazların geri dönüşümsüz denatürasyonları gerçekleşir (Garcia ve Baret, 2002). Optimum pH ları; genetik özellikleri, fenolik substratın doğası, enzimin saflaştırma metodu ve immobilize ise destek materyalin türüne göre değişiklik göstermektedir (Gomez-Lopez, 2002).

Pek çok farklı bitkide bulunan bu enzimler 20-35 ^{o}C aralığında maksimum aktivite gösterirler. Enzim kaynağı, bitkinin yetiştirildiği toprağın özellikleri, moleküler form (izoenzimler), dokudaki ısı penetrasyonu gibi pek çok faktör optimum sıcaklığı etkileyebilir. Polifenol oksidazlar sıcaklığa pek dayanıklı enzimler değillerdir ve serbest halde 40 ^{o}C' nin üzerinde termal inaktivasyona uğrarlar (Garcia ve Baret, 2002). Ancak farklı termal kararlılığa sahip polifenol oksidazlar izole edilmiştir. Örneğin, şeftali

polifenol oksidazı için optimum sıcaklığın yüksek olduğu bulunmuştur (Gomez-Lopez, 2002).

2.4 Biyosensör Hazırlanmasında Kullanılan Bitkisel Dokular

Anamur Muzu

Muz, Güneydoğu Asya'dan çıkmıştır. Anavatanı Güney Çin, Hindistan ve Hindistan ile Avustralya arasında kalan adalardır. Muzu ilk kültüre alanların balıkçılar olduğu sanılmaktadır. Balıkçılar ağ yapmak için muzun yapraklarından yararlanmışlar ve bu şekilde tarımı başlamıştır. Muzla ilgili ilk eser M.Ö. 600-500 yıllarına aittir ve Hindistan'da bulunmuştur. Muz bitkisi ülkemize ilk defa 1750 yıllarında gelmiştir. Mısır'la ilgisi olan zengin bir aile tarafından süs bitkisi olarak Mısır'dan Alanya'ya getirilmiştir. O yıllarda daha çok süs bitkisi olarak yetiştirilen muz meyve verdiğinin görülmesi üzerine, 1930'lu yıllardan sonra meyvesi için ticari amaçla yetiştirilmeye başlanmıştır. 1934 yılında Alanya'dan Anamur'a getirilen muz bitkisinin yetiştiriciliği kısa zamanda geliştirilmiştir. Bu tarihten sonra yurt dışından bir çok çeşit getirilerek, Finike'den İskenderun'a kadar Toros Dağları'nın kıyı şeridi boyunca bir çok yerde denenmiş fakat en iyi sonuçlar Anamur'da alınmıştır ve alınmaya devam etmektedir. Bugün ülkemizde sadece Anamur, Bozyazı, Gazipaşa ve Alanya ilçeleri ile çevresinde *Musa Cavendish* dediğimiz bodur muz üretimi yapılmaktadır (http://www.karanlar.com).

100 g soyulup dilimlenmiş taze muzun içerdiği besin değerleri şöyle sıralanabilir: 85 kilo kalori: 1,1 g protein; 22.2 g karbonhidrat; 0 kolesterol; 0,2 g yağ; 0,5 g lif; 26 mg fosfor; 8 mg kalsiyum; 0,7 mg demir; l mg sodyum; 370 mg potasyum; 33 mg magnezyum; 190 IU A vitamini: 0,05 mg B1 vitamini; 0,06 mg B2 vitamini; 0,7 mg B3 vitamini; 0,5 mg B6 vitamini; 7 mg C vitamini; 10 µg folik asit: 7 mg C vitamini ve 0,4 mg E vitamini. Muz içerdiği B1, B2, C, A ve E vitaminleri yanı sıra potasyum, demir, kalsiyum, fosfor, sodyum ve iyot açısında çok zengindir. Muz besin olarak tüketildiğinde yüksek oranda potasyum içermesi nedeniyle terleme sebebiyle kapasitesini yitirmeye başlayan kasları canlandırır ve daha kolay hareket imkanı sağlar. Muz kolay sindirilir ve içerdiği B1 vitamini sayesinde vücudun enfeksiyonlara karşı

korunmasında etkili olur ve sinir dokularının normal çalışmasını da sağlar. İçerdiği iyot sayesinde de tiroit bezinin dengeli çalışmasına yardım eder.

Kültürü yapılan muz, *Scitamineae* takımı, *Musaceae* ailesi, *Musa* cinsine girer. Bu cinste çok sayıda partenokarp meyve veren klonlar vardır. Tek çeneklidir ve önemli iki türü vardır (http://www.sagliksayfam.com/besinler-ve-ozellikleri/anamurmuzu).

***Gross Michel*:** Ticari önemi en fazla olan muz çeşididir. 5 - 6 metreye kadar boylanabilen bu muzun meyveleri çok lezzetlidir. Donmaya karşı diğer muz çeşitlerine göre daha dayanıklıdır. Ülkemizde azman muz veya çikita olarak adlandırdığımız muzlar bu gruptaki muzlardır.

Musa Cavendish: Ticari muzların en bodur olanıdır. 2,5 - 3 metre boyunda olan bu muzun meyveleri ince kabuklu ve lezzetlidir. Çin kökenli olan bu muz ülkemizdeki en yaygın muz çeşididir. Etli kabukları besin olarak tüketilmez, kesildiğinde yada yaralandığında oluşan kararmalar en az meyvenin kendisi kadar kabuklarında da gözlenmektedir. Şekil 2.6'da muz bitkisinin resmi yer almaktadır.



Şekil 2.6 Muz bitkisi (Musa *cavendish*)

Taze Bakla

Anayurdu Avrupa ve Asya kıtaları olan baklanın, 5.000 yıl kadar önceleri Çin'de yetiştirildiği eski metinlerde görülmektedir. Ülkemizde de bol bol yetiştirilen ve tüketilen bakla (*Vicia faba*), 60-100 cm boylanabilen bir yıllık otsu bir bitkidir.

Toprakta l m kadar derine inebilen güçlü bir kök yapısı ile dört köşe kesitli içi boş bir gövdesi vardır. Yan kökleri kuvvetli bir şekilde etrafa yayılır ve üzerlerinde yumrular meydana gelir. Tüysüz olan sapı bir metre kadar yükselebilir. Sap üzerinde sarmalı durumda yaprakları vardır. Çiçekleri yaprak altlarından çıkar. Çiçeklerin kendine has ve hoş bir kokusu vardır. Meyvesi, tohum araları bölmeli ve dolgun bir kapçıktır. Kapçık taze iken yeşildir, olgunlaşınca esmerleşir ve sertleşir. Besin olarak kullanılan baklanın Sakız baklası, Sultani bakla, Bayrampaşa baklası gibi çeşitleri vardır ve memleketimizin hemen hemen her yerinde yetişir (http://www.nedir.cc/bitkiler/bakla).

Bitkinin çiçekleri beyaz renklidir. Ama üzerlerinde kırmızımtırak çizgiler ve morumsu veya siyah lekeler görülür. Kendi kendilerini dölleyen bu çiçeklerden bitkinin bakla ya da badıç denilen meyveleri oluşur. Baklalar yeşilin çeşitli tonlarındadır. Sapa yakın bölümünde siyah renkli bir külah oluşur. Bu külah, bakla çeşitlerine göre farklı olur. Baklanın içindeki taneler (bakla içi denilen çekirdekleri ya da bitkinin tohumları) de bakla çeşitlerine göre irilik, biçim ve sayı bakımından çeşitlilik gösterir.

100g baklanın içerdiği besin değerleri şunlardır: 45 kalori; 5 g protein; 6 g karbonhidrat; 0 kolesterol; 3 g yağ; 1,5 g lif; 22 mg fosfor; 20 mg kalsiyum; 0,4 mg demir; 85 mg sodyum; 110 mg potasyum; 150 IU A vitamini: 0,04 mg B1 vitamini; 0,03 mg B2 vitamini ve 4 mg C vitaminidir. Bakla, baklagillerdeki tüm sebzeler gibi içerdiği antioksidan etkili fenolik bileşikler nedeniyle kansere yakalanma riskini azaltır. İnsanlarda kötü kolesterol düzeyini düşürür. Bakla içerdiği insülinle kan şekerini düzene sokar. Şekil 2.7'de taze bakla bitkisinin resmi yer almaktadır (http://www.sagliksayfam.com/besinler-ve-ozellikleri/bakla).



Şekil 2.7 Taze bakla bitkisi (*Vicia faba*)

Bu doktora çalışmasında fenolik bileşik tayini amaçlı biyosensör geliştirilmesi için biyobileşen olarak Anamur muzu kabuğu ve taze bakla dokuları seçildi. Kullanılan dokuların seçilmesinde bölümümüzde yapılan TÜBAP-843 no'lu proje sonuçları göz önünde bulunduruldu. Bu proje kapsamında 17 farklı bitkinin, PPO enzimi bakımından zengin olduğu düşünülen kısımları kullanılarak, PPO enzim aktivitesi taramaları gerçekleştirildi. En yüksek PPO aktivitesi sırasıyla Anamur muzu kabuğu, yer elması (meyvesi) ve taze bakla (sebzesi, çekirdekleri çıkarılarak) dokularında bulundu. Literatürde yer elmasının kullanıldığı biyosensör çalışmaları olduğundan bu doku biyobileşen olarak seçilmedi. Tablo 2.5'de çalışmada taranan bitki dokuları ve kullanılan kısımları görülmektedir.

Tablo 2.5 PPO aktivitesi bakımından taranan dokular ve kullanılan kısımları

TÜRKÇE ADI	**LATİNCE ADI**	**KULLANILAN KISMI**
Anamur muzu	*Musa cavendish*	**Olgun meyvesinin kabukları**
Taze bakla	*Vicia faba*	**Olgun sebzesinin çekirdek hariç tamamı**
Yer elması	*Heliantus tuberosus*	Yumru kökleri
Trabzon hurması	*Diospoyros kaki*	Olgun meyvesi tamamı
Patlıcan	*Solanum melongena*	Olgun sebzesi tamamı
Sarı sabır otu	*Aloe barbadensis*	Kurutulmuş yaprakları
Keçi boynuzu	*Ceratonia siliqua*	Olgun meyvesi çekirdek hariç tamamı
Kereviz	*Apium graveolens*	Ayıklanmış olgun sebzesi tamamı
Kaynana dili yaprağı	*Opuntia vulgaris*	Olgun yaprağı
Güvem	*Prunus spinosa*	Olgun meyvesi tamamı
Taze fasulye	*Phaseolus vulgaris*	Olgun sebzesi çekirdek hariç tamamı
Alabaş	*Brassica aleraceae var. Gogylodes L.*	Tohumu
Alabaş	*Brassica aleraceae var. Gogylodes L.*	Olgun sebzesi tamamı
Enginar	*cynarascolymus*	Olgun sebzesi tamamı
Trabzon kokulu üzümü	*Vitis labrusca*	Olgun meyvesi çekirdek hariç tamamı
Ayva	*Cydonia ablonoa*	Olgun meyvesi çekirdek hariç tamamı
Bezelye	*Pisum sativum*	Olgun sebzesi tamamı

3. MATERYAL VE METODLAR

3.1 Materyaller

Bu çalışmanın deneysel kısmında kullanılmış olan cihaz ve kimyasallar aşağıda gösterilmiştir.

Cihazlar:

- RCA manyetik karıştırıcı
- Nuve BM 302 dış sirkülasyonlu su banyosu
- Ependorf mikropipet takımı
- Palmsense potansiyostat
- Arçelik buzdolabı
- Schott handlylab pH11 pH metre
- Shimadzu UV-1201V-Visible UV Spektrofotometre
- Gec Avery analitik terazi
- Camsı karbon çalışma elektrodu
- Ag/AgCl referans elektrot
- Platin karşıt elektrot

Kimyasallar:

Kateşol, potasyum dihidrojenfosfat, disodyum hidrojenfosfat, fenol, hidroklorikasit, benzoik asit, bakır sülfat, çinko sülfat, civa klorür, para nitrofenol, sodyum sülfat, sodyum hidroksit, sodyum asetat, hidrokinon, 2-6 dihidroksi benzoik asit, L-Askorbik asit, delfinidin ve kumarik asit E.Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlanmıştır.

Jelatin, dopa, L-trozin, rutin 3 hidrat, glutaraldehit, sodyum sülfit, sodyum metabisülfit, sodyum metasülfit, L-sistein, pikrik asit, kuersetin, glisin, gallik asit, kaffeik asit ve sodyum benzoat Sigma (St. Louis, ABD) firmasından sağlanmıştır.

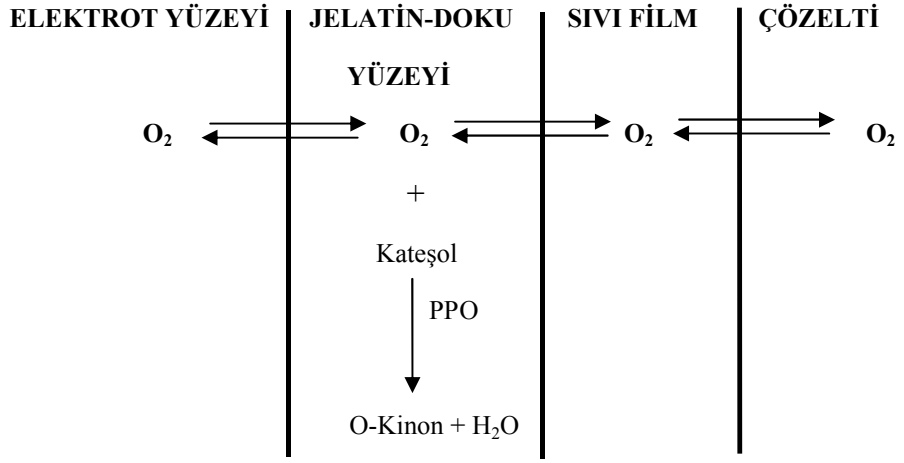
Çalışmada biyolojik bileşen olarak kullanılan muz (*Musa Cavendish)* Anamur-Mersin yerel pazarından, taze bakla (*Vicia faba*) ise Edirne yerel pazarından temin edilmiştir.

3.2 Metodlar

3.2.1 Biyosensörlerin çalışma ilkesi

Reaksiyon ortamında substrat bulunmadığı zaman biyobileşenin immobilize edildiği elektrot yüzeyindeki oksijen konsantrasyonu devreden geçen akım miktarı ile belirlenir. Reaksiyon ortamına substrat ilavesi yapıldığında gerçekleşen enzimatik reaksiyon gereği polifenol oksidaz fenolik bileşiği o-kinona dönüştürürken elektrot yüzeyindeki oksijen miktarı azalır. İlave edilen fenolik bileşik konsantrasyonu ile orantılı olarak devreden geçen akım miktarı azalarak kısa bir süre içinde yeniden dengeye gelir.

Her iki denge arasındaki akım miktarı farkı potansiyostat ile tespit edilir. Substrat konsantrasyonu arttıkça, jelatin-doku yüzeyinde daha fazla oksijen harcanacak ve akım değerinde aynı oranda azalmalar meydana gelecektir. Şekil 3.1'de sistemlerde meydana gelen reaksiyonlar gösterilmiştir.

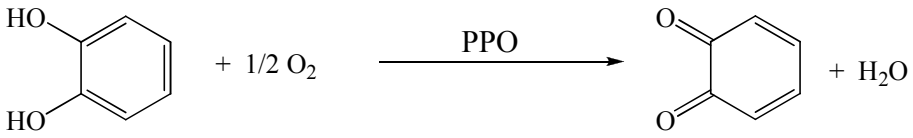


Şekil 3.1 Biyosensör sistemlerinde meydana gelen reaksiyonlar

3.2.2 Biyosensörlerin hazırlanması

Jelatin esaslı bitki dokusu temelli biyosensörlerin hazırlanması için kullanılan çalışma elektrodu camsı karbon elektrottur. Aşağıda belirtilmiş olan reaksiyon sonucunda meydana gelen çözünmüş oksijen miktarındaki değişimler sabit potansiyelde

sistemden geçen akım miktarındaki değişimlerle doğru orantılıdır ve camsı karbon çalışma elektrodu ile akım değişimlerini belirlemek mümkündür.



katesol o-kinon

Bu sistemin oluşturulması amacıyla camsı karbon çalışma elektrodu yüzeyi jelatin + doku homojenatı tabakasıyla kaplandı ve sonra glutaraldehit ile çapraz bağlama gerçekleştirildi.

Bitkisel doku temelli biyosensörlerin hazırlanmasında izlenen yol muz kabuğu biyosensörü için Tablo 3.1'de taze bakla biyosensörü için Tablo 3.2'de ayrıntılı olarak verilmiştir. Tablolarda belirtilen değerler; çok sayıdaki ön denemeler ve optimizasyon çalışmaları sonrasında belirlenen en uygun değerlerdir. Hazırlanan sensörler önce destile su ile yıkanmış ve ölçümler arasında çalışma sıcaklığında çalışma tamponu içerisinde bekletilmiştir.

Tablo 3.1 Muz kabuğu biyosensörünün hazırlanması

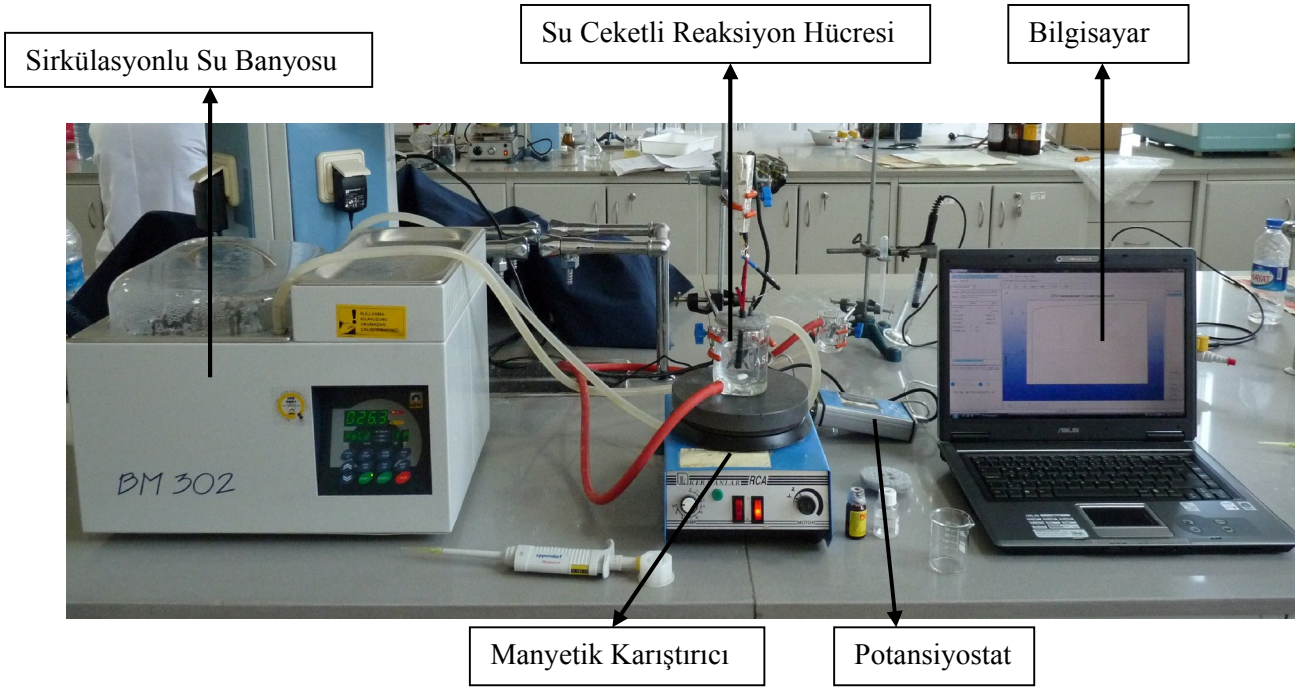
İŞLEM SIRASI	İŞLEM
1	165 mg doku 550 µL pH; 7 fosfat tamponu ile homojenize edildi. 10 mg Jelatin ve 300 µL doku homojenatı 37.5 ^{o}C de 15 dk bekletildi.
2	Karışımın 30 µL si camsı karbon çalışma elektrodu üzerine yayıldı.
3	+ 4 ^{o}C de 30 dk bekletildi.
4	Bekleme süresinin sonunda %1.25'lik glutaraldehit çözeltisinde 5 dk çapraz bağlanmanın gerçekleştirilmesi için bekletildi.
5	Son olarak biyosensör saf su ile yıkandı ve çalışma sıcaklığında çalışma tamponunda bekletildi.

Tablo 3.2 Taze bakla biyosensörünün hazırlanması

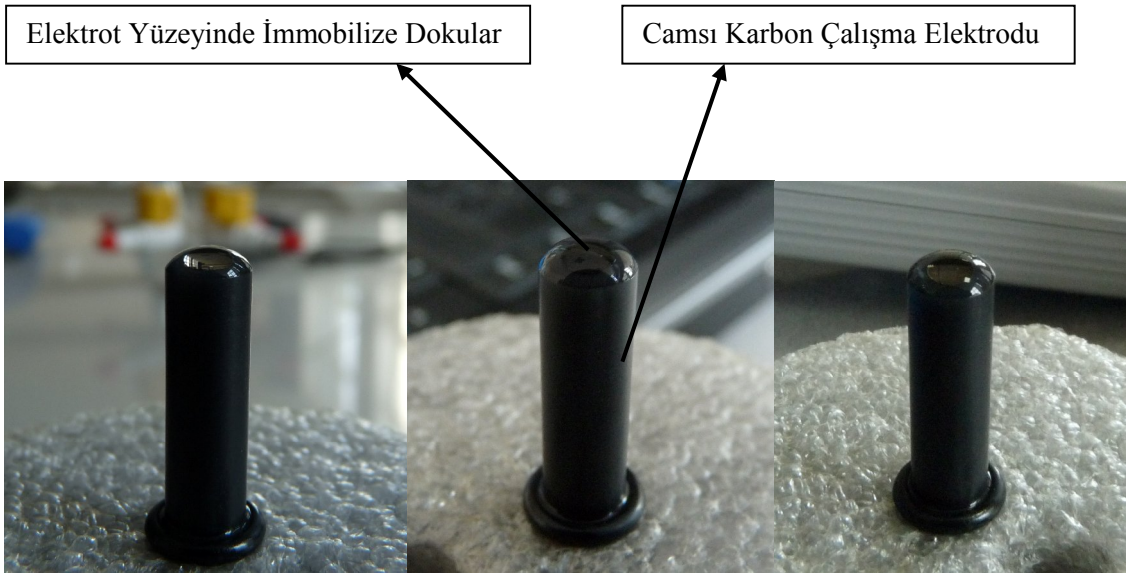
İŞLEM SIRASI	İŞLEM
1	200 mg doku 500 µL pH; 7 fosfat tamponu ile homojenize edildi. 10 mg Jelatin ve 270 µL doku homojenatı 37.5 ^{o}C de 15 dk. bekletildi
2	Karışımın 30 µL si camsı karbon çalışma elektrodu üzerine yayıldı
3	+ 4 ^{o}C de 30 dk bekletildi
4	Bekleme süresinin sonunda %1.25'lik glutaraldehit çözeltisinde 5 dk çapraz bağlanmanın gerçekleştirilmesi için bekletildi.
5	Son olarak biyosensör saf su ile yıkandı ve çalışma sıcaklığında çalışma tamponunda bekletildi

3.2.3 Biyosensörlerin ölçüm prosedürü

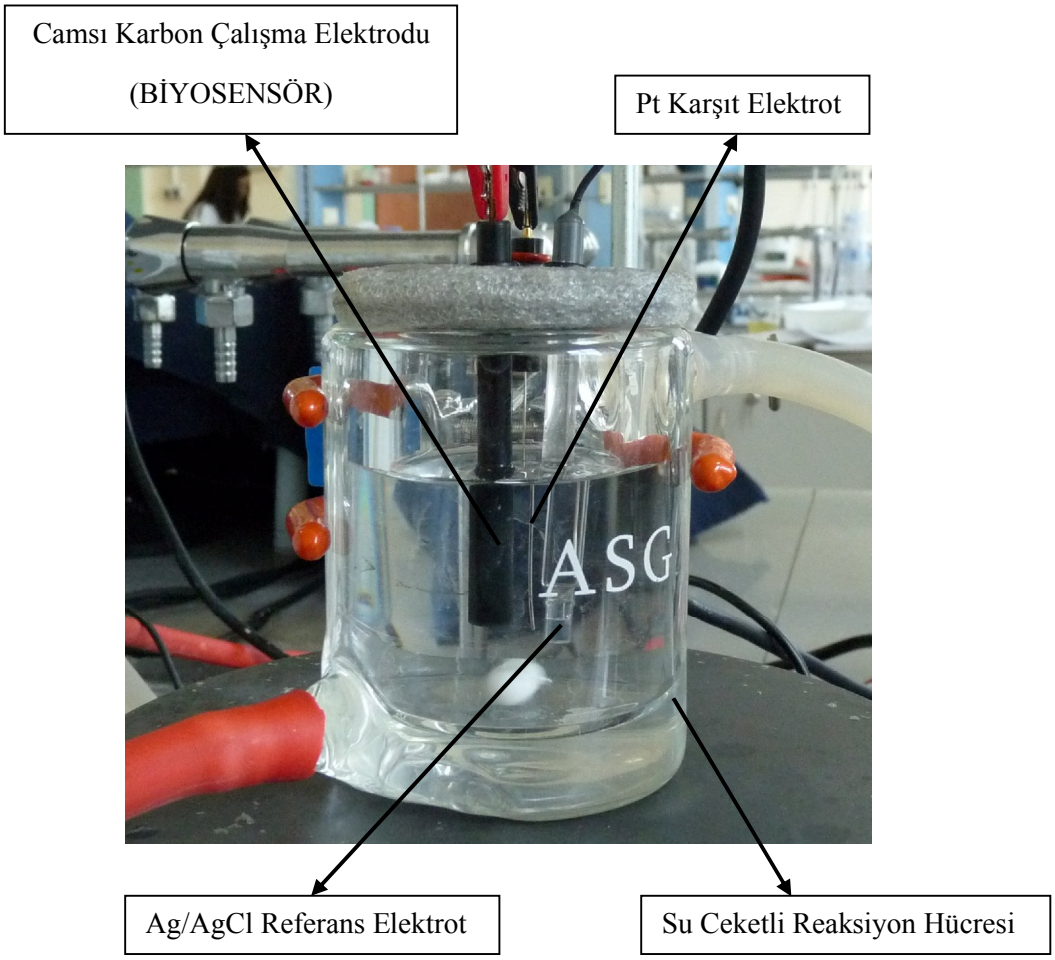
Bitki dokusu temelli biyosensörler ile yapılan ölçümlerde kullanılan düzenek Şekil 3.2'de, bitki dokusu temelli çalışma elektrodu ise Şekil 3.3'de ve elektrot sistemi Şekil 3.4'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2 Bitki dokusu biyosensörleri ile yapılan ölçümlerde kullanılan düzenek



Şekil 3.3 Bitki dokusu temelli çalışma elektrodu



Şekil 3.4 Reaksiyon hücresi ve daldırılmış elektrotlar

Biyosensörler hazırlandıktan sonra ölçüm yapılmadan hemen önce ayrı bir reaksiyon hücresi içerisinde çalışma tamponu ve sıcaklığında 20 dk bekletildi. Daha sonra ölçümün yapılacağı, içinde çalışma tamponu bulunan reaksiyon hücresine Ag/AgCl referans elektrot ve Pt karşıt elektrot ile birlikte yerleştirildi. Sabit bir karıştırma hızı ayarlandıktan sonra substrat ilavesinden önce oksijen için indirgenme potansiyeli olan -0,700 V potansiyel farkı uygulaması başlatıldı ve reaksiyon süresince sabit tutuldu. Sistem dengeye geldiğinde sistemden geçen akım şiddeti kaydedildi ve substrat ortama eklendi. Substrat reaksiyon ortamına ilave edildikten sonra, PPO tarafından kateşolün kinona oksijen kullanılarak yükseltgenmesi reaksiyonu, sistem tekrar dengeye geldiğinde tamamlanır ve bu süre yaklaşık 8 dk dır. Bu sürenin sonunda sistemden geçen akım şiddeti kaydedildi. Bu durumda okunan değer substrat ilavesinden önce okunan değerden daha küçüktür, çünkü elektrot yüzeyinde gerçekleşen enzimatik reaksiyon gereği ortamdaki substrat miktarı ile orantılı olarak oksijen tüketilir, azalan oksijen miktarı -0,700 V potansiyelde devreden geçen akım miktarını da azaltır. Yapılan tüm deneylerde iki denge durumu arasındaki akım farkı alındı. Bu orantıdan faydalanılarak ortamdaki substrat konsantrasyonu tayin edildi.

3.2.4 Biyosensörlerin immobilizasyon parametrelerinin optimizasyonu

Doktora tezinin bu aşamasında bitki dokusu temelli biyosensörler için en iyi biyosensör cevabının elde edilebileceği optimum immobilizasyon koşullarının tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla doku miktarının, jelatin miktarının ve çapraz bağlayıcı glutaraldehit miktarının biyosensör cevabına etkileri araştırılmıştır. Her bir immobilizasyon parametresinin optimum miktarının tayin edilmesi için, diğer ikisi sabit tutularak optimizasyonu yapılacak parametre değiştirilip biyosensörler hazırlandı ve ölçümler alındı.

3.2.4.1 Doku miktarının biyosensörlerin cevabı üzerine etkisi

Biyoaktif tabakadaki jelatin miktarı ve çapraz bağlayıcı glutaraldehit miktarı sabit tutularak değişen oranlarda bitki dokusu kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Bu

amaçla aşağıda belirtilen oranlar kullanılarak bitki dokusunun biyosensör cevabı üzerine etkisi incelendi. Taze bakla dokusunun, muz kabuğu dokusuna oranla daha düşük PPO aktivitesine sahip olması, aynı miktarda kullanıldıklarında biyosensör cevaplarının da daha düşük olmasına yol açmaktadır. Bu nedenle, taze bakla dokusu, muz kabuğu dokusuna oranla daha fazla miktarlarda kullanıldı. Ölçümler 66 mM, pH 7.0 fosfat tamponunda 37.5 ^{o}C' de gerçekleştirildi.

Muz kabuğu biyosensörü doku miktarı optimizasyonu için hazırlanan sensörler

1- 0.88 mg/cm^2 jelatin + **3.98 mg/cm^2 Muz kabuk dokusu** + %1.25 Glutaraldehit

2- 0.88 mg/cm^2 jelatin + **7.96 mg/cm^2 Muz kabuk dokusu** + %1.25 Glutaraldehit

3- 0.88 mg/cm^2 jelatin + **11.94 mg/cm^2 Muz kabuk dokusu** + %1.25 Glutaraldehit

Taze bakla biyosensörü doku miktarı optimizasyonu için hazırlanan sensörler

1- 0.98 mg/cm^2 jelatin + **8.75 mg/cm^2 Taze bakla dokusu** + %1.25 Glutaraldehit

2- 0.98 mg/cm^2 jelatin + **10.60 mg/cm^2 Taze bakla dokusu** + %1.25 Glutaraldehit

3- 0.98 mg/cm^2 jelatin + **12,45 mg/cm^2 Taze bakla dokusu** + %1.25 Glutaraldehit

3.2.4.2 Jelatin miktarının biyosensörlerin cevabı üzerine etkisi

Bitki dokusu temelli biyosensörler için en uygun doku miktarları belirlendikten sonra, biyoaktif tabakalardaki jelatin miktarının biyosensör cevaplarına etkisinin belirlenmesi amacıyla; doku miktarı ve çapraz bağlayıcı glutaraldehit miktarları sabit tutularak farklı jelatin miktarları kullanılmasıyla biyosensörler hazırlandı.

Hazırlanan biyosensörlerle yapılan ölçümlerden standart grafikler elde edildi. Bu grafikler yardımıyla en uygun jelatin miktarı tespit edildi. Bu amaçla aşağıda belirtilen oranlar kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Taze bakla biyosensöründe, muz kabuğu

biyosensörüne oranla, doku miktarının fazla olması ölçümler sırasında elektrot yüzeyinde biyobileşenin düşmesine neden oldu. Bu sorununun giderilmesi amacıyla taze bakla biyosensöründe, muz kabuğu biyosensörüne oranla daha fazla miktarda jelatin kullanılarak biyobileşen elektrot yüzeyinde sağlamlaştırıldı. Ölçümler 66 mM, pH 7.0 fosfat tamponunda 37.5 ^{o}C' de gerçekleştirildi.

Muz kabuğu biyosensörü jelatin miktarı optimizasyonu için hazırlanan sensörler

1- **0.44 mg/cm^2 jelatin +** 7,96 mg/cm^2 Muz kabuk dokusu + %1.25 Glutaraldehit

2- **0.88 mg/cm^2 jelatin +** 7,96 mg/cm^2 Muz kabuk dokusu + %1.25 Glutaraldehit

3- **1.76 mg/cm^2 jelatin** + 7,96 mg/cm^2 Muz kabuk dokusu + %1.25 Glutaraldehit

Taze bakla biyosensörü jelatin miktarı optimizasyonu için hazırlanan sensörler

1- **0.83 mg/cm^2 jelatin +** 10,60 mg/cm^2 Taze bakla dokusu + %1.25 Glutaraldehit

2- **0.98 mg/cm^2 jelatin +** 10,60 mg/cm^2 Taze bakla dokusu + %1.25 Glutaraldehit

3- **1,38 mg/cm^2 jelatin** + 10,60 mg/cm^2 Taze bakla dokusu + %1.25 Glutaraldehit

3.2.4.3 Glutaraldehit yüzdesinin biyosensörlerin cevabı üzerine etkisi

En uygun bitki dokusu ve jelatin miktarları belirlendikten sonra, biyosensörlerin cevabına glutaraldehit yüzdesinin etkisinin belirlenmesi için doku ve jelatin miktarları sabit tutularak farklı jelatin miktarları kullanılmasıyla biyosensörler hazırlandı.

Hazırlanan biyosensörlerle yapılan ölçümlerden standart grafikler elde edildi. Bu grafikler yardımıyla en uygun glutaraldehit yüzdesi tespit edildi. Bu amaçla aşağıda belirtilen oranlar kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Ölçümler 66 mM, pH 7.0 fosfat tamponunda 37.5 ^{o}C' de gerçekleştirildi.

Muz kabuğu biyosensörü glutaraldehit optimizasyonu için hazırlanan sensörler

1- 0.88 mg/cm^2 jelatin + 7,96 mg/cm^2 Muz kabuk dokusu + **%0.625 Glutaraldehit**

2- 0.88 mg/cm^2 jelatin + 7,96 mg/cm^2 Muz kabuk dokusu + **%1.25 Glutaraldehit**

3- 0.88 mg/cm^2 jelatin + 7,96 mg/cm^2 Muz kabuk dokusu + **%2.5 Glutaraldehit**

Muz kabuğu biyosensörü glutaraldehit optimizasyonu için hazırlanan sensörler

1- 0.98 mg/cm^2 jelatin + 10,60 mg/cm^2 Taze bakla dokusu + **%0.625 Glutaraldehit**

2- 0.98 mg/cm^2 jelatin + 10,60 mg/cm^2 Taze bakla dokusu + **%1.25 Glutaraldehit**

3- 0.98 mg/cm^2 jelatin + 10,60 mg/cm^2 Taze bakla dokusu + **%2.5 Glutaraldehit**

3.2.5 Biyosensörlerin çalışma koşullarının optimizasyonu

3.2.5.1 En uygun pH değerlerinin belirlenmesi

Bitki dokusu temelli biyosensörlerin optimum pH'ının belirlenmesi için pH' ı 5.0, 6.0, 7.0, 7.5 ve 8.0 olan 66 mM sodyum fosfat, pH' ı 9.0 olan 66 mM glisin ve pH'ı 3.0 ve 4.0 olan 66 mM sitrikasit-disodyum fosfat tamponları kullanılarak en iyi biyosensör cevabının hangi pH değerlerinde elde edildiği belirlendi. Ölçümler muz kabuğu biyosensörü için 37.5 ^{o}C de ve 0.25 mM kateşol konsantrasyonunda, taze bakla biyosensörü için 37.5 ^{o}C de ve 0.20 mM kateşol konsantrasyonunda yapıldı. Farklı pH değerlerinde ölçüme geçilirken biyosensörler kullanılacak olan tampon içerisinde 20 dk bekletildi.

Bu çalışma sonucunda tampon pH'ına karşı % biyosensör cevabı grafikleri çizildi.

3.2.5.2 En uygun tampon konsantrasyonlarının belirlenmesi

Biyosensörler ile en iyi cevapların alındığı tampon konsantrasyonlarının belirlenmesi için bir önceki çalışma ile belirlenen optimum pH değerinde, molar konsantrasyonu 33 mM, 66 mM, 99 mM ve 132 mM olan tampon sistemleri kullanılarak denemeler gerçekleştirildi. Ölçümler muz kabuğu biyosensörü için 37.5 ^{o}C de ve 0.25 mM kateşol konsantrasyonunda, taze bakla biyosensörü için 37.5 ^{o}C de ve 0.20 mM kateşol konsantrasyonunda yapıldı. Farklı molar konsantrasyona sahip tamponlar da ölçüme geçilirken biyosensörler çalışılacak tampon içerisinde 20 dk bekletildi.

Bu çalışma sonucunda tampon konsantrasyonu ve % biyosensör cevabı arasında grafikler çizildi.

3.2.5.3 En uygun sıcaklık değerlerinin belirlenmesi

Biyosensörlerin cevabı üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi amacıyla 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 ^{o}C'de düşük sıcaklıktan yüksek sıcaklığa doğru optimum pH ve optimum tampon konsantrasyonlarında ölçümler gerçekleştirildi. Ölçümlerde muz kabuğu biyosensörü için 0.25 mM kateşol, taze bakla biyosensörü için 0.20 mM kateşol kullanıldı. Farklı sıcaklıklarda ölçüme geçilirken biyosensörler çalışılacak tampon içerisinde 20 dk bekletildi.

Bu çalışma sonucunda sıcaklık ve % biyosensör cevabı arasında grafik çizildi.

3.2.6 Biyosensörlerin karakterizasyonu

Bitki dokusu temelli biyosensörlerde kullanılmış olan biyobileşenlerin immobilizasyon parametrelerinin ve çalışma koşullarının optimizasyonları yapıldıktan sonra biyosensörlerin karakterizasyonu çalışmalarına geçildi.

3.2.6.1 Biyosensörlerin lineer ölçüm aralıkları

Bu amaçla; optimize edilen immobilizasyon parametrelerine göre hazırlanan biyosensörlerle farklı kateşol konsantrasyonlarında ölçümler yapılarak, kateşol için ölçüm aralıkları belirlendi. Ölçümler optimum koşullarda gerçekleştirildi.

3.2.6.2 Biyosensör cevaplarının tekrarlanabilirliği

Bitki dokusu temelli biyosensörlerin ölçüm sonuçlarının güvenilirliği ve tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi amacıyla, pH 7.0 - 66 mM fosfat tamponu içinde 37.5 ^{o}C' de gerçekleştirilen denemelerde, muz kabuğu biyosensörü ile 50 µM kateşol içeren standart kullanılarak arka arkaya ara vermeksizin aynı sensörle ölçümler yapılırken, taze bakla biyosensörü ile 40 µM kateşol içeren standart kullanılarak arka arkaya ara vermeksizin aynı sensörle ölçümler yapıldı. Ölçümlere ilişkin standart sapmalar ve varyasyon katsayıları hesaplandı.

3.2.6.3 Biyosensörlerin işlem kararlılığı

Biyosensörlerin işlem kararlılıklarının belirlenmesi amacıyla, pH 7.0 - 66 mM fosfat tamponu içinde 37.5 ^{o}C' de muz kabuğu biyosensörü ile 50 µM kateşol içeren standart kullanılarak artarda aynı sensör ile 30 dk arayla 12 ölçüm gerçekleştirilirken, taze bakla biyosensörü ile 40 µM kateşol içeren standartlar kullanılarak artarda aynı sensör ile 40 dk arayla 12 ölçüm yapıldı. Elde edilen sonuçlardan aynı biyosensör ile aynı gün içinde kaç ölçüm alınabileceği belirlendi. Sonuçlar yüzde aktiviteye karşı zaman grafiği olarak verildi.

3.2.6.4 Biyosensörlerin depo kararlılığı

Biyosensörlerin depo kararlılığının belirlenmesi amacıyla, pH 7.0 - 66 mM fosfat tamponu içinde 37.5 ^{o}C' de muz kabuğu biyosensörü ile 50 µM, taze bakla biyosensörü ile 40 µM kateşol içeren standartlar kullanılarak artarda aynı sensör ile

hazırlandığı ilk günden itibaren çeşitli zaman aralıklarında 24 gün boyunca ölçümler alındı. Elde edilen sonuçlardan muz kabuğu biyosensörünün ve taze bakla biyosensörünün kaç gün süreyle aktivitesini ne oranda koruduğu belirlenerek sonuçlar zamana karşı % aktivite olarak verildi.

3.2.6.5 Farklı fenolik bileşiklerin tayin aralıkları

Bitki dokusu biyosensörleri ile kateşolden farklı fenolik bileşiklerin tayin edilip edilemeyeceğinin belirlenmesi amacıyla progallol, p-kresol, hidrokinon, fenol, L-dopa, gallik asit, kaffeik asit, rutin, sinnamik asit, rezorsin, kuersetin ve askorbik asit kullanılarak ölçümler yapıldı. Her bir bileşik için tayin aralıkları ve standart grafikleri belirlendi.

Denemeler 66 mM, pH 7.0 fosfat tamponunda 37.5 ^{o}C' de gerçekleştirildi.

3.2.6.6 Biyosensörlerin cevabı üzerine bazı kimyasal maddelerin inhibisyon etkisi

Biyosensörlerin cevabı üzerine bazı kimyasal maddelerin etkisinin belirlenmesi amacıyla pH 7.0 - 66 mM fosfat tamponu içinde 37.5 ^{o}C' de 200 µM kateşol içeren standart kullanılarak 100 µM sistein, civa, sülfit, bisülfit, bakır, çinko, benzoik asit ve tiyoüre içeren reaksiyon ortamında denemeler gerçekleştirildi. İnhibitörsüz ölçüm aktivitesi %100 olarak kabul edilip her bir kimyasal için % inhibisyon oranları belirlendi.

3.2.7 Biyosensörlerin farklı örneklere uygulanabilirliğinin incelenmesi

Bitki dokusu biyosensörlerinin örneklere uygulanabilirliği, farklı altı içecek örneği seçilerek belirlendi. Standart ekleme metoduyla alınan sonuçların doğruluğu test edildi. Sırasıyla kullanılan örnekler ve yapılan ön işlemler aşağıda verildi.

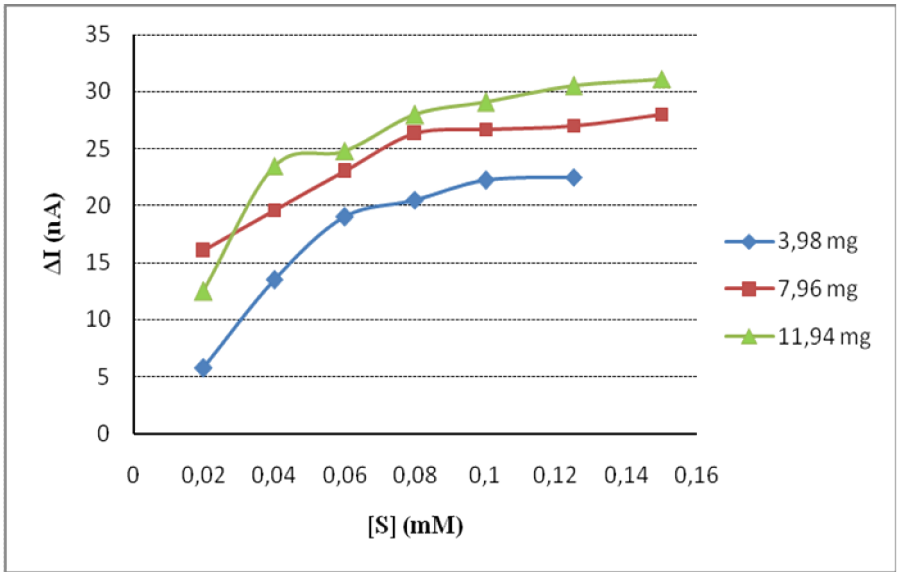
- Pınar %100 Elma suyu; 1/100 oranında çalışma tamponuyla seyreltilerek kullanıldı.
- Tamek %100 Üzüm suyu; 1/300 oranında çalışma tamponuyla seyreltilerek kullanıldı.
- Coca Cola; çalkalanıp bir gün bekletilerek gazı giderildikten sonra 1/33 oranında çalışma tamponuyla seyreltilerek kullanıldı.
- Fanta; çalkalanıp bir gün bekletilerek gazı giderildikten sonra 1/75 oranında çalışma tamponuyla seyreltilerek kullanıldı.
- Güzel Marmara beyaz şarap; 1/200 oranında çalışma tamponuyla seyreltilerek kullanıldı.
- Efes Pilsen açık renk bira; çalkalanıp bir gün bekletilerek gazı giderildikten sonra 1/100 oranında çalışma tamponuyla seyreltilerek kullanıldı.

4. SONUÇLAR

4.1 Biyosensörlerin Hazırlanma Koşullarının Optimizasyonuna Ait Bulgular

4.1.1 Doku miktarının biyosensör cevapları üzerine etkisi

Bu çalışmada muz kabuğu dokusu homojenatı ve taze bakla dokusu homojenatı miktarlarının biyosensör cevabı üzerine etkileri belirlendi. Bu amaçla yapılan denemeler sonunda elde edilen doku miktarları ile biyosensör cevabı arasındaki ilişki Şekil 4.1 ve Şekil 4.2' de verildi.

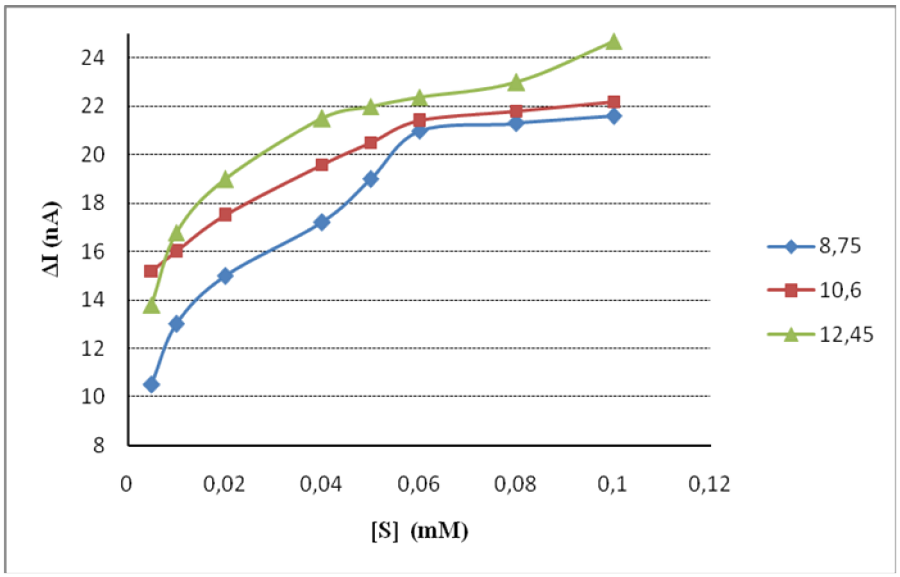


Şekil 4.1 Muz kabuğu biyosensörü için doku miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Biyoaktif tabakadaki bitkisel doku miktarının artması, elektrodun yüzey alanında ve cm^2 ye düşen enzim miktarında artışa sebep olur. Bu nedenle doku miktarı artışı ile biyosensör cevabının artması beklenen bir sonuçtur.

Ancak artan doku miktarıyla birlikte biyoaktif tabakanın kalınlaşması kaçınılmazdır. Bu durumda tabakanın kalınlaşması difüzyon problemlerine neden olabilir. Ayrıca bitkisel doku miktarındaki artış, protein miktarında ve dolayısıyla glutaraldehitin oluşturduğu çapraz bağ sayısında da artışa neden olur. Çapraz bağ sayısının artması enzimlerin aktif merkezlerinin çevresinde bir sterik engel oluşturur. Bu gibi nedenlerle muz kabuğu biyosensöründe doku miktarı 7,96 mg/cm^2 den 11,94

mg/cm^2 ye çıkarıldığında ve taze bakla biyosensöründe doku miktarı 10,60 mg/cm^2 den 12,45 mg/cm^2 ye çıkarıldığında, düşük kateşol konsantrasyonlarında biyosensör cevabının da düşük olması olasıdır. Substrat konsantrasyonun yüksek olduğu denemelerde difüzyon engeli etkisini lineerliği bozarak göstermektedir.

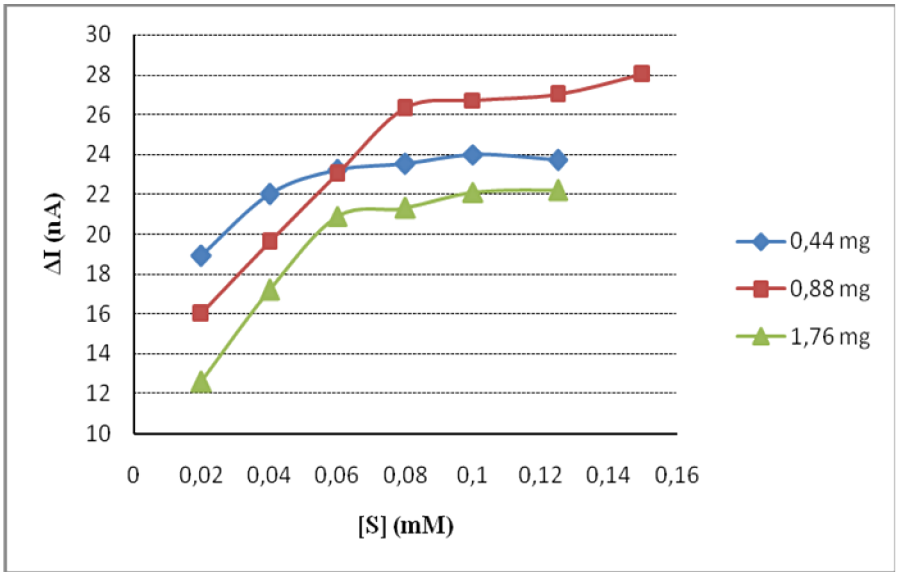


Şekil 4.2 Taze bakla biyosensörü için doku miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

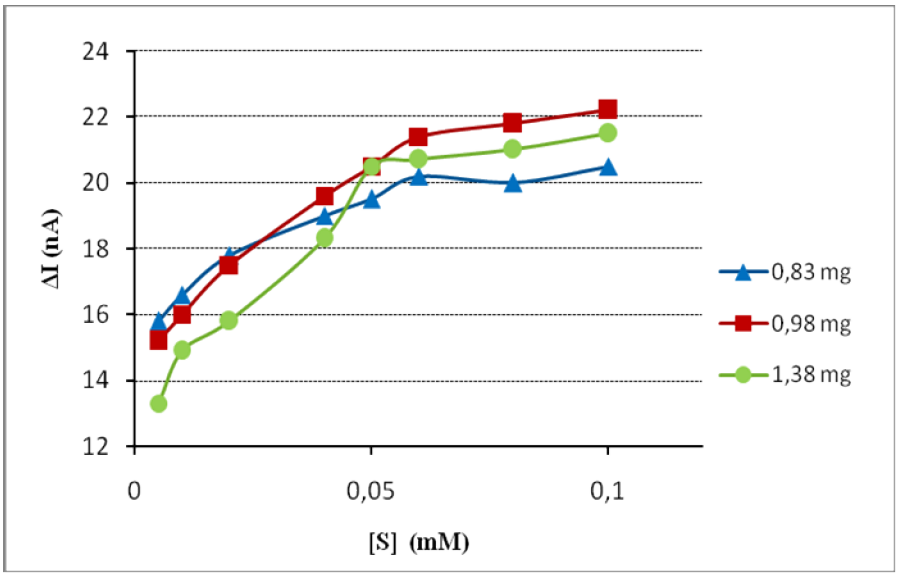
Doğal olarak bu tür etkilerin sadece substrat için değil oksijen geçirgenliği için de söz konusu olduğu göz önüne alındığında, doğrusallık ve eğim açısından da muz kabuğu biyosensörü için 7,96 mg/cm^2, taze bakla biyosensörü için ise 10,60 mg/cm^2 doku miktarlarının ideale yakın optimum koşullar olduğu görülmektedir.

4.1.2 Jelatin miktarının biyosensör cevapları üzerine etkisi

Çalışmanın bu kısmında immobilizasyon için kullanılan jelatin miktarlarının biyosensörlerin cevabı üzerine etkisi incelendi. Biyosensörlerin hazırlanmasında kullanılan jelatin miktarları ile biyosensör cevapları arasındaki ilişki Şekil 4.3 ve Şekil 4.4' de verildi.



Şekil 4.3 Muz kabuğu biyosensörü için jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi



Şekil 4.4 Taze bakla biyosensörü için jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Biyoaktif tabakadaki jelatin miktarının artması biyoaktif tabaka yoğunluğunu arttırarak hem oksijen hem de substrat için difüzyonu zorlaştırır. Her iki biyosensörde de jelatin miktarındaki artış ile biyosensör cevabının düşmesi beklenen bir sonuçtur.

Jelatin miktarının; muz kabuğu biyosensöründe 0,88 mg/cm^2 den 0,44 mg/cm^2 ye ve taze bakla biyosensöründe 0,98 mg/cm^2 den 0,83 mg/cm^2 ye düşürülmesiyle düşük

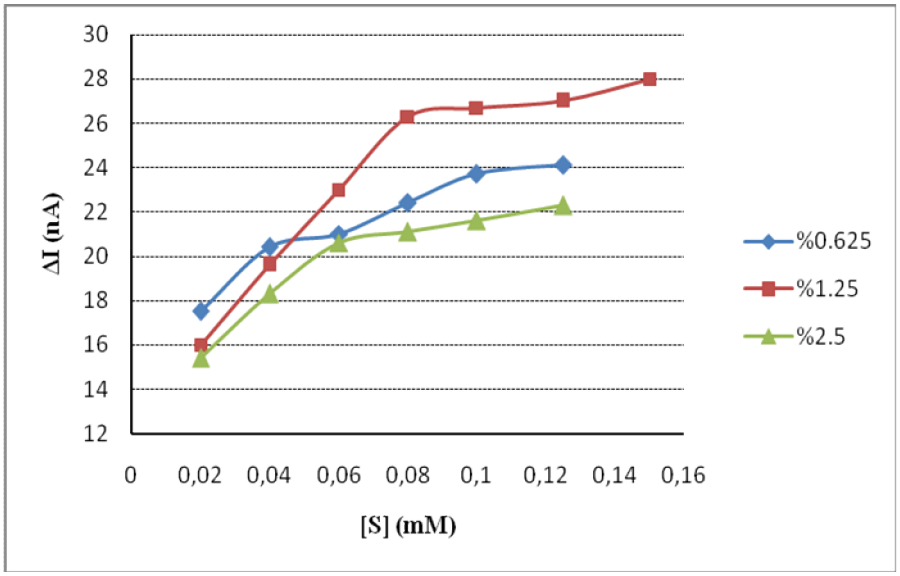
kateşol konsantrasyonlarında biyosensör cevabının da yüksek olması, substrat konsantrasyonu arttıkça biyosensör cevabının düşmesi, biyoaktif tabakanın yeterli yoğunlukta olmaması nedeniyle substrat ve oksijen kaçışlarının olabileceği göz önüne alındığında olası bir sonuçtur.

Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'den de görülebileceği gibi doğrusal aralığı en iyi olan biyosensör cevabı, biyoaktif tabakada; muz kabuğu biyosensörü için 0,88 mg/cm^2, taze bakla biyosensörü için ise 0,98 mg/cm^2 jelatin içerecek şekilde hazırlanmış olan biyosensörler ile alındı.

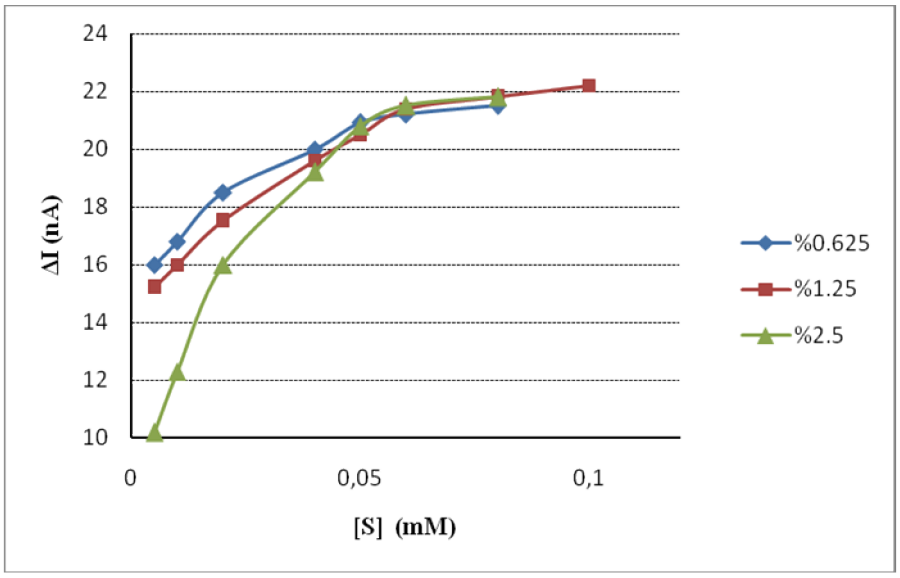
4.1.3 Glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevapları üzerine etkisi

Optimum doku ve jelatin miktarları belirlendikten sonra, glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevapları üzerine etkisinin belirlenmesi için doku miktarları ve jelatin miktarları optimum değerlerde sabit tutularak değişen glutaraldehit miktarlarıyla taze bakla ve muz kabuğu biyosensörleri hazırlandı.

Hazırlanan biyosensörler ile çapraz bağlayıcı glutaraldehitin biyosensör cevabı üzerine etkisi incelendi. Sonuçlar Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verildi.



Şekil 4.5 Muz kabuğu biyosensörü için glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisi



Şekil 4.6 Taze bakla biyosensörü için glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisi

Glutaraldehit yüzdesinin düşük olması durumunda oluşacak çapraz bağ sayısının, glutaraldehit yüzdesinin daha yüksek olduğu duruma göre daha az olması biyoaktif tabakanın daha geniş gözenekli olmasına yol açar. Bu nedenle her iki doku sensöründe de düşük glutaraldehit miktarlarında biyosensör cevabının yüksek olması beklenen bir sonuçtur. Çünkü biyoaktif tabakanın gözenek boyutunun büyük olması kateşolün biyoaktif tabakaya difüzyonunu kolaylaştırır.

Düşük glutaraldehit miktarları kullanılarak hazırlanan biyosensörlerde enzim-jelatin, enzim-enzim ve jelatin-jelatin arasındaki çapraz bağ sayısının yetersizliğinden substratın biyoaktif tabakadan geri kaçışı mümkündür. Ayrıca ara yüzey çözünmüş oksijen konsantrasyonu, özellikle yüksek kateşol konsantrasyonlarında oksijenin dışarıdan kolay difüzyonu nedeniyle kateşol konsantrasyonuyla orantılı olarak düşmemektedir. Bu durum, oksijen konsantrasyonuyla orantılı olan, devreden geçen akım miktarında da düşüşü engeller. İmmobilizasyonlarda kullanılan glutaraldehit yüzdesinin her iki biyosensörde de % 1,25 den % 0,625'e düşürülmesiyle artan kateşol konsantrasyonlarında akımda beklenen artışın olmaması beklenen olası sonuçlardan biridir.

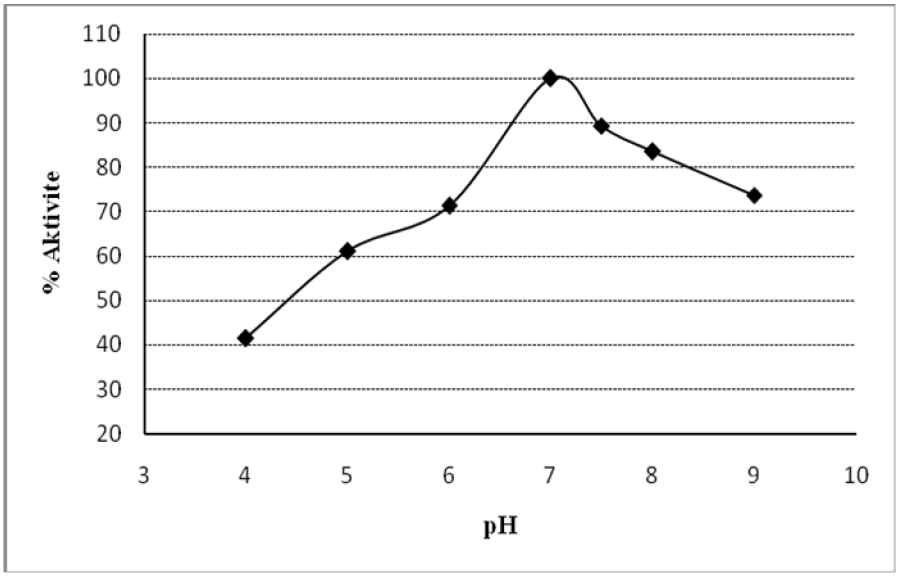
Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'dan da görüldüğü gibi lineer biyosensör cevabının en iyi olduğu glutaraldehit miktarları her iki biyosensör için de % 1.25 olarak belirlendi.

4.2 Biyosensörlerin Çalışma Koşullarının Optimizasyonuna Ait Bulgular

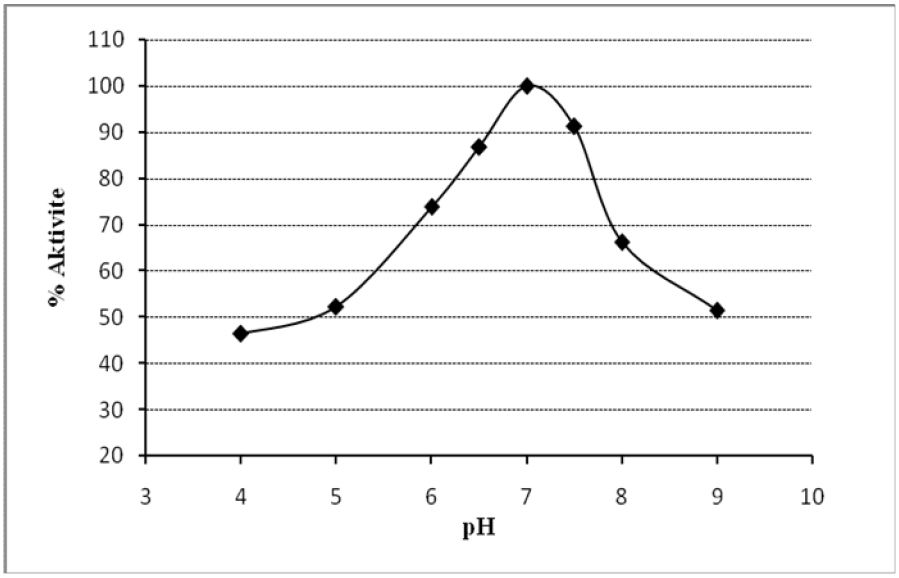
4.2.1 En uygun pH değerleri

Muz kabuğu dokusu ve taze bakla biyosensörlerinin biyoaktif tabaka ve immobilizasyon bileşenlerinin optimizasyonu sonrası, her biyosensörün optimizasyon koşullarında yeni biyosensörler hazırlanarak bu biyosensörlere ilişkin optimum pH taramaları yapıldı.

Geliştirilen iki farklı bitkisel doku temelli biyosensör ile yapılan denemelerde biyosensörlerin en iyi cevabı pH 7.0 değerinde verdikleri görüldü. Sonuçlar Şekil 4.7 ve Şekil 4.8' de verildi.



Şekil 4.7 Muz kabuğu biyosensörü için optimum pH grafiği



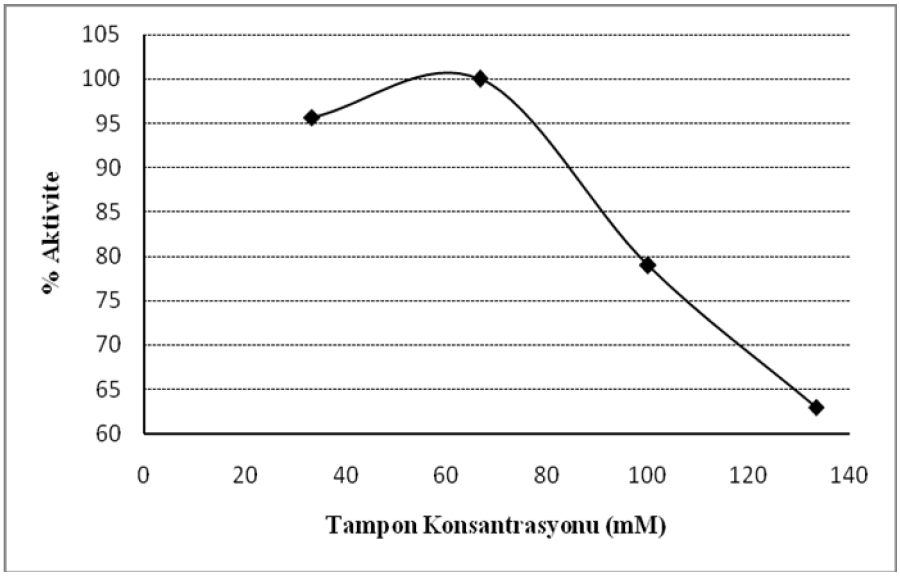
Şekil 4.8 Taze bakla biyosensörü için optimum pH grafiği

Her iki doku biyosensöründe de optimum pH değerinin 7 civarında bulunması, immobilizasyon yöntemlerinin ve reaksiyonu gerçekleştiren biyobileşenlerin yani enzimlerin polifenol oksidazlar olması göz önüne alındığında beklenen bir sonuçtur.

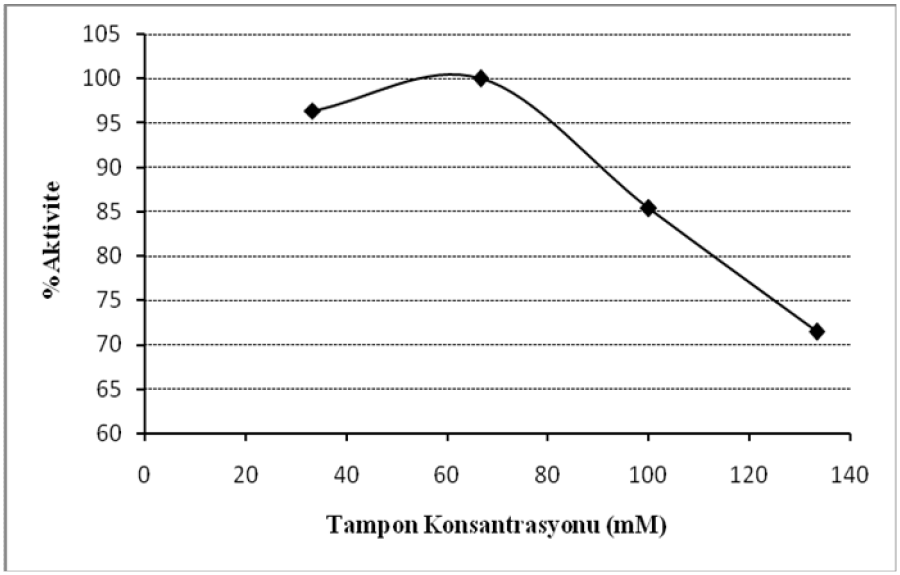
4.2.2 En uygun tampon konsantrasyonları

Bitkisel doku temelli biyosensörlerin pH optimizasyonu sonrası, her iki doku biyosensörü için de optimum pH değerlerinde, farklı konsantrasyonlarda tamponlar kullanılarak, en iyi biyosensör cevabının hangi tampon konsantrasyonunda alındığının belirlenmesine yönelik çalışmalar yapıldı. Bu, aynı zamanda ortamın iyonik şiddetinin de optimizasyonudur.

Bu amaçla denemelerde pH 7.0 fosfat tamponunun 33-66-99 ve 133 mM'lık konsantrasyonları kullanıldı. Denemeler sonucunda her iki bitkisel doku temelli biyosensör için de en uygun çalışma tamponu konsantrasyonunun 66 mM olduğu bulundu. Sonuçlar Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verildi.



Şekil 4.9 Muz kabuğu biyosensörü için optimum tampon konsantrasyonu grafiği



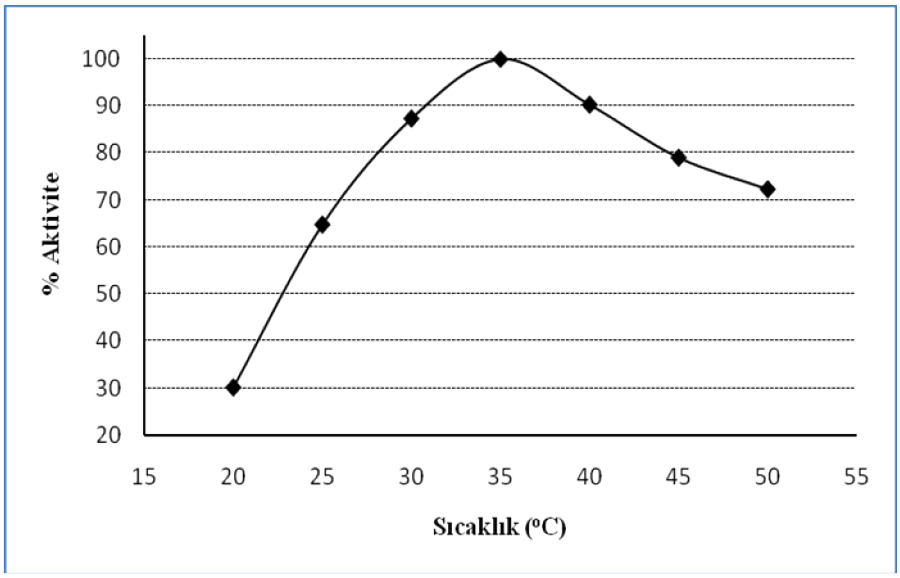
Şekil 4.10 Taze bakla biyosensörü için optimum tampon konsantrasyonu grafiği

Tampon konsantrasyonlarının artışı, iyon konsantrasyonları ve iyon şiddetlerinin artmasına neden olur. Genel olarak iyon şiddetinin artması enzim aktivitesinin azalmasıyla sonuçlanır. Bu açıdan değerlendirildiğinde her iki doku temelli biyosensör için de, tampon konsantrasyonlarının 66 mM olduğundaki biyosensör cevapları, 33 mM'lık konsantrasyonlardakine göre daha düşük bulunması, bu duruma ters görünse de, aradaki aktivite farklılıklarının çok küçük olması ve 33-66 mM gibi düşük

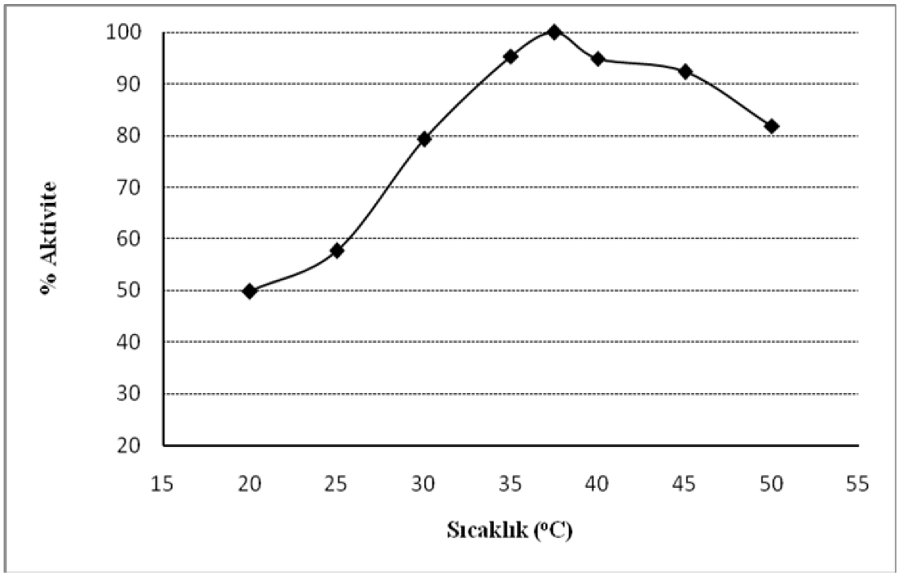
konsantrasyonlarda çalışılması, muz kabuğu ve taze bakla biyosensörleri için bu aralıktaki bir artışın enzimlerin mikro çevrelerinde aktiviteler üzerinde olumlu bir etki yapacak değişikliklere yol açtığını göstermektedir. İyon şiddetleri daha fazla arttırıldığı durumlarda ise genel enzim davranışı göz önüne alındığında, aktivitelerde belirlenen azalmalar beklenen bir sonuçtur.

4.2.3 En uygun sıcaklık değerleri

Çalışma koşulları optimizasyonun son aşamasını oluşturan bu kısımda bitkisel doku temelli biyosensörlerle 20-25-30-35-40-45 ve 50 ^{o}C'lerde denemeler gerçekleştirilerek sıcaklığın biyosensör cevabı üzerine etkisi belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.11 ve Şekil 4.12' de verildi.



Şekil 4.11 Muz kabuğu biyosensörü için optimum sıcaklık grafiği



Şekil 4.12 Taze bakla biyosensörü için optimum sıcaklık grafiği

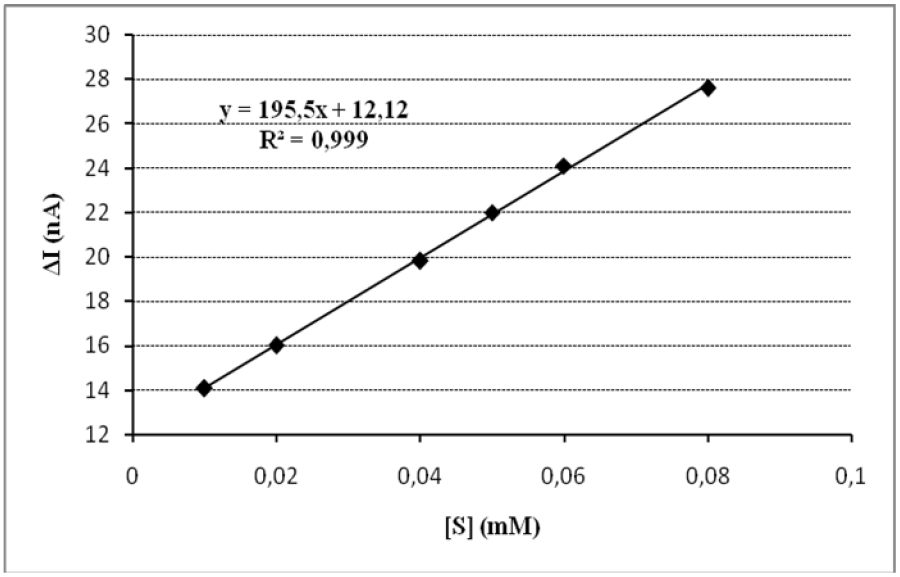
Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'den de görüldüğü gibi biyosensör cevabında muz kabuğu biyosensöründe 35 ^{o}C'ye, taze bakla biyosensöründe ise 37.5 ^{o}C'ye kadar artış, bu sıcaklıkların daha üstünde ise azalma tespit edildi. Sıcaklığın artmasıyla çözünmüş oksijen konsantrasyonlarında meydana gelen azalmalar nedeniyle biyosensör cevaplarında da azalmalar beklenirken, muz kabuğu biyosensöründe 35 ^{o}C' ye, taze bakla biyosensöründe 37.5 ^{o}C'ye kadar bir artış olmasını; enzimlerin aktivitelerinin optimum sıcaklıklarına kadar artış göstermeleriyle, bu değerlerden daha yüksek sıcaklıklarda biyosensör cevaplarında düşme gözlenmesini ise; hem optimum sıcaklığın aşılmış olmasıyla enzimlerde aktivite kayıplarının meydana gelmesi hem de doğal olarak sıcaklığın artmasıyla çözünmüş oksijen konsantrasyonunda meydana gelen azalma ile açıklamak mümkündür.

4.3 Biyosensörlerin Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

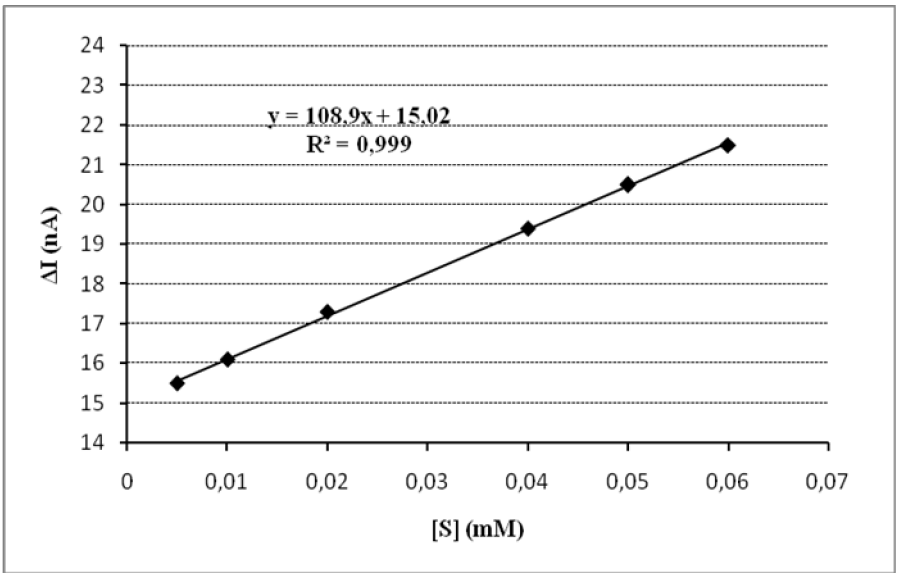
4.3.1 Kateşol lineer tayin aralıkları

Bitkisel doku temelli biyosensörlerin farklı substrat konsantrasyonlarında biyosensör cevaplarını incelemek ve kateşol standart grafiklerini belirlemek amacıyla,

kateşolün farklı konsantrasyonları kullanılarak biyosensör cevapları belirlendi. Optimum çalışma koşullarında gerçekleştirilen denemeler sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'de verildi.



Şekil 4.13 Muz kabuğu biyosensörü için kateşol kalibrasyon grafiği



Şekil 4.14 Taze bakla biyosensörü için kateşol kalibrasyon grafiği

Şekil 4.13'den görüldüğü gibi muz kabuğu biyosensörü ile kateşol tayin sınırları 10-80 µM, Şekil 4.14'den görüldüğü gibi taze bakla biyosensörü ile kateşol tayin sınırları 5-60 µM olarak belirlendi. Muz kabuğu biyosensörü daha yüksek biyosensör cevabına ve daha geniş kateşol tayin aralığına sahip olması, taze bakla biyosensörü ise daha düşük kateşol konsantrasyonlarına duyarlı olması bakımından avantajlıdır.

4.3.2 Biyosensör cevaplarının tekrarlanabilirlikleri

Bitki dokusu temelli biyosensörlerle yapılan analizlerin tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi amacıyla, sabit kateşol konsantrasyonlarında muz kabuğu biyosensörüyle artarda aktivite düşmeksizin 6, taze bakla biyosensörüyle 5 ölçüm gerçekleştirilebildi. Elde edilen biyosensör cevaplarından bulunan standart sapma (S.S) ve varyasyon katsayıları Tablo 4.1' de verildi.

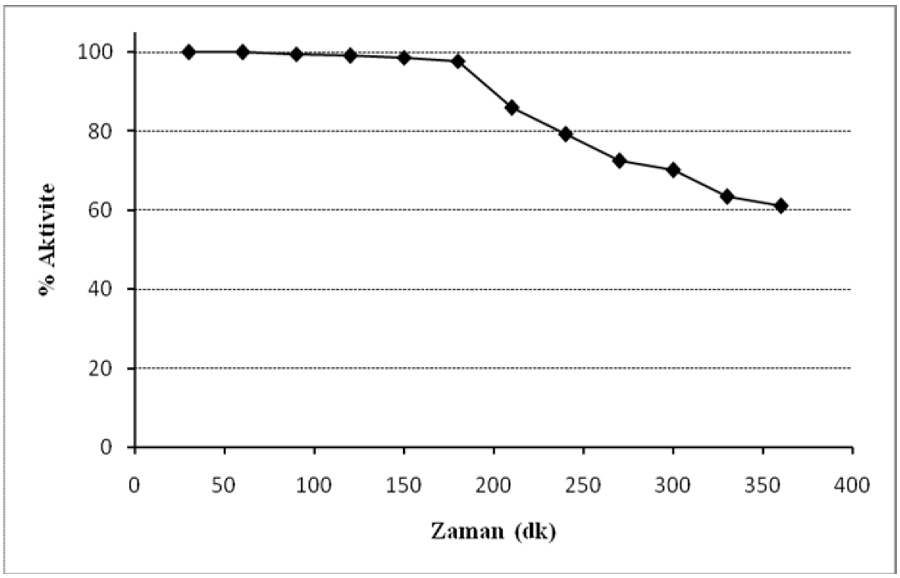
Tablo 4.1 Bitki dokusu temelli biyosensörlerde analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği

	Kateşol Kons. (mM)	**Ortalama Değer (mM)**	**Standart Sapma (mM)**	**Varyasyon Katsayısı (%)**
Muz Kabuğu Biyosensörü	0.0500	0.04975	±0.00144	%2.89
Taze bakla Biyosensörü	0.0400	0.04020	±0.00064	%1.59

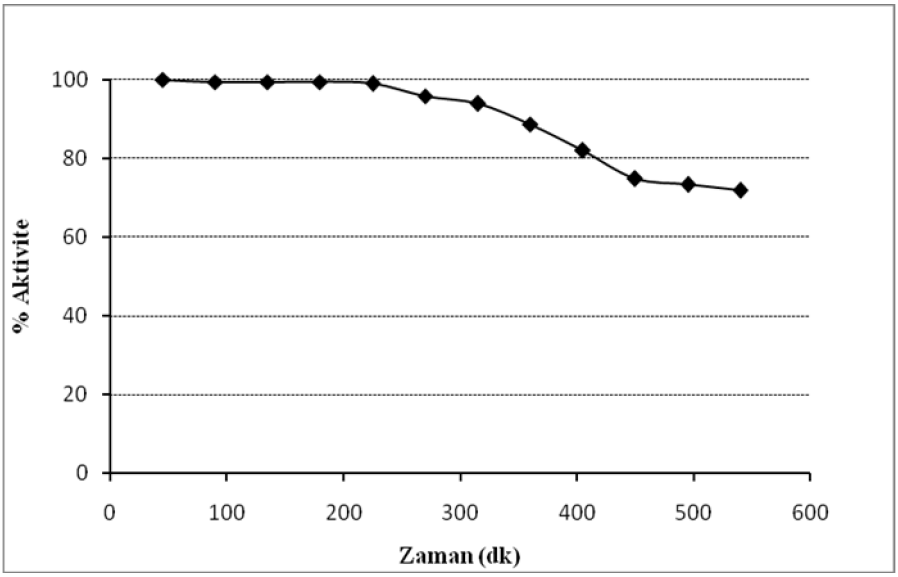
Tablodan da görüldüğü gibi her iki sensörle de oldukça iyi sonuçlar alınmış olup, kıyaslama yapılacak olursa hem varyasyon katsayısının daha düşük olması hem de daha iyi standart sapma göstermesi nedeniyle taze bakla biyosensörünün daha iyi sonuçlar verdiği söylenebilir.

4.3.3 Biyosensörlerin işlem kararlılıkları

Biti dokusu temelli biyosensörlerin işlem kararlılıklarını belirlemek amacıyla, yeni hazırlanan biyosensörler daha önceden optimizasyonları yapılan çalışma sıcaklığı (37.5 ^{o}C) ve tamponu içinde (Fosfat tamponu pH 7.0 - 66 mM) bekletilerek muz kabuğu biyosensörü ile 30dk, taze bakla biyosensörü ile 40 dk aralıklarla sabit substrat konsantrasyonlarında ölçümler alındı, sonuçlar Şekil 4.15 ve 4.16'da verildi.



Şekil 4.15 Muz kabuğu biyosensörünün işlem kararlılığı

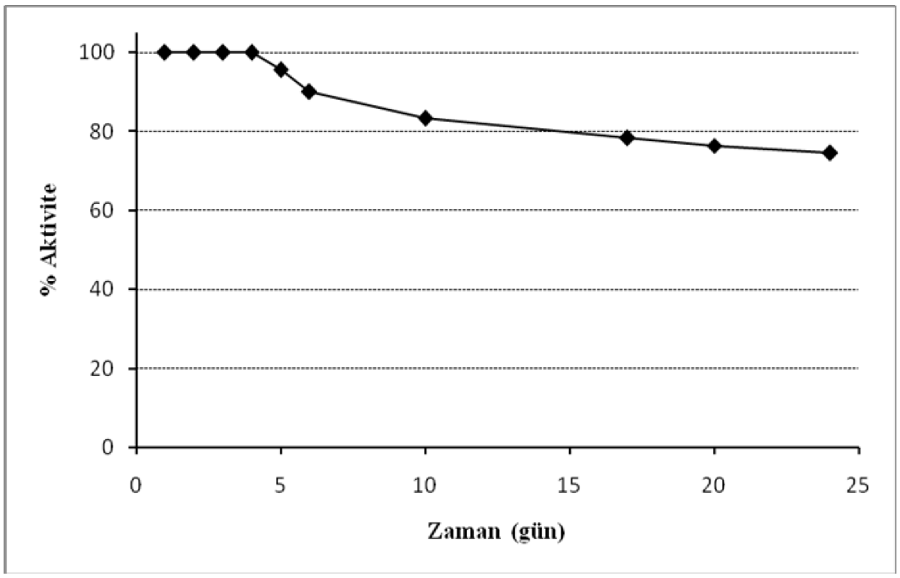


Şekil 4.16 Taze bakla biyosensörünün işlem kararlılığı

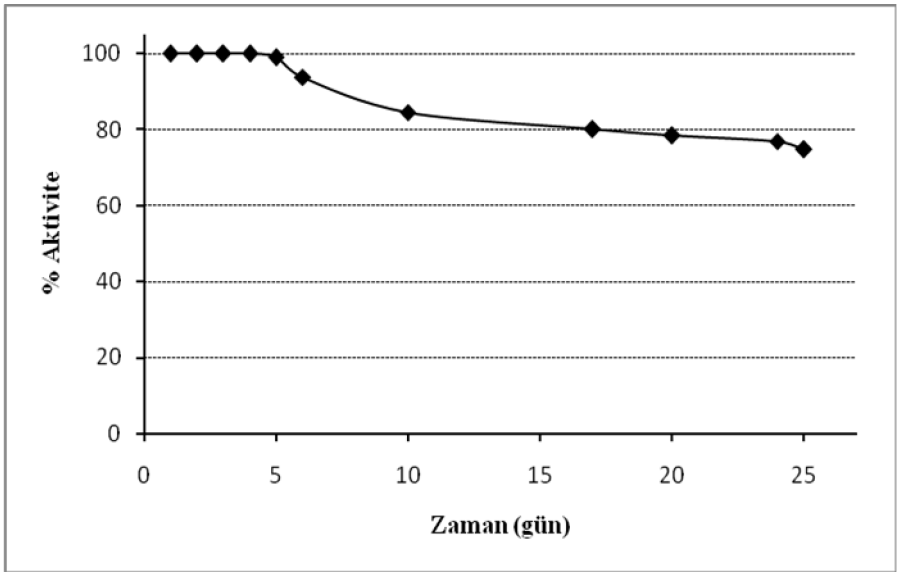
Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'dan görüldüğü gibi muz kabuğu biyosensörünün 6 ölçüm sonunda aktivitesini %98, 12 ölçüm sonunda %61 oranında koruduğu, taze bakla biyosensörünün ise aktivitesini 5 ölçüm sonunda %99, 12 ölçüm sonunda ise %72 oranında koruduğu belirlendi. Sonuçlar göz önüne alındığında aktivitelerini iyi derecede korudukları ve her iki biyosensörün de işlem kararlılıkları bakımından iyi olduğu söylenebilir.

4.3.4 Biyosensörlerin depo kararlılıkları

Bitki dokusu temelli biyosensörlerin depo kararlılığının belirlenmesi amacıyla farklı zaman aralıklarında optimum çalışma koşullarında ölçümler alındı. Sonuçlar Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de verildi.



Şekil 4.17 Muz kabuğu biyosensörünün depo kararlılığı



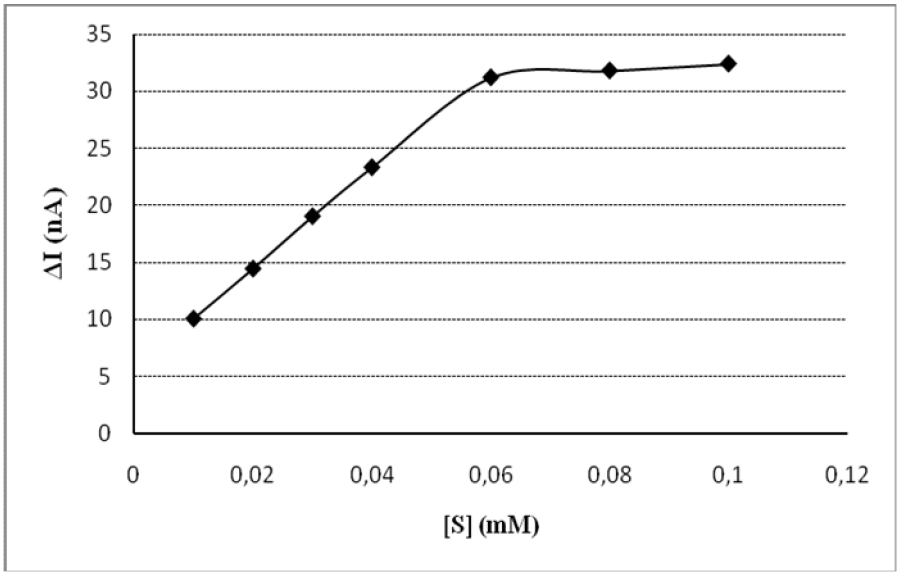
Şekil 4.18 Taze bakla biyosensörünün depo kararlılığı

Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'den görüldüğü gibi her iki bitki dokusu temelli biyosensör de yaklaşık 24 günlük zaman sonunda başlangıç aktivitelerinin %75 ini korumaktadırlar. İmmobilizasyon şekli nedeniyle 25 günlük bir depolama kararlılığı normal değerlendirilir, çünkü zamanla biyoaktif tabakada, beklemeden kaynaklanan bozulmalar gerçekleşir. Muz kabuğu biyosensöründe 25. gün taze bakla biyosensöründe ise 26. gün biyoaktif tabakada deformasyon gözlendi ve ölçümler bu sürelerin sonunda durduruldu.

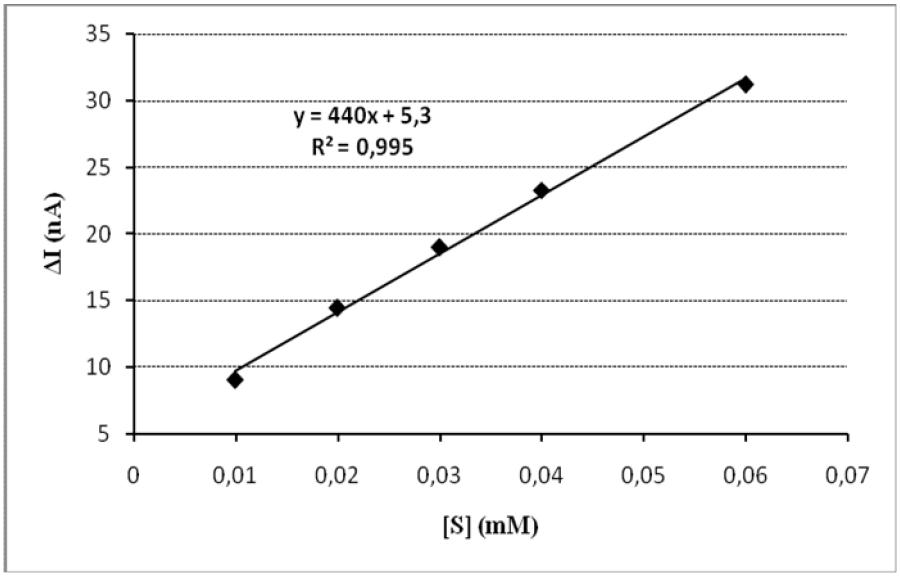
4.3.5 Farklı fenolik bileşiklerin tayin aralıkları

Hazırlanan bitki dokusu temelli biyosensörlerin farklı fenolik bileşiklere karşı kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla kateşolden farklı 12 fenolik bileşik substrat olarak kullanıldı. Her bir fenolik bileşik için biyosensör cevapları incelenerek tayin sınırları ve standart grafikleri belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.19 - Şekil 4.66 aralığında verildi.

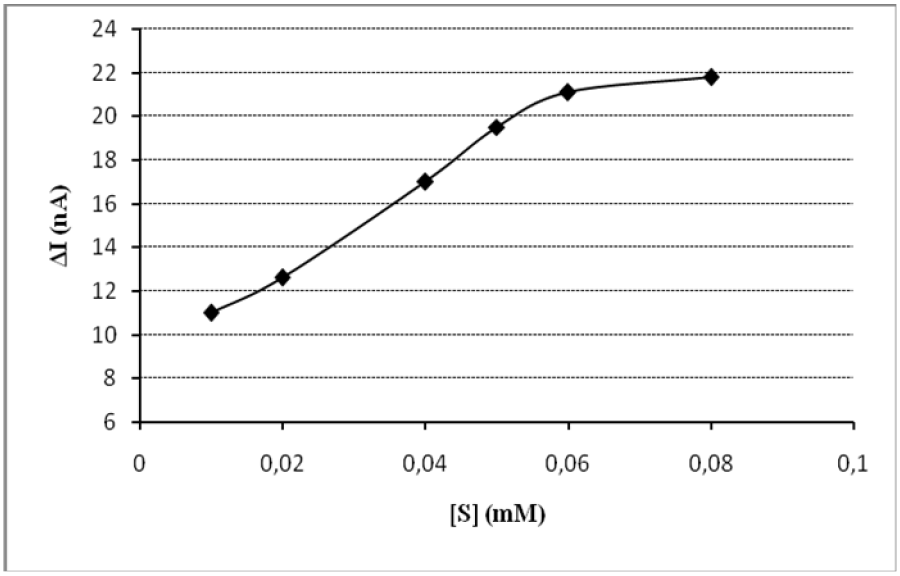
Progallol



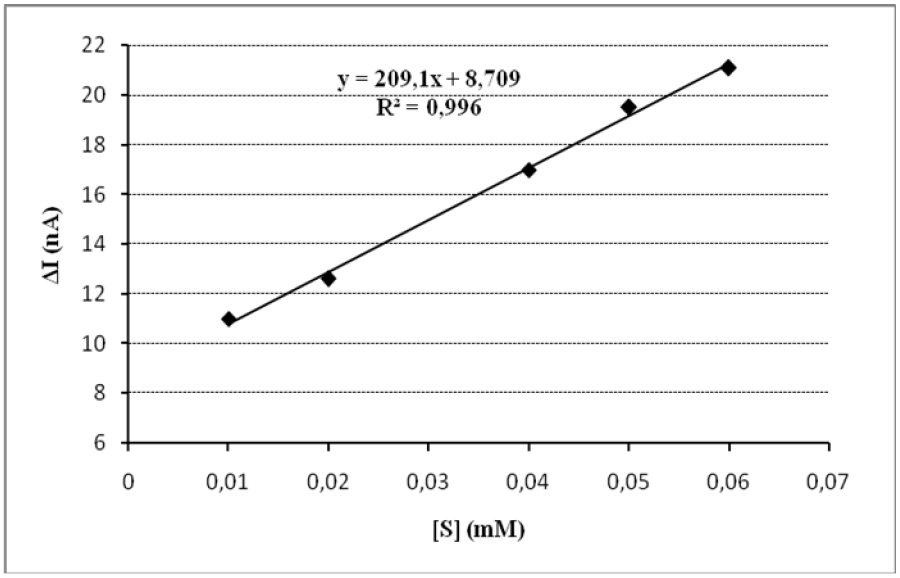
Şekil 4.19 Muz kabuğu biyosensörünün progallol tayin sınırları



Şekil 4.20 Muz kabuğu biyosensörü için progallol standart grafiği

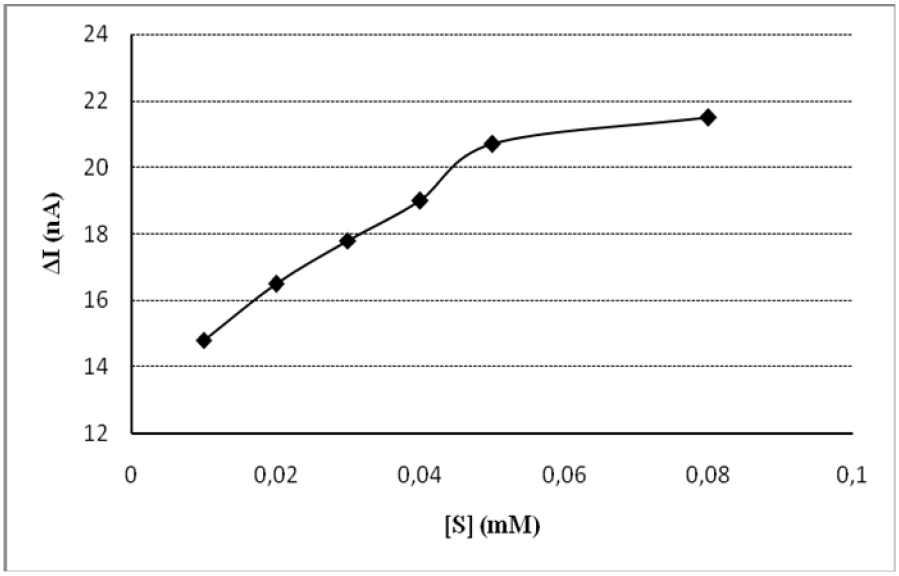


Şekil 4.21 Taze bakla biyosensörünün progallol tayin sınırları

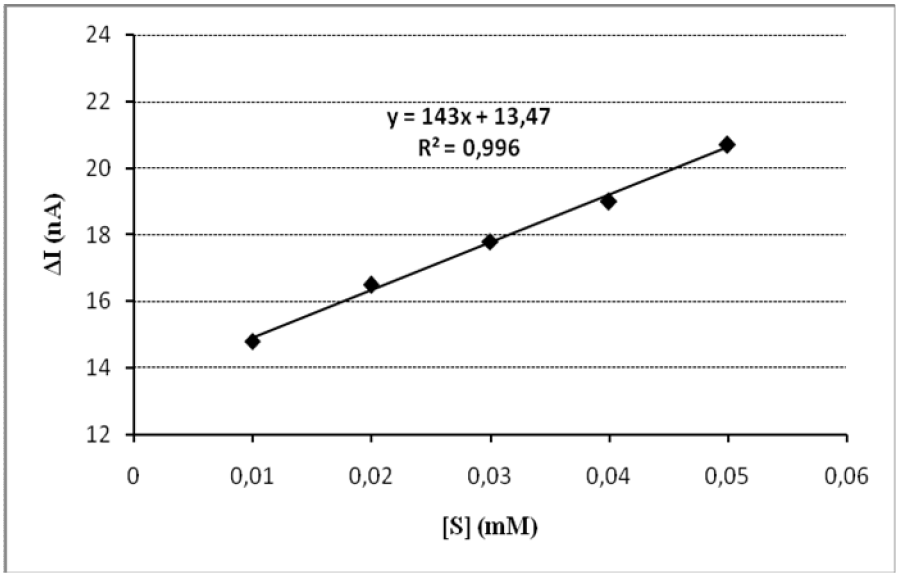


Şekil 4.22 Taze bakla biyosensörü için progallol standart grafiği

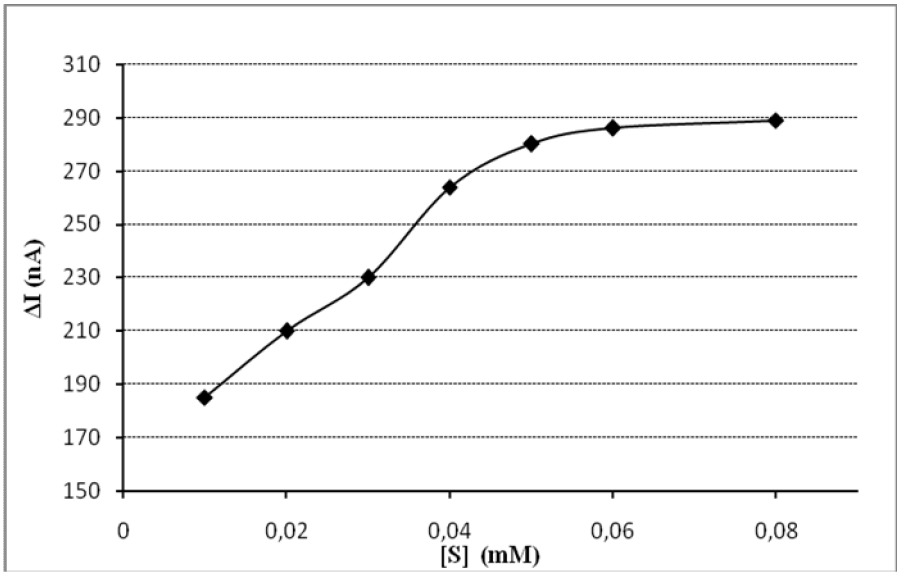
P-Kresol



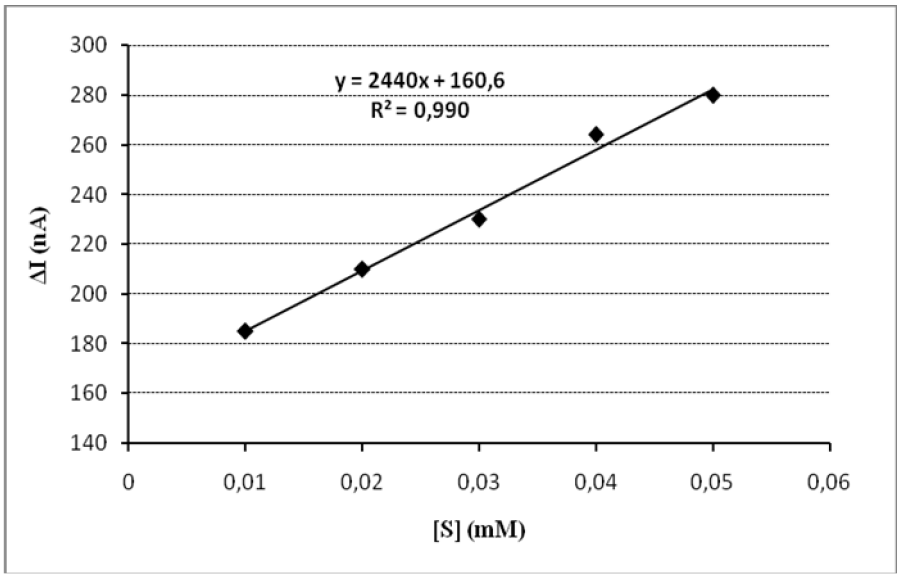
Şekil 4.23 Muz kabuğu biyosensörünün p-kresol tayin sınırları



Şekil 4.24 Muz kabuğu biyosensörü için p-kresol standart grafiği

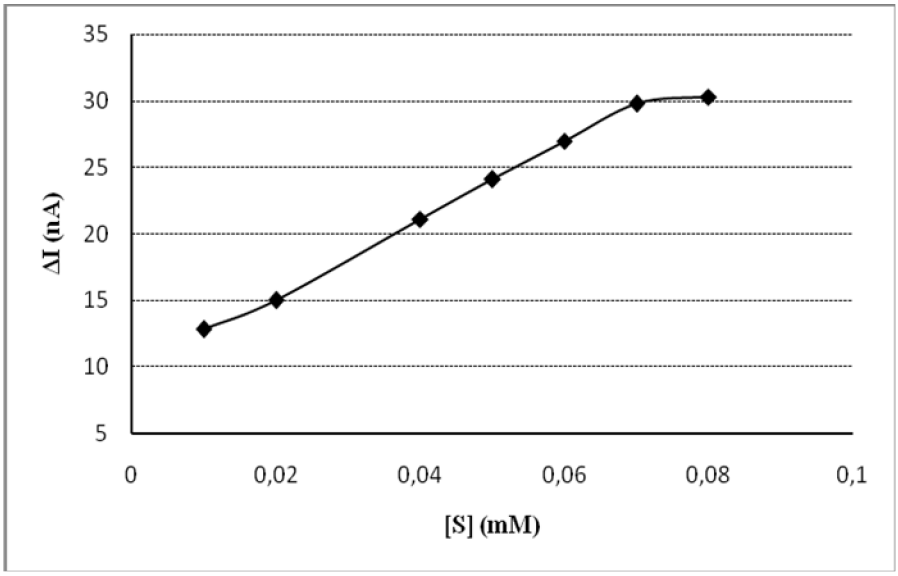


Şekil 4.25 Taze bakla biyosensörünün p-kresol tayin sınırları

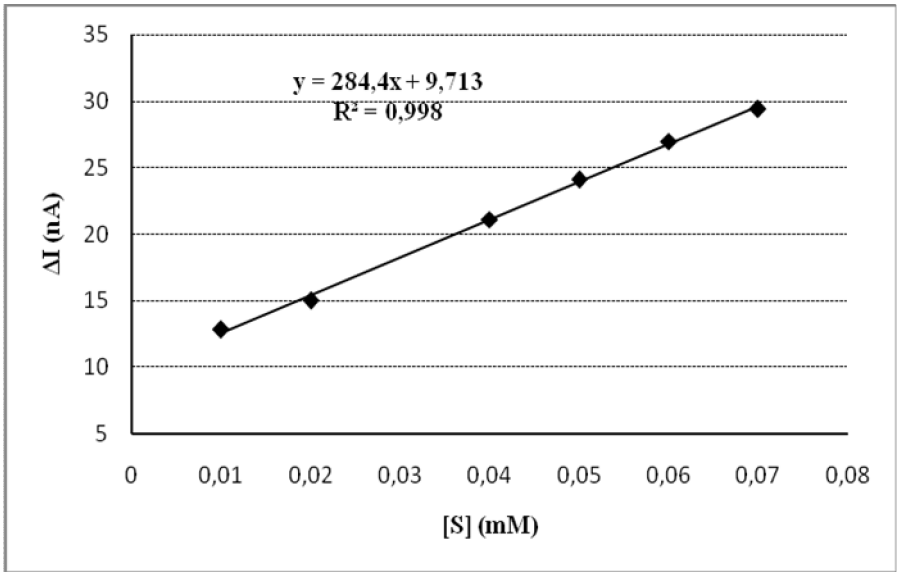


Şekil 4.26 Taze bakla biyosensörü için p-kresol standart grafiği

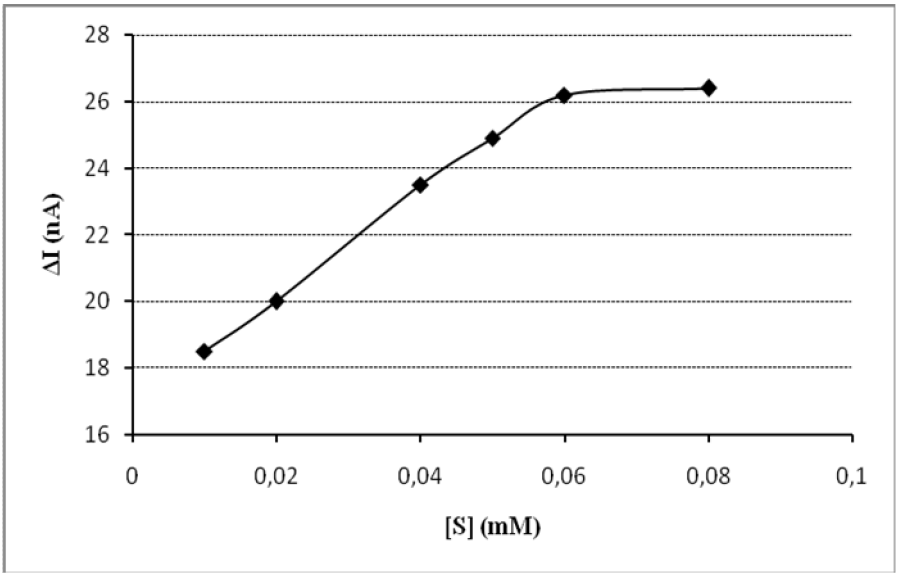
Hidrokinon



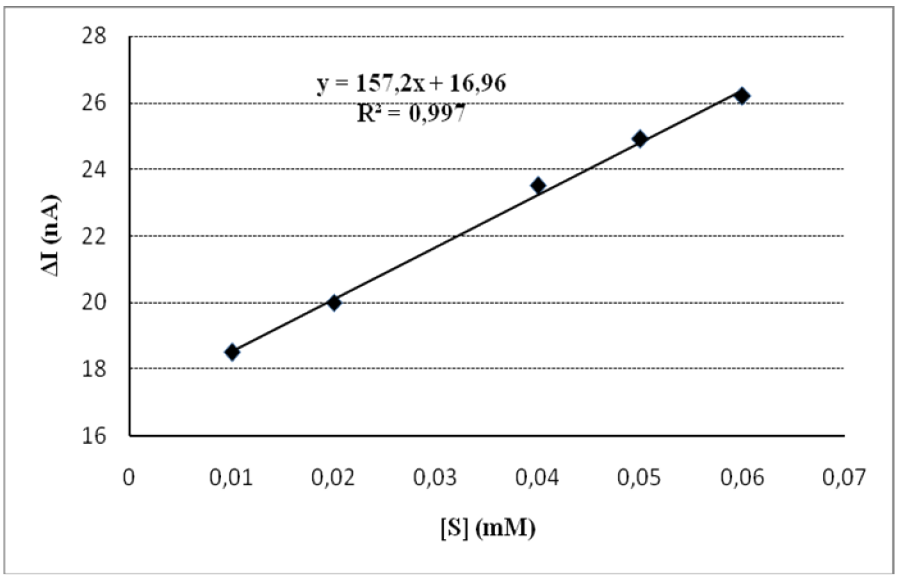
Şekil 4.27 Muz kabuğu biyosensörünün hidrokinon tayin sınırları



Şekil 4.28 Muz kabuğu biyosensörü için hidrokinon standart grafiği

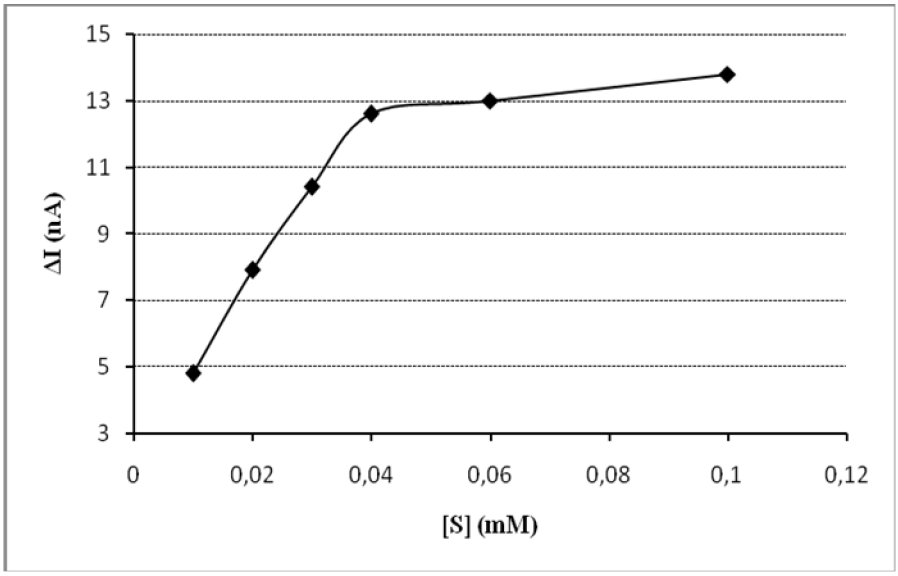


Şekil 4.29 Taze bakla biyosensörünün hidrokinon tayin sınırları

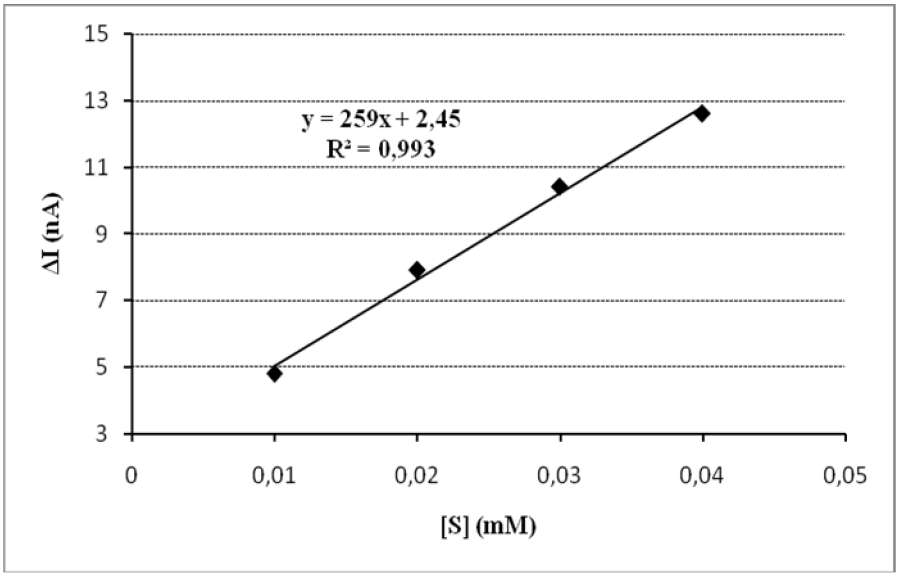


Şekil 4.30 Taze bakla biyosensörü için hidrokinon standart grafiği

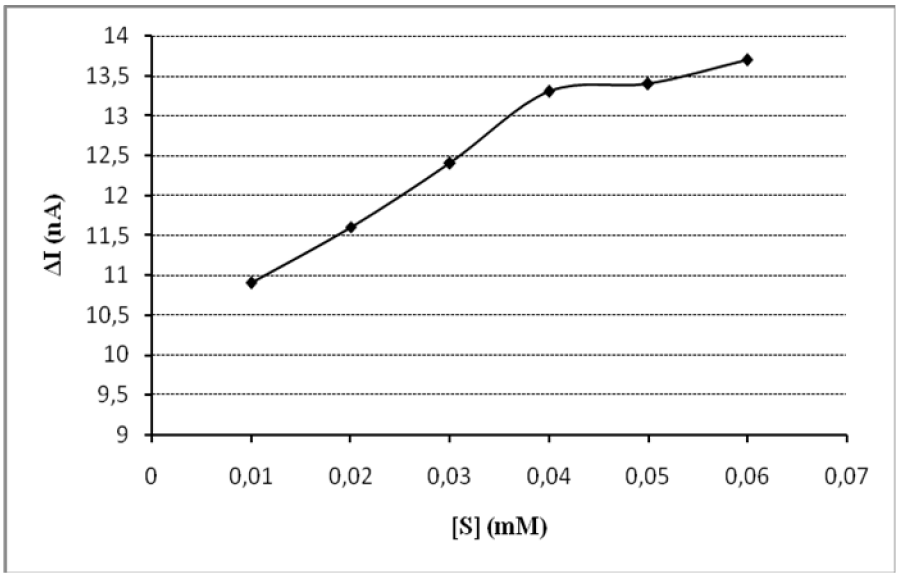
Fenol



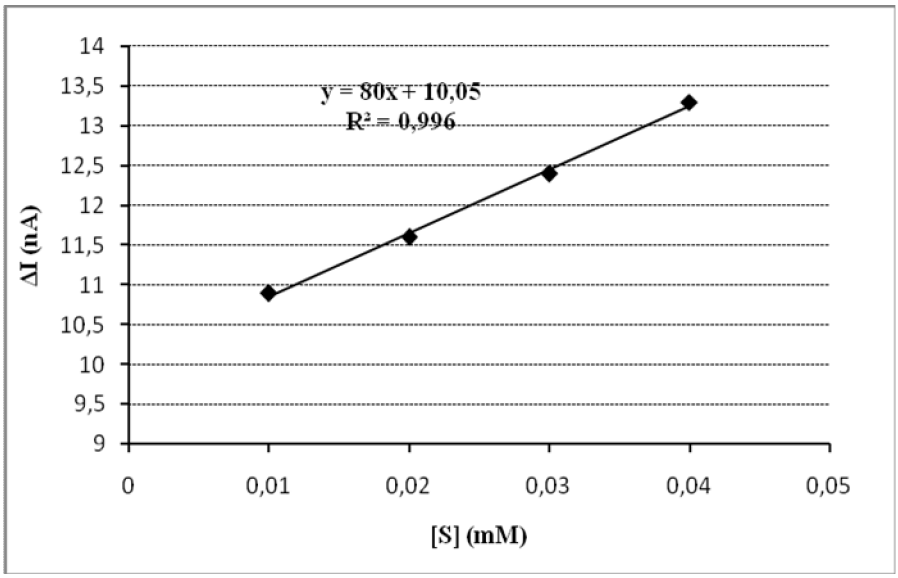
Şekil 4.31 Muz kabuğu biyosensörünün fenol tayin sınırları



Şekil 4.32 Muz kabuğu biyosensörü için fenol standart grafiği

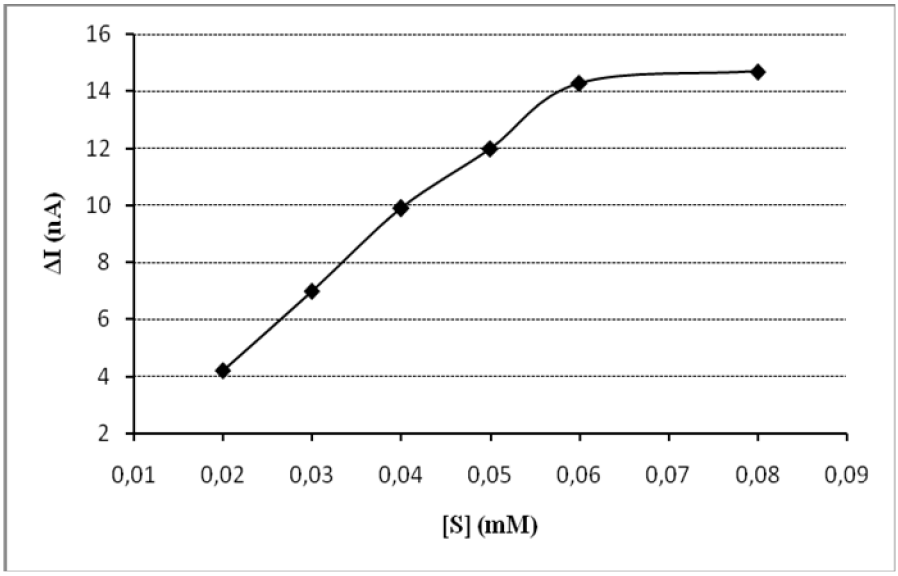


Şekil 4.33 Taze bakla biyosensörünün fenol tayin sınırları

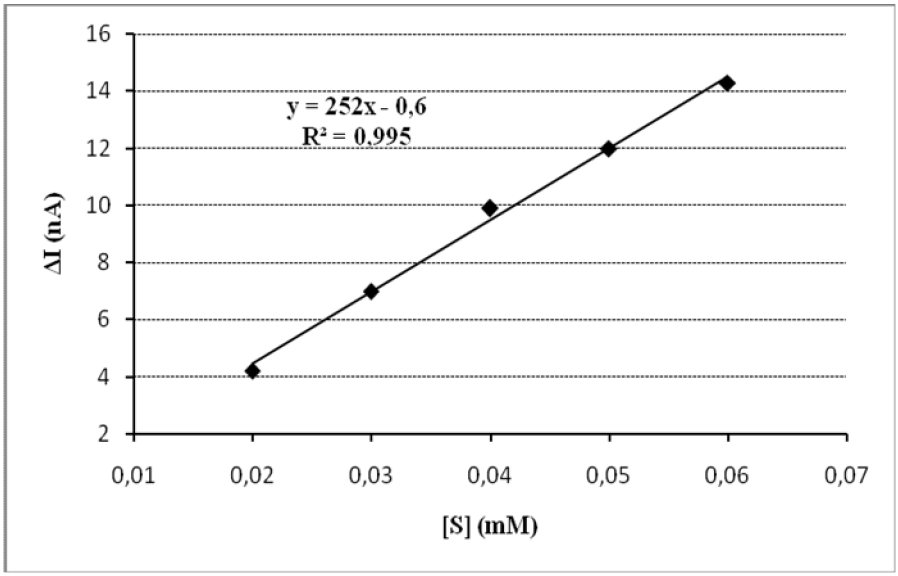


Şekil 4.34 Taze bakla biyosensörü için fenol standart grafiği

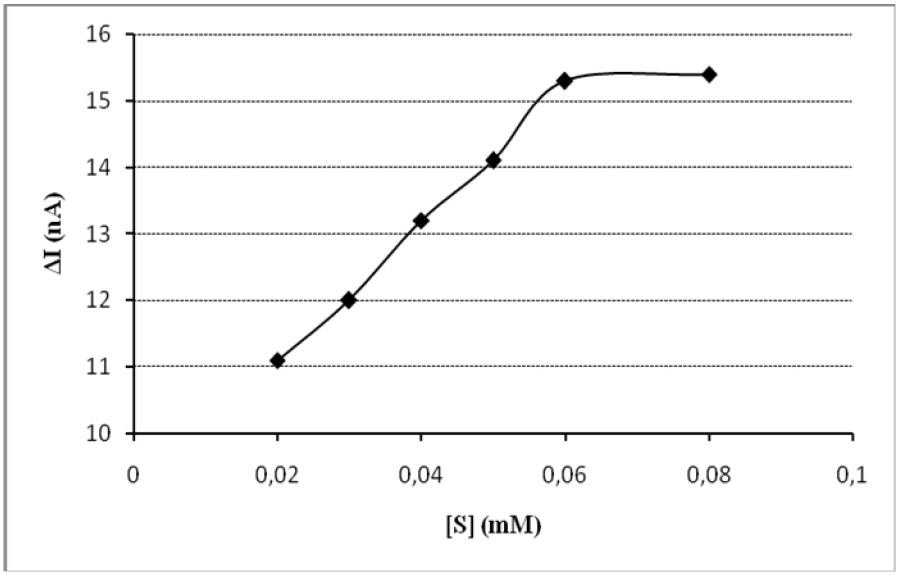
L-Dopa



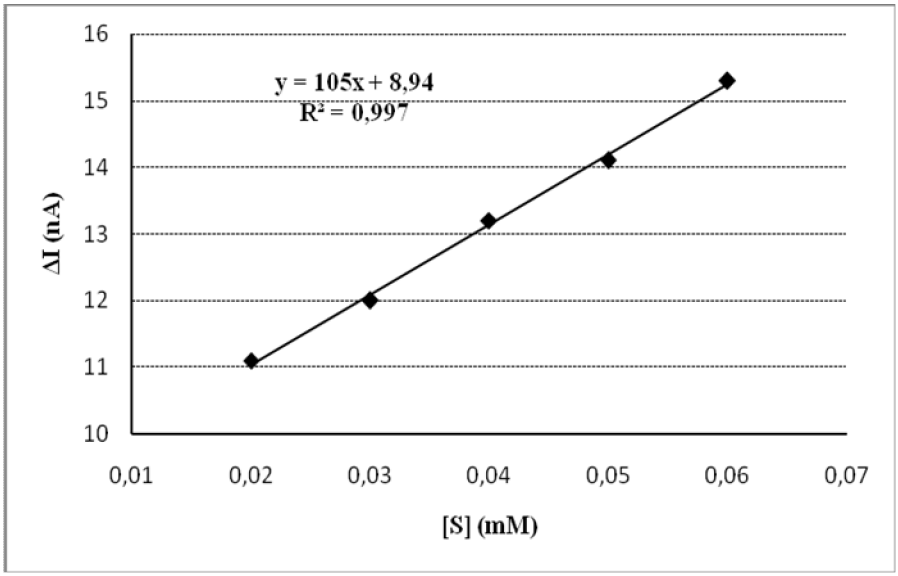
Şekil 4.35 Muz kabuğu biyosensörünün L-dopa tayin sınırları



Şekil 4.36 Muz kabuğu biyosensörü için L-dopa standart grafiği

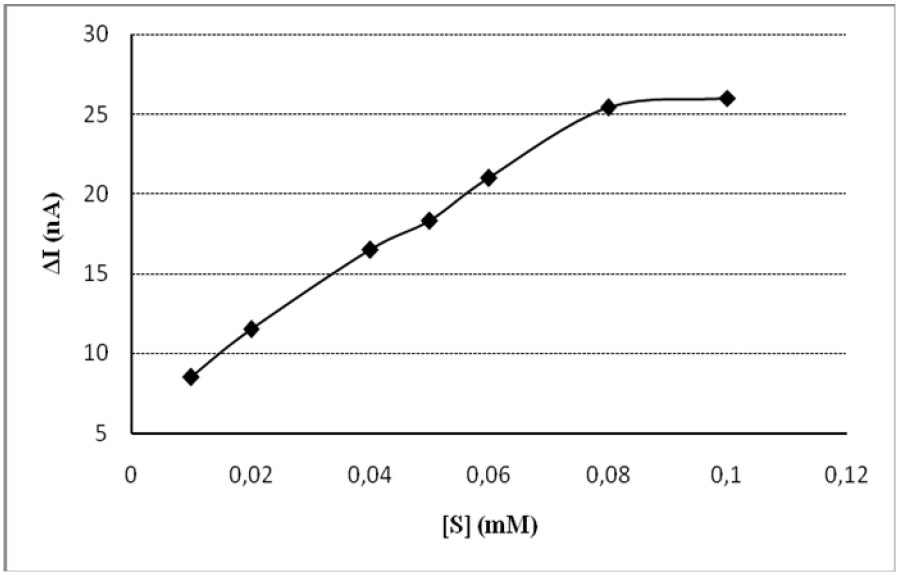


Şekil 4.37 Taze bakla biyosensörünün L-dopa tayin sınırları

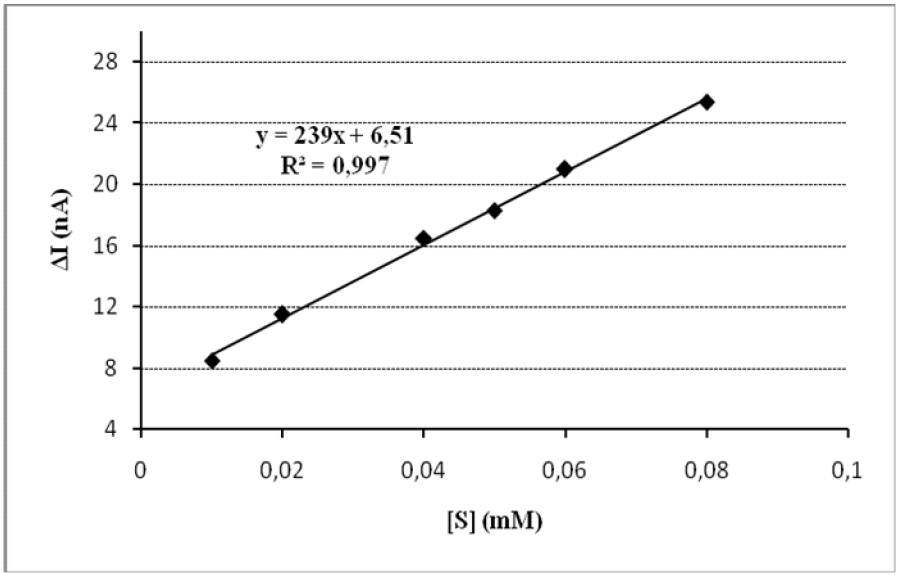


Şekil 4.38 Taze bakla biyosensörü için L-dopa standart grafiği

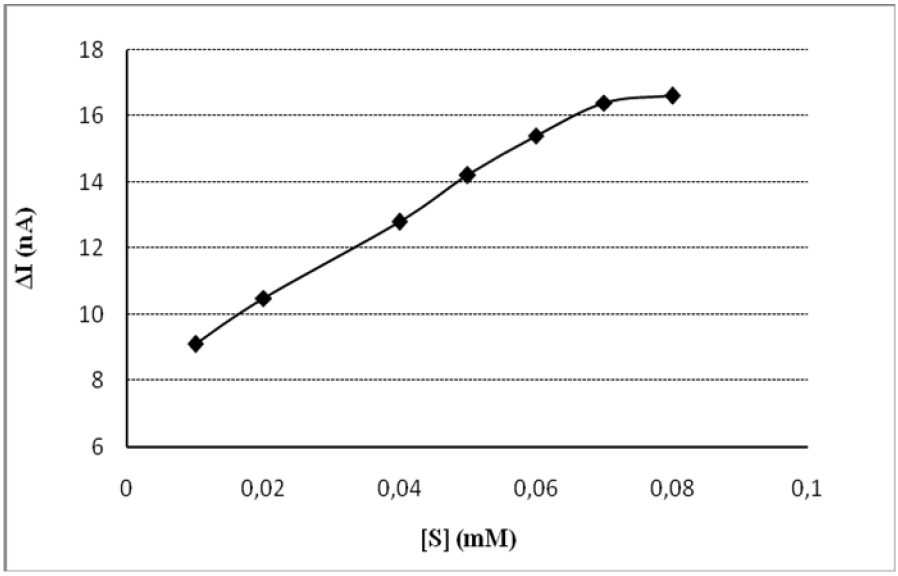
Gallik asit



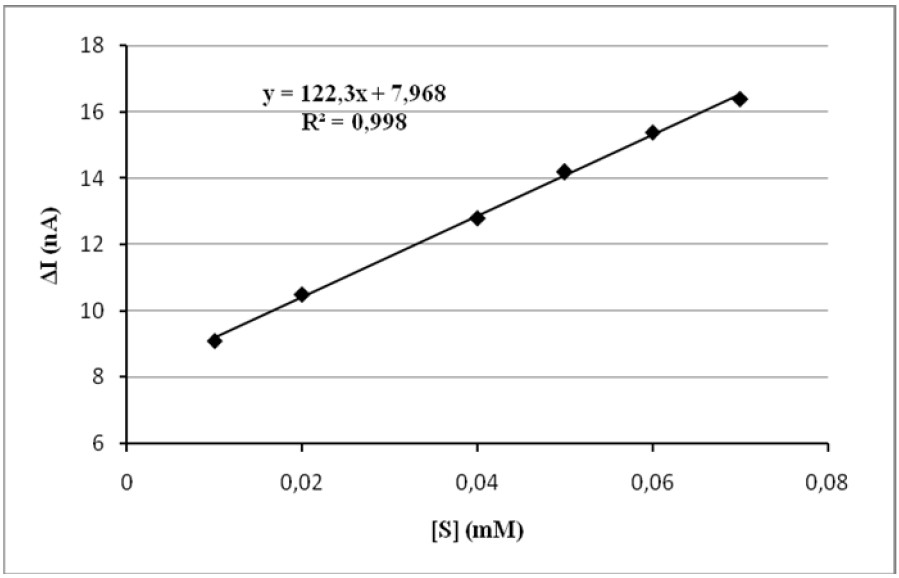
Şekil 4.39 Muz kabuğu biyosensörünün gallik asit tayin sınırları



Şekil 4.40 Muz kabuğu biyosensörü için gallik asit standart grafiği

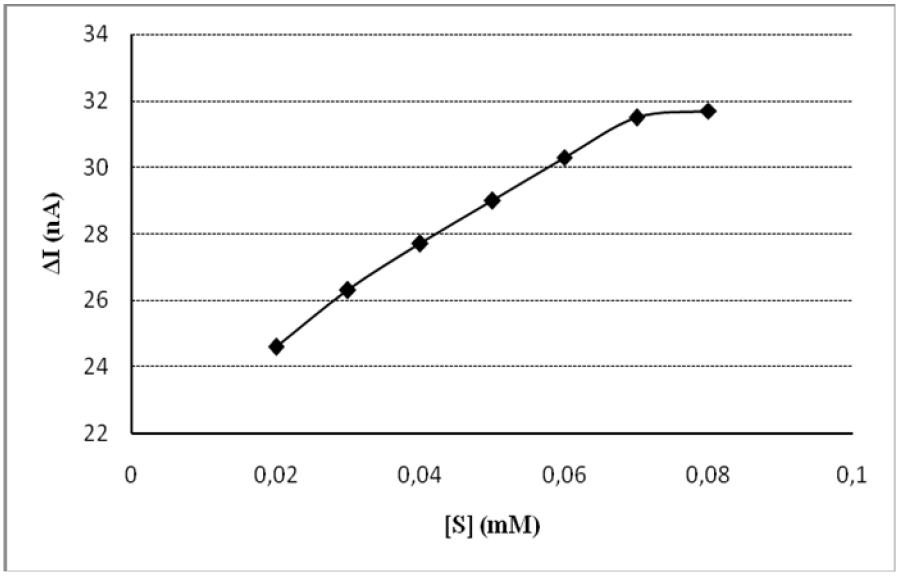


Şekil 4.41 Taze bakla biyosensörünün gallik asit tayin sınırları

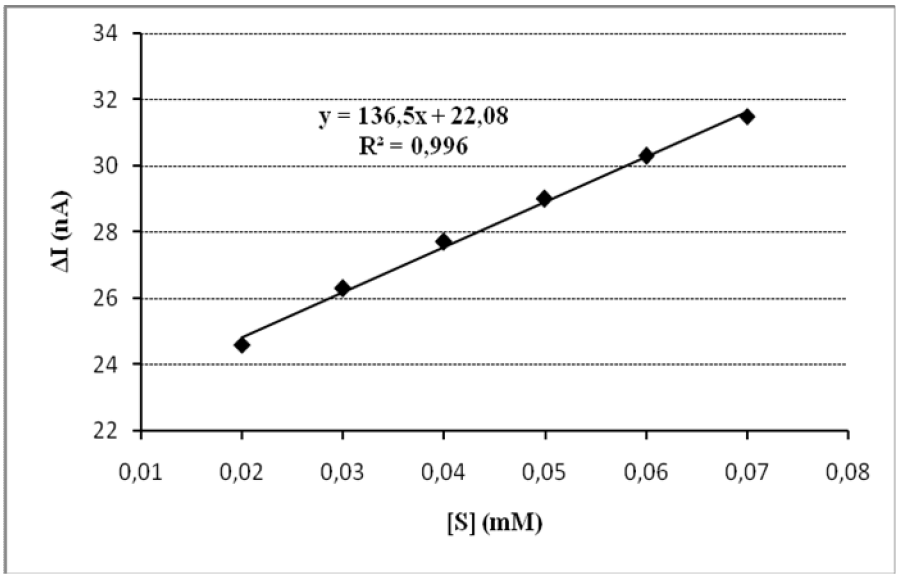


Şekil 4.42 Taze bakla biyosensörü için gallik asit standart grafiği

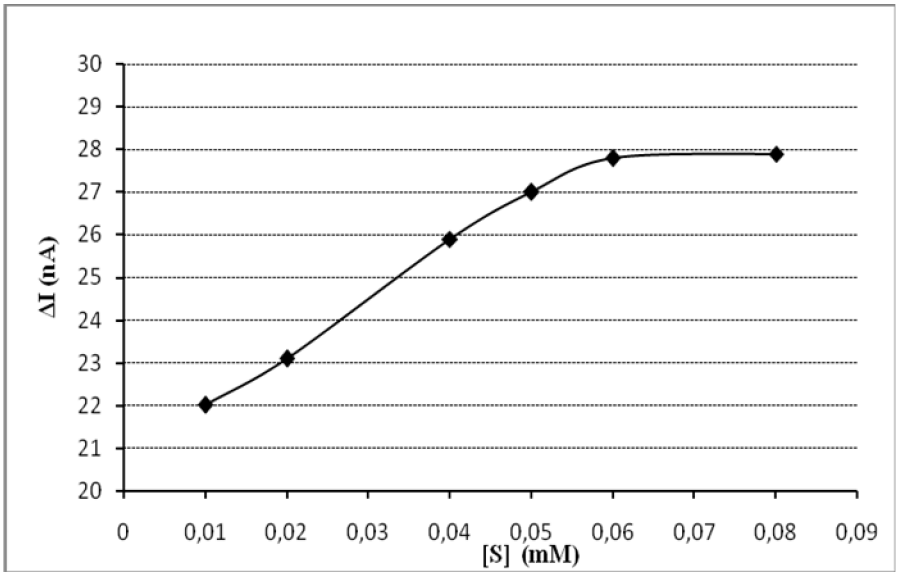
Kaffeik asit



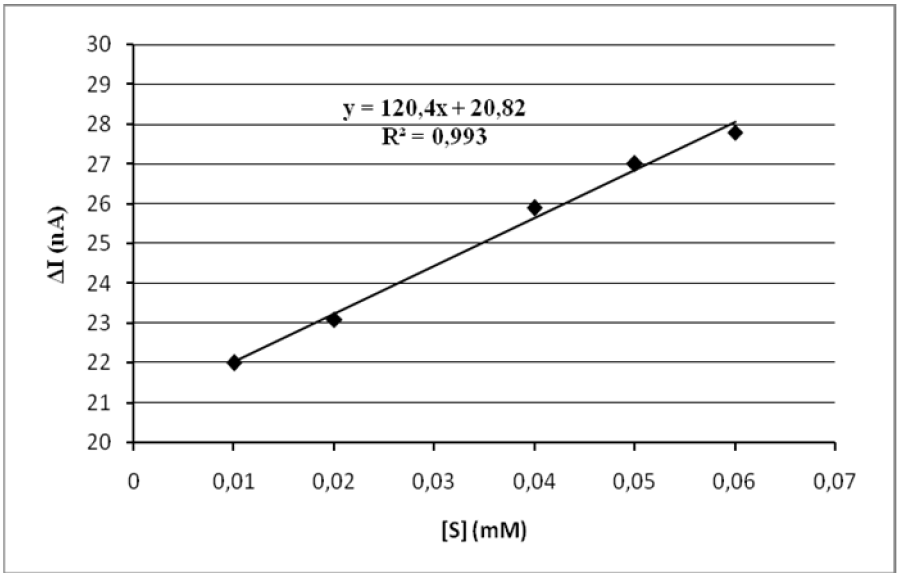
Şekil 4.43 Muz kabuğu biyosensörünün kaffeik asit tayin sınırları



Şekil 4.44 Muz kabuğu biyosensörü için kaffeik asit standart grafiği

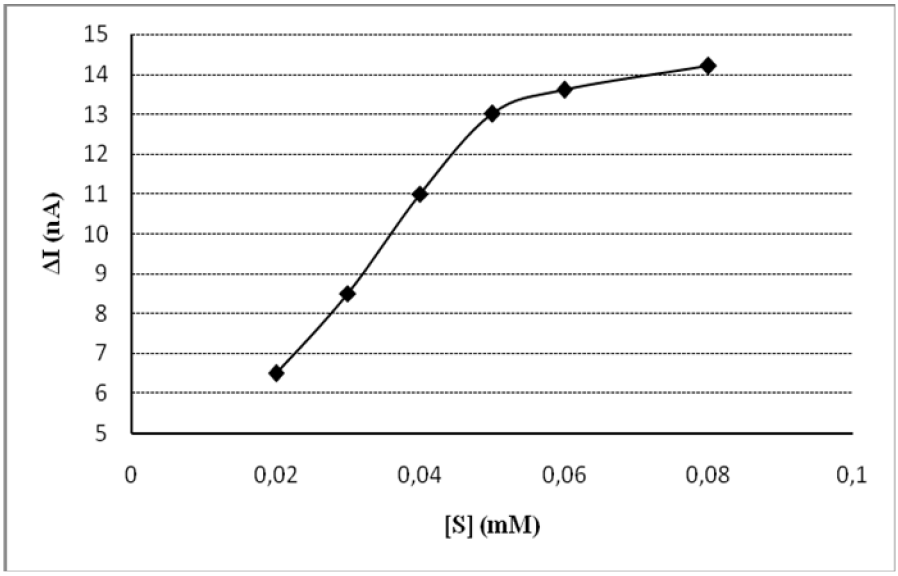


Şekil 4.45 Taze bakla biyosensörünün kaffeik asit tayin sınırları

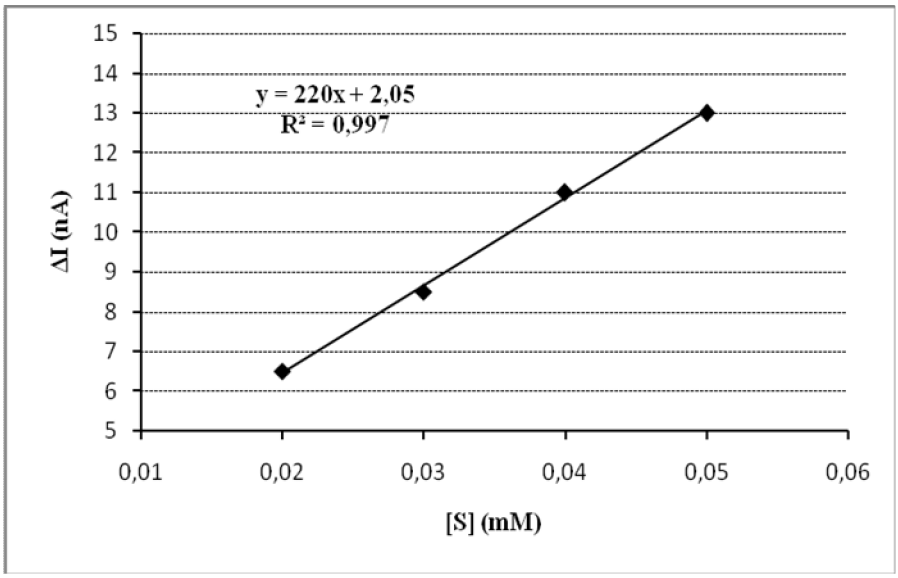


Şekil 4.46 Taze bakla biyosensörü için kaffeik asit standart grafiği

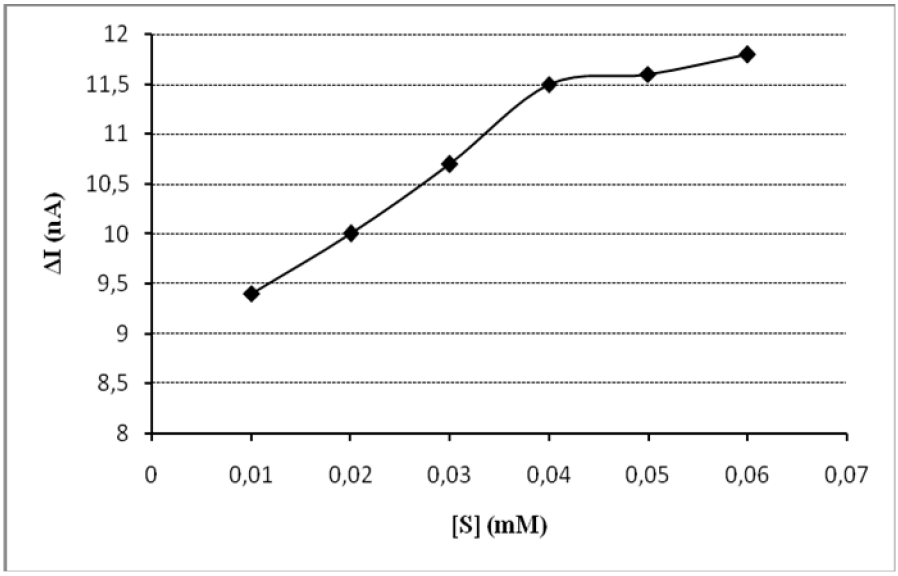
Rutin



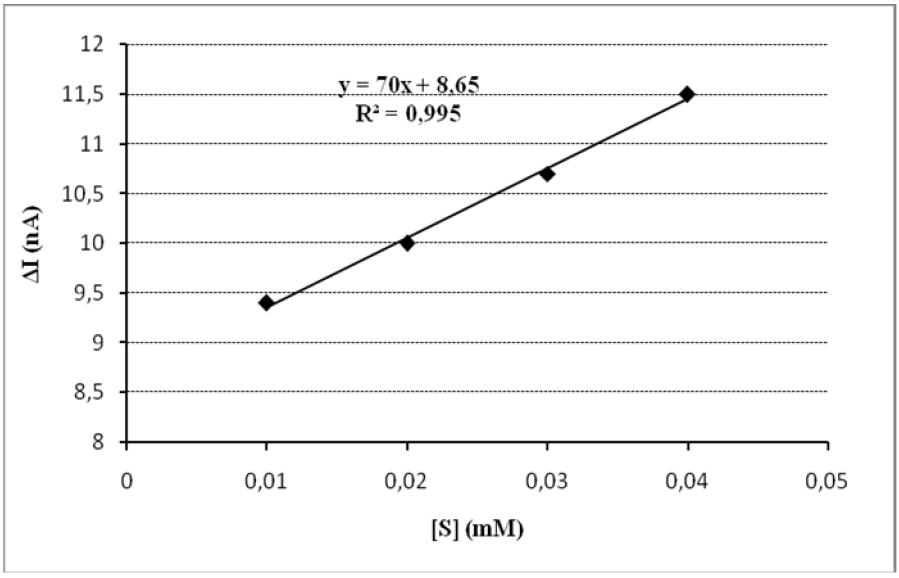
Şekil 4.47 Muz kabuğu biyosensörünün rutin tayin sınırları



Şekil 4.48 Muz kabuğu biyosensörü için rutin standart grafiği

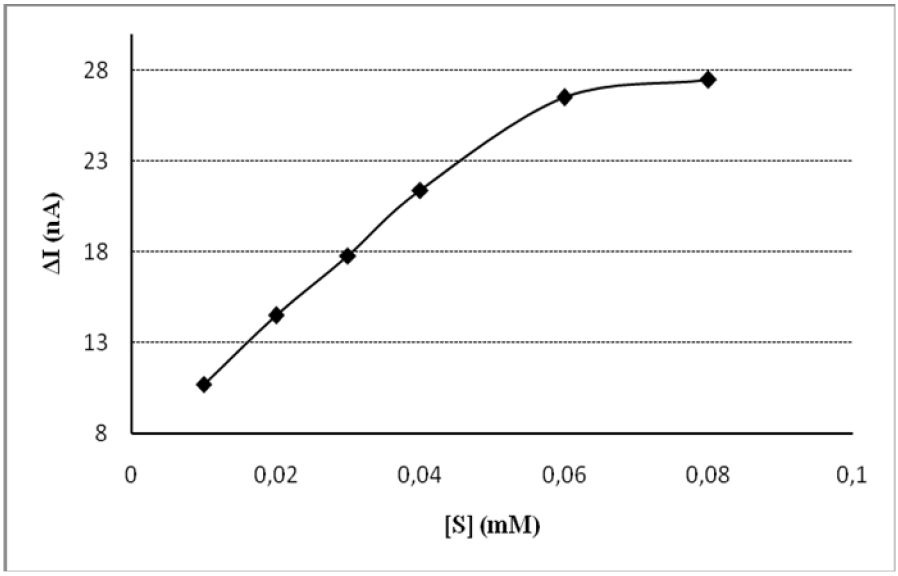


Şekil 4.49 Taze bakla biyosensörünün rutin tayin sınırları

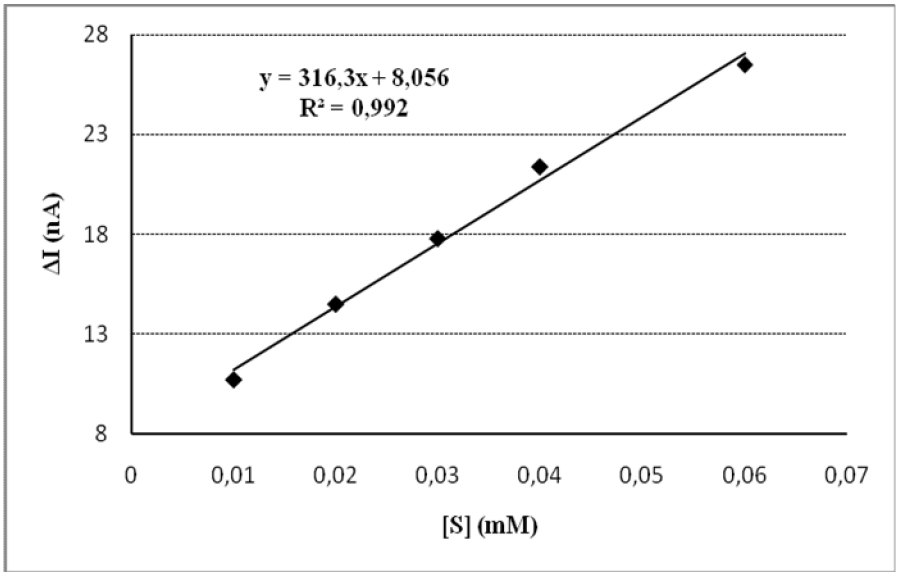


Şekil 4.50 Taze bakla biyosensörü için rutin standart grafiği

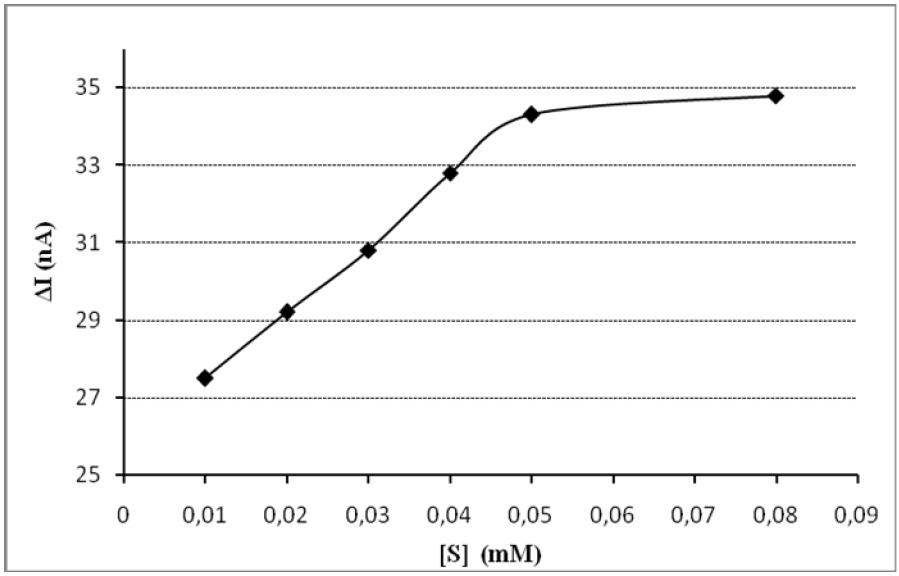
Sinnamik asit



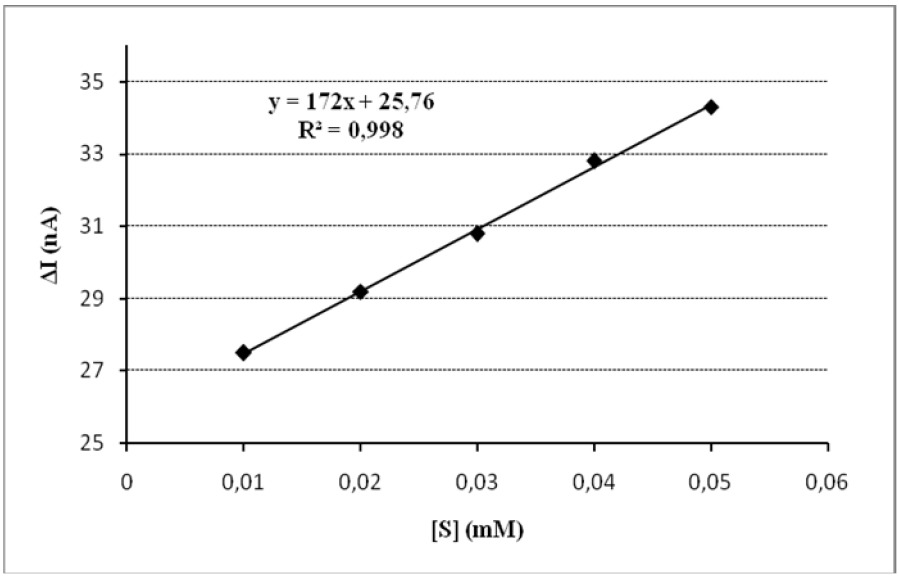
Şekil 4.51 Muz kabuğu biyosensörünün sinnamik asit tayin sınırları



Şekil 4.52 Muz kabuğu biyosensörü için sinnamik asit standart grafiği

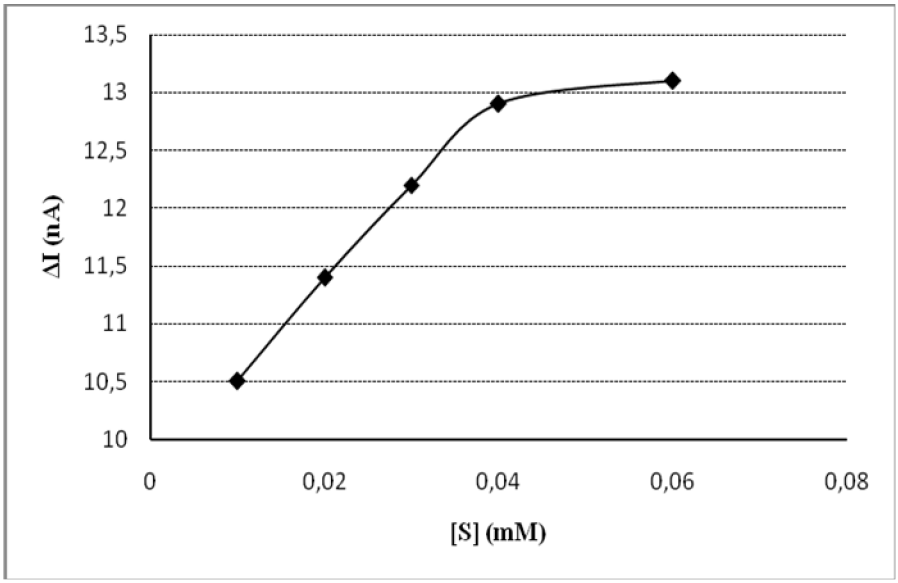


Şekil 4.53 Taze bakla biyosensörünün sinnamik asit tayin sınırları

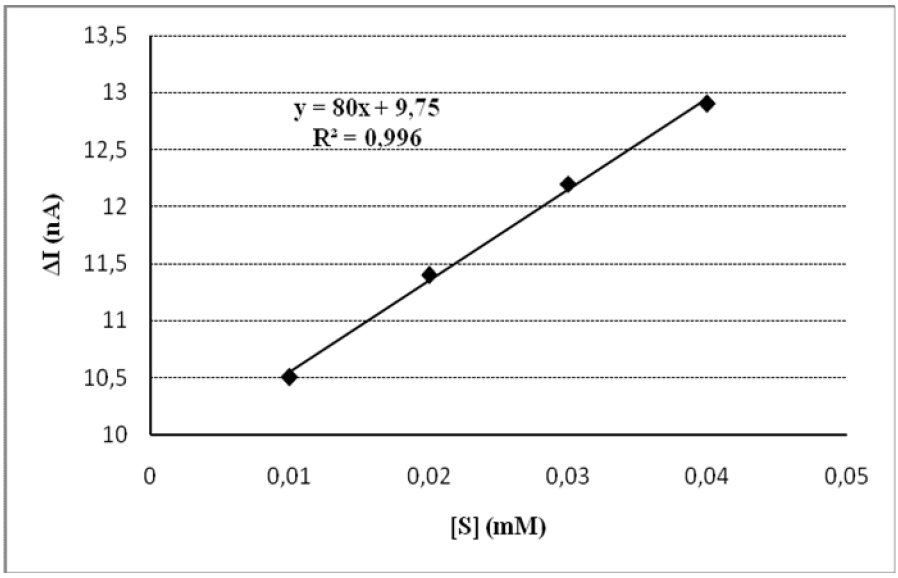


Şekil 4.54 Taze bakla biyosensörü için sinnamik asit standart grafiği

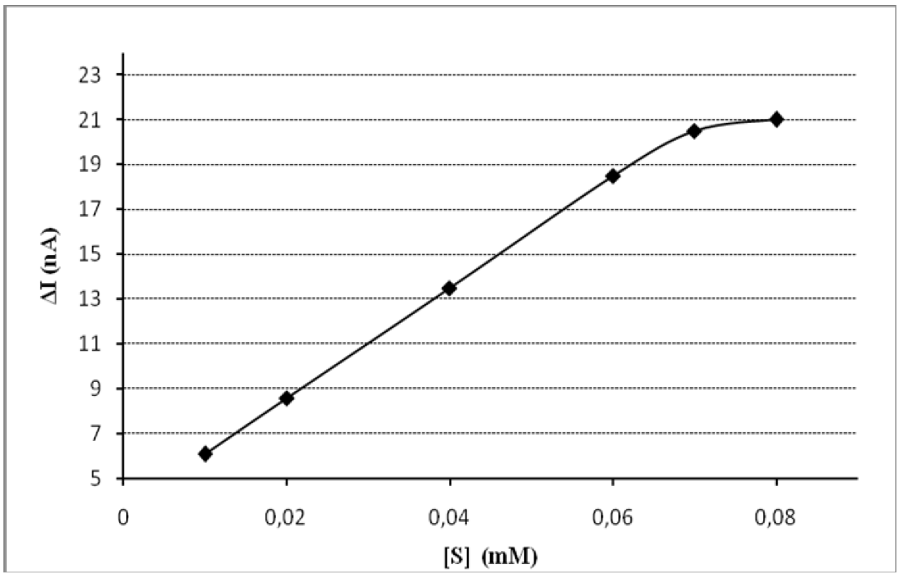
Rezorsin



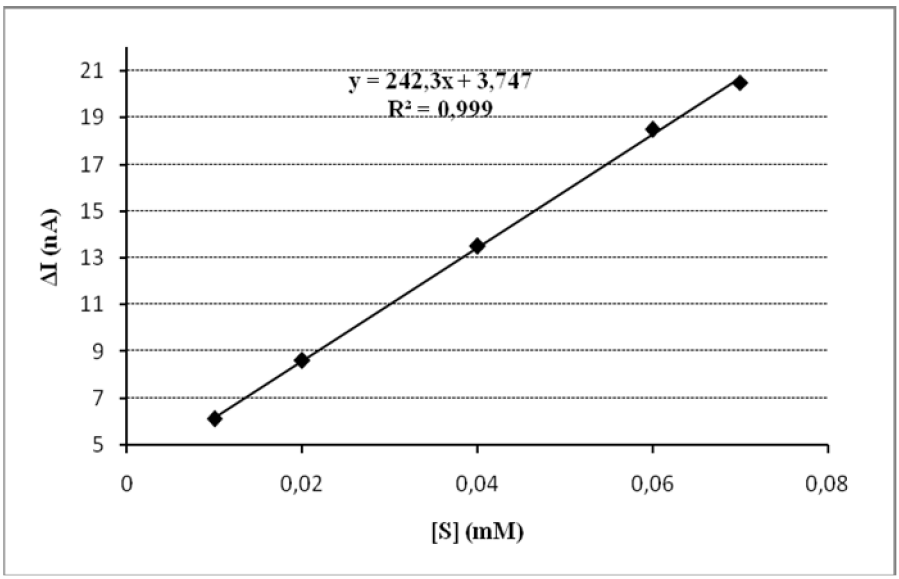
Şekil 4.55 Muz kabuğu biyosensörünün rezorsin tayin sınırları



Şekil 4.56 Muz kabuğu biyosensörü için rezorsin standart grafiği

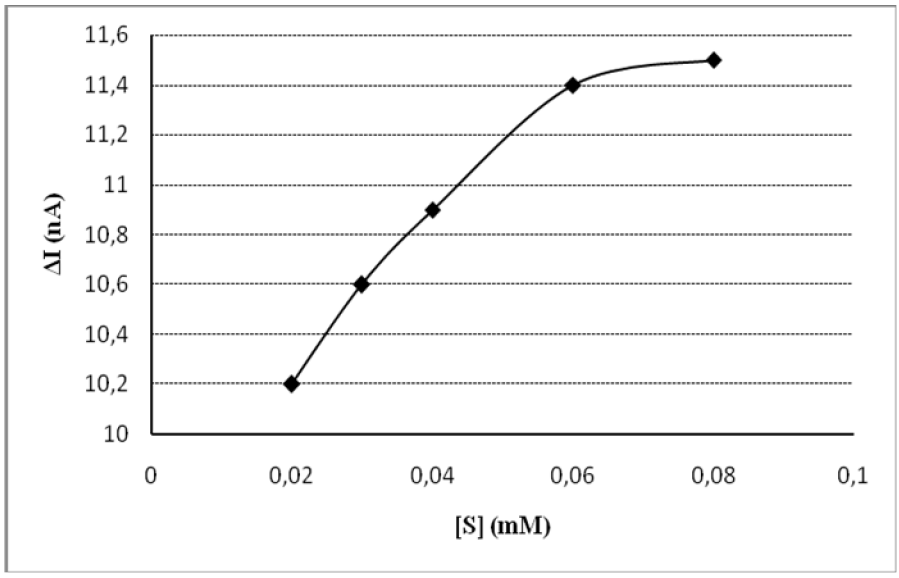


Şekil 4.57 Taze bakla biyosensörünün rezorsin tayin sınırları

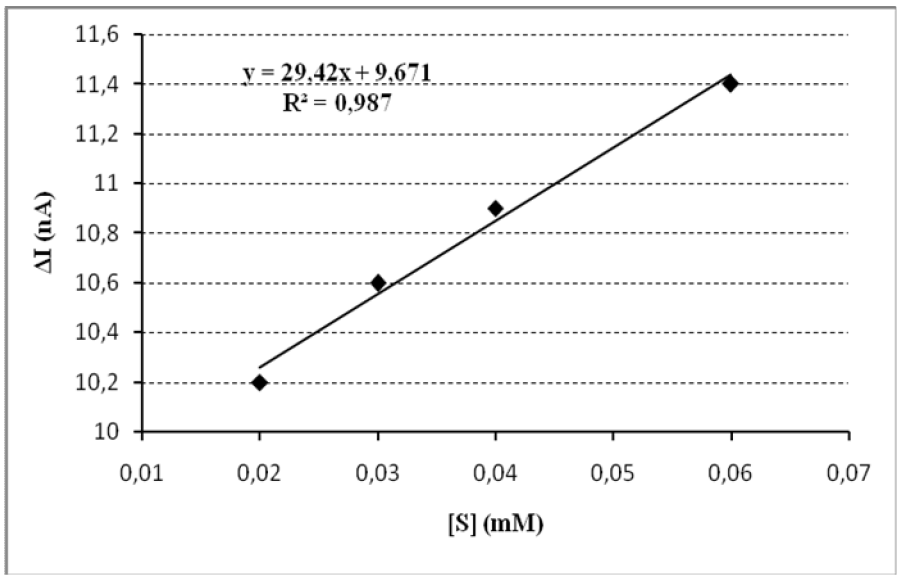


Şekil 4.58 Taze bakla biyosensörü için rezorsin standart grafiği

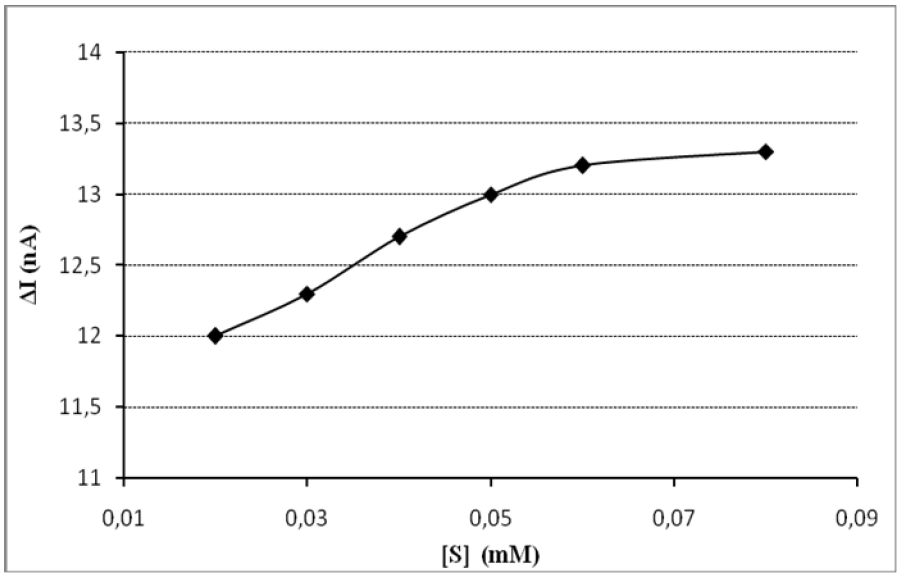
Kuersetin



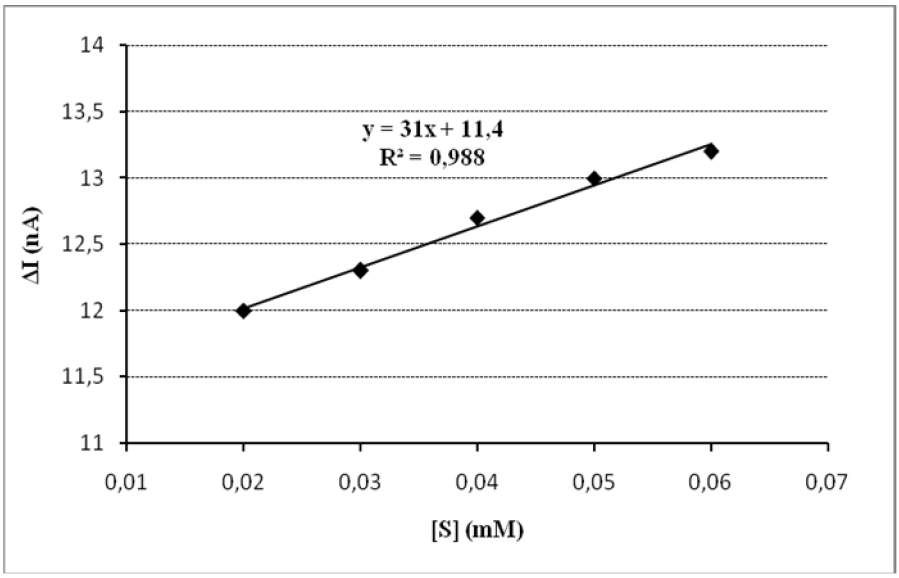
Şekil 4.59 Muz kabuğu biyosensörünün kuersetin tayin sınırları



Şekil 4.60 Muz kabuğu biyosensörü için kuersetin standart grafiği

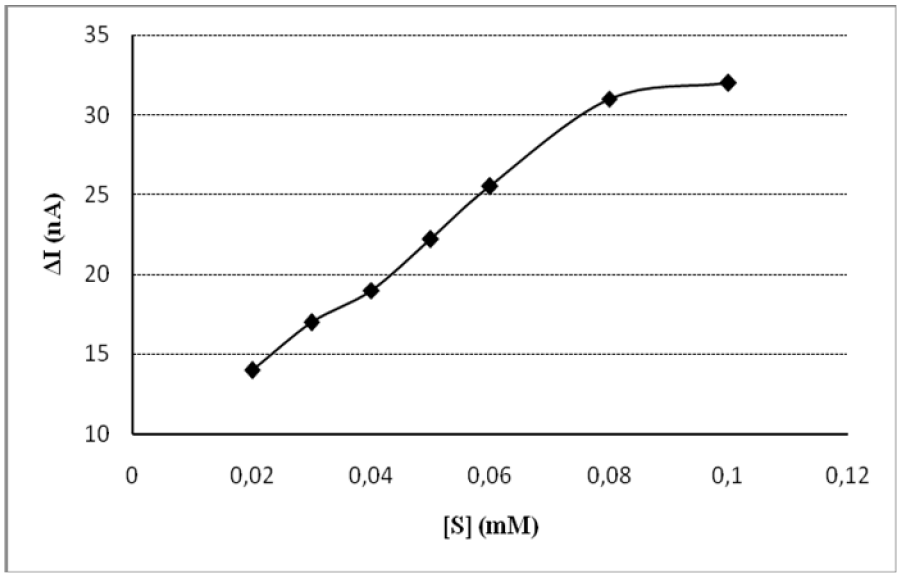


Şekil 4.61 Taze bakla biyosensörünün kuersetin tayin sınırları

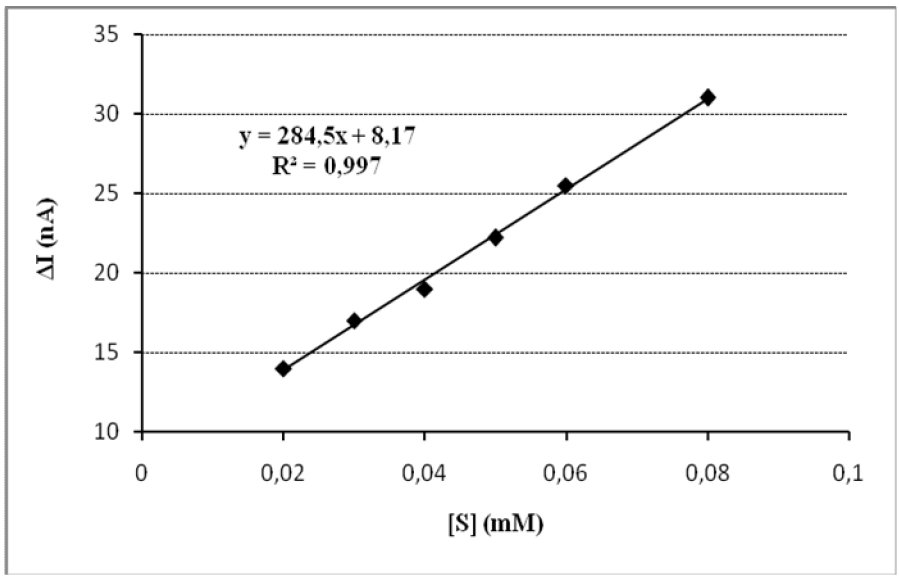


Şekil 4.62 Taze bakla biyosensörü için kuersetin standart grafiği

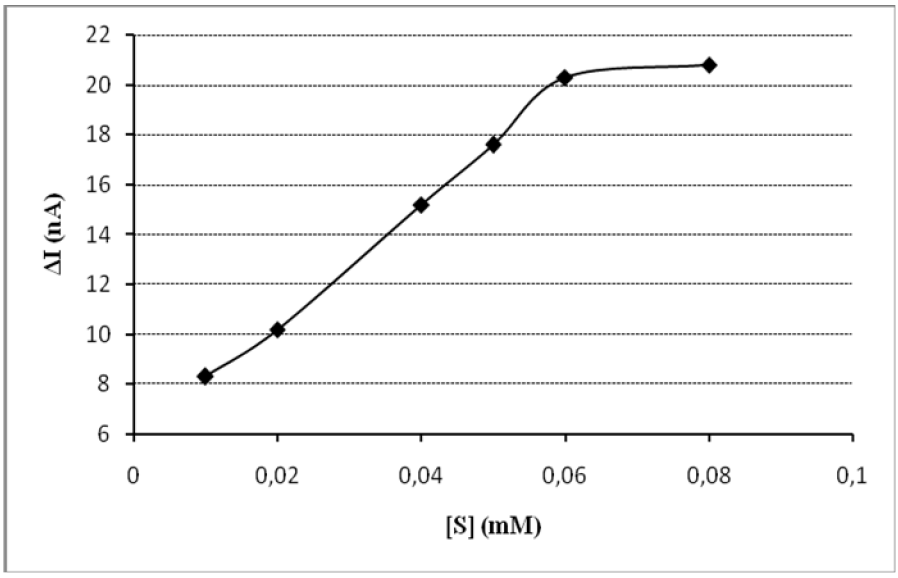
Askorbik asit



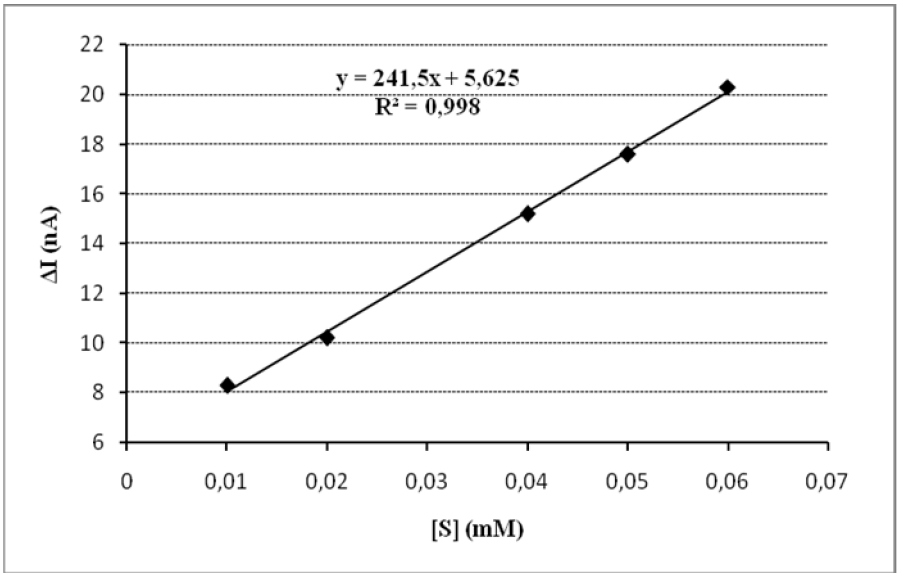
Şekil 4.63 Muz kabuğu biyosensörünün askorbik asit tayin sınırları



Şekil 4.64 Muz kabuğu biyosensörü için askorbik asit standart grafiği



Şekil 4.65 Taze bakla biyosensörünün askorbik asit tayin sınırları



Şekil 4.66 Taze bakla biyosensörü için askorbik asit standart grafiği

Grafiklerden de görülebileceği gibi tayin aralıkları ve lineerlik açısından her iki bitki dokusu temelli biyosensör de, denenen on iki farklı fenolik bileşiğin tayini amacıyla kullanılabilir düzeyde ve uygundur. Grafiklerden elde edilen sonuçlar muz kabuğu biyosensörü için Tablo 4.2'de taze bakla biyosensörü için Tablo 4.3'de toplu halde verilmiştir.

Tablo 4.2 Muz kabuğu biyosensörü için farklı substrat denemeleri (% Aktivite: 40 µM kateşol aktivitesine göre bağıl değerdir)

Fenolik Bileşik	%Aktivite	Lineer Aralık (µM)
Progallol	117,68	10-60
P-Kresol	95,96	10-50
Hidrokinon	106,57	10-70
Fenol	63,64	10-40
L-Dopa	50,00	20-60
Gallik Asit	83,34	10-80
Kaffeik Asit	139,90	20-70
Rutin	55,56	20-50
Sinnamik Asit	108,08	10-60
Rezorsin	65,15	10-40
Kuersetin	55,05	20-60
Askorbik Asit	95,96	20-80

Tablo 4.3 Taze bakla biyosensörü için farklı substrat denemeleri (% Aktivite: 40 µM kateşol aktivitesine göre bağıl değerdir)

Fenolik Bileşik	%Aktivite	Lineer Aralık (µM)
Progallol	87,63	10-60
P-Kresol	136,08	10-50
Hidrokinon	121,13	10-60
Fenol	68,56	10-40
L-Dopa	68,04	20-60
Gallik Asit	65,98	10-70
Kaffeik Asit	133,50	10-60
Rutin	59,28	10-40
Sinnamik Asit	169,07	10-50
Rezorsin	69,59	10-70
Kuersetin	65,46	20-60
Askorbik Asit	78,35	10-60

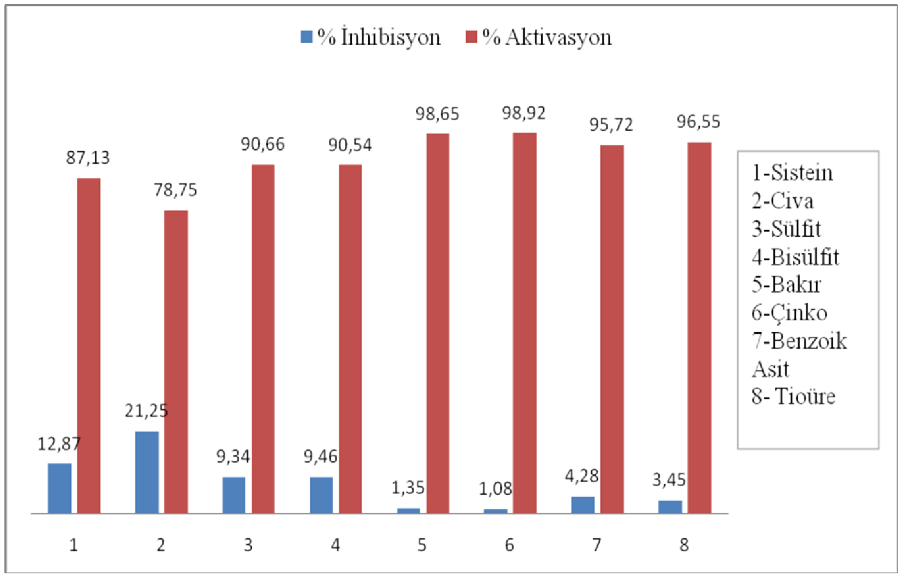
Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'den görüldüğü gibi muz kabuğu biyosensörü, taze bakla biyosensörüne oranla daha geniş tayin aralığına sahipken, taze bakla biyosensörü daha düşük konsantrasyonlarda ölçüm yapabilmektedir. Kateşole göre % aktivite bakımından incelendiklerinde, fenol, kaffeik asit, rutin ve rezorsin için aynı düzeyde, gallik asit,

progallol ve askorbik asit için muz kabuğu biyosensörünün, p-kresol, hidrokinon, L-dopa, sinnamik asit ve kuersetin için ise taze bakla biyosensörünün daha yüksek aktivite gösterdiği gözlendi.

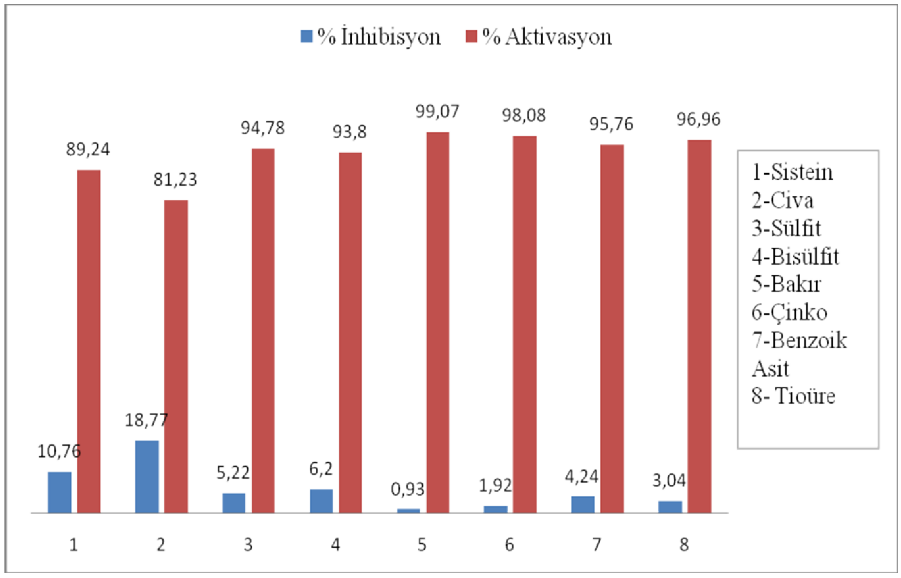
Kullanılan sistemin bitkisel doku temelli olması ve dokuların farklı enzim ve enzim sistemlerini içermesi, saf enzim biyosensörlerine oranla daha fazla sayıda substrata duyarlı olmalarına sebep olmaktadır. Zaten polifenol oksidaz enzimi saf olarak kullanıldığında dahi grup spesifitesine sahip olması nedeniyle çok sayıda faklı substrata karşı duyarlıdır. Bu konu göz önünde bulundurulduğunda hazırlanan bitkisel doku temelli biyosensör ile elde edilen geniş substrat spesifikliği bir dezavantaj olarak değerlendirilmez. Ayrıca bu fenolik bileşikleri tek başına içeren örneklerde, hazırlanan bitkisel doku temelli biyosensörlerle analizlerin mümkün olabilmesi açısından avantajlıdır.

4.3.6 Biyosensör cevapları üzerine bazı kimyasal maddelerin inhibisyon etkisi

Bitkisel doku temelli biyosensörlerle, polifenol oksidaz enzimi için inhibitör olabilecek sistein, civa, sülfit, bisülfit, bakır, çinko, benzoik asit ve tiyoürenin etkisinin belirlenmesi amacıyla bu maddeler reaksiyon ortamına eklenerek yapılan denemelerle inhibisyon yüzdeleri hesaplandı. Sonuçlar muz kabuğu biyosensörü için Şekil 4.67'de taze bakla biyosensörü için Şekil 4.68'de verildi.



Şekil 4.67 Muz kabuğu biyosensörü için inhibitör denemeleri



Şekil 4.68 Taze bakla biyosensörü için inhibitör denemeleri

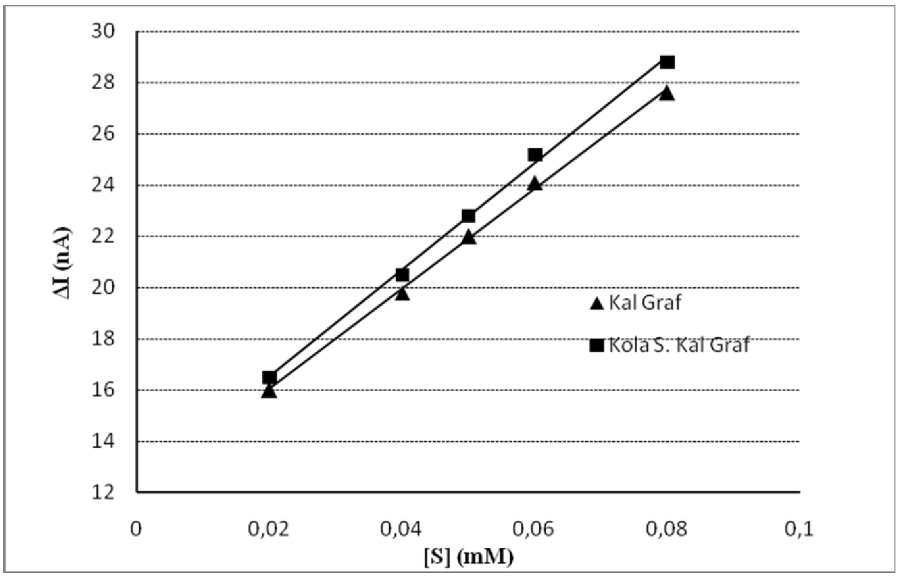
Şekil 4.67 ve Şekil 4.68'den görüldüğü gibi her iki bitki dokusu temelli biyosensör için de en fazla inhibisyon civa varlığında gerçekleşti. Diğer inhibitörler en fazla %10 oranında aktivite kaybına sebep oldu. Bitkisel doku kullanılması nedeniyle enzimlerin doğal çevreleriyle birlikte immobilize edilmeleri, inhibitörlerden düşük düzeyde etkilenmelerini sağlamıştır. Bu durum her iki bitki dokusu temelli biyosensör için bir avantaj olarak değerlendirilebilir.

4.3.7 Biyosensörlerin farklı örneklere uygulanabilirliklerinin incelenmesi

Hazırlanan bitki dokusu temelli biyosensörlerin farklı örneklerde fenolik bileşik analizini ne ölçüde yapabildiği, kola, portakallı gazlı içecek, beyaz şarap, üzüm suyu, bira ve elma suyu gibi ticari içecek örnekleri kullanılarak belirlendi. Her bir örnek için standart ekleme metodu kullanılarak ölçümler gerçekleştirildi ve kateşol standart grafikleri ile birlikle Şekil 4.69 – Şekil 4.80 aralığında verildi. Ölçümler optimum koşullarda gerçekleştirildi.

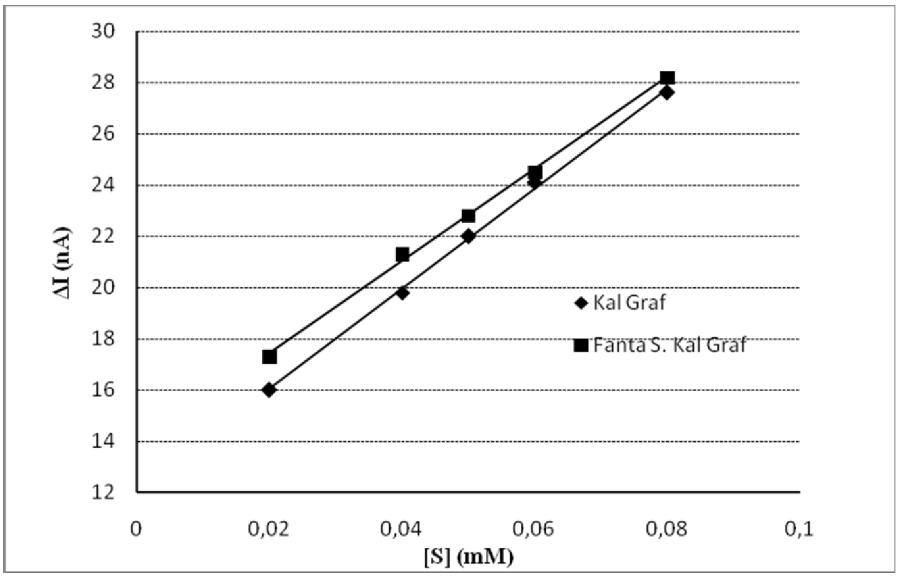
4.3.7.1 Muz kabuğu biyosensörü ile fenolik bileşik tayinleri sonuçları

Kola



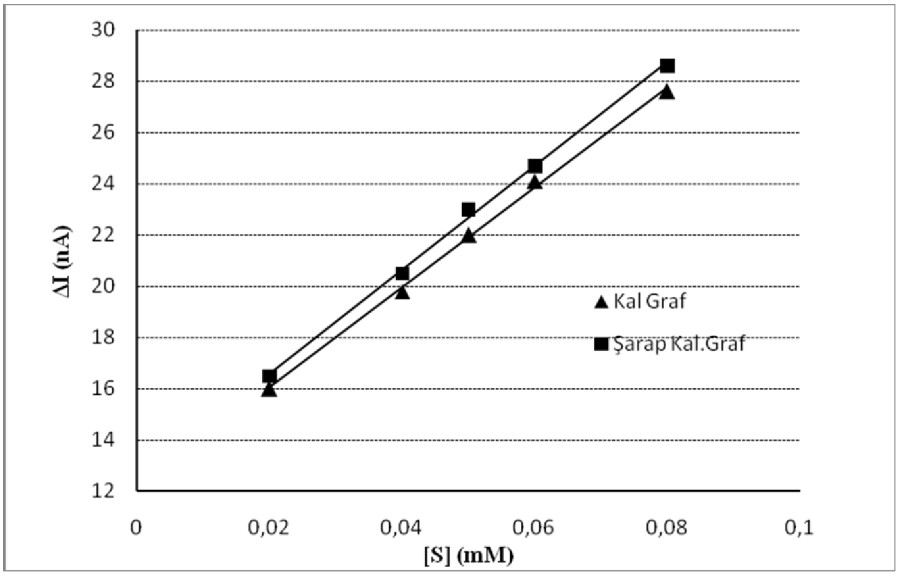
Şekil 4.69 Muz kabuğu biyosensörü ile kolada fenolik bileşik analizi

Portakallı gazlı içecek



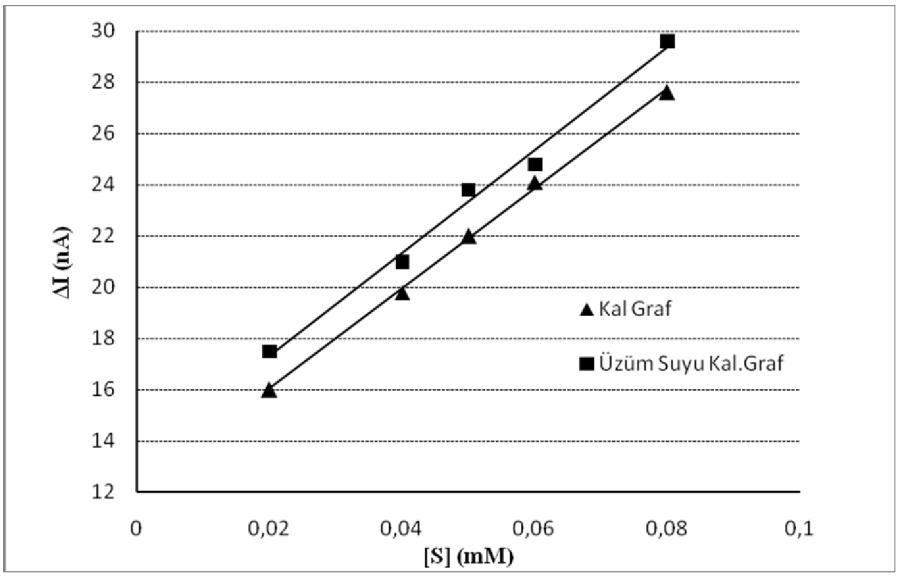
Şekil 4.70 Muz kabuğu biyosensörü ile portakallı gazlı içecekte fenolik bileşik analizi

Beyaz şarap



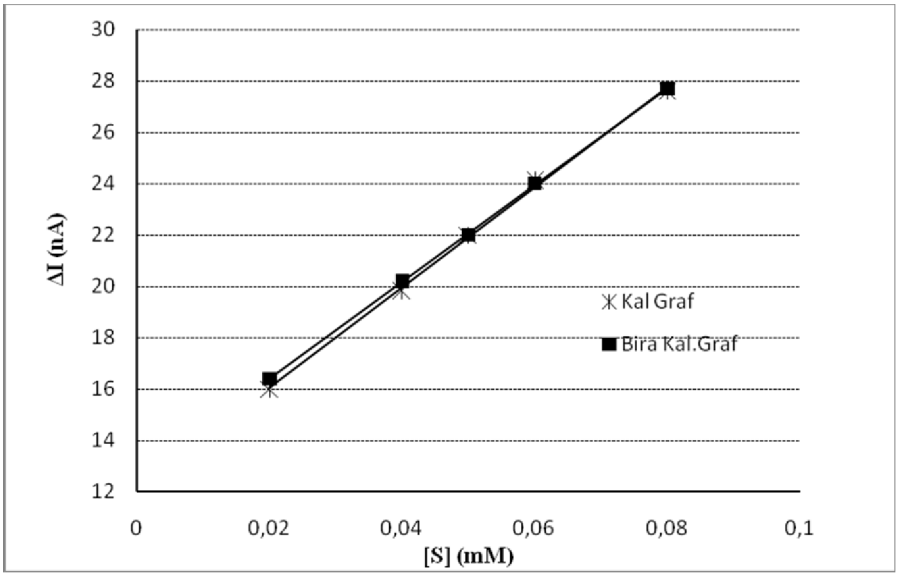
Şekil 4.71 Muz kabuğu biyosensörü ile beyaz şarapta fenolik bileşik analizi

Üzüm suyu



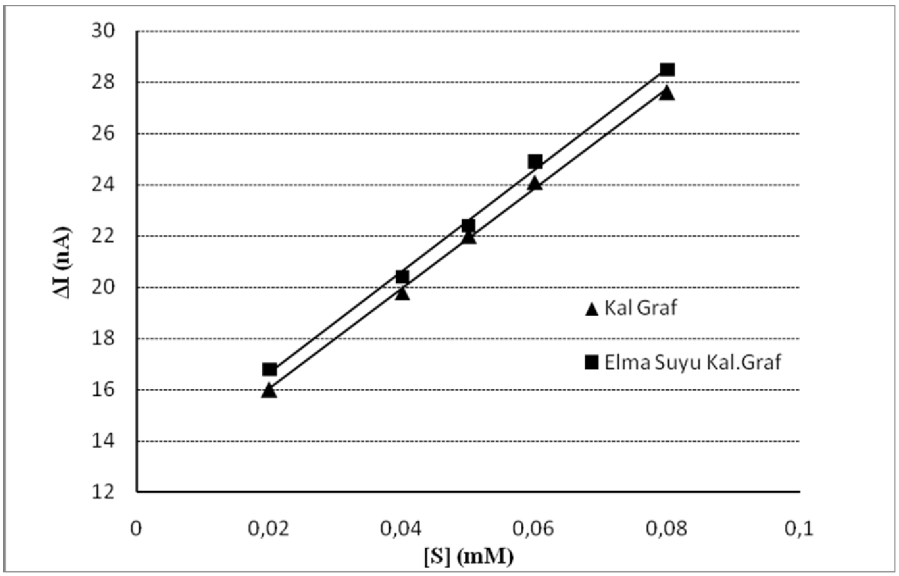
Şekil 4.72 Muz kabuğu biyosensörü ile üzüm suyunda fenolik bileşik analizi

Bira



Şekil 4.73 Muz kabuğu biyosensörü ile birada fenolik bileşik analizi

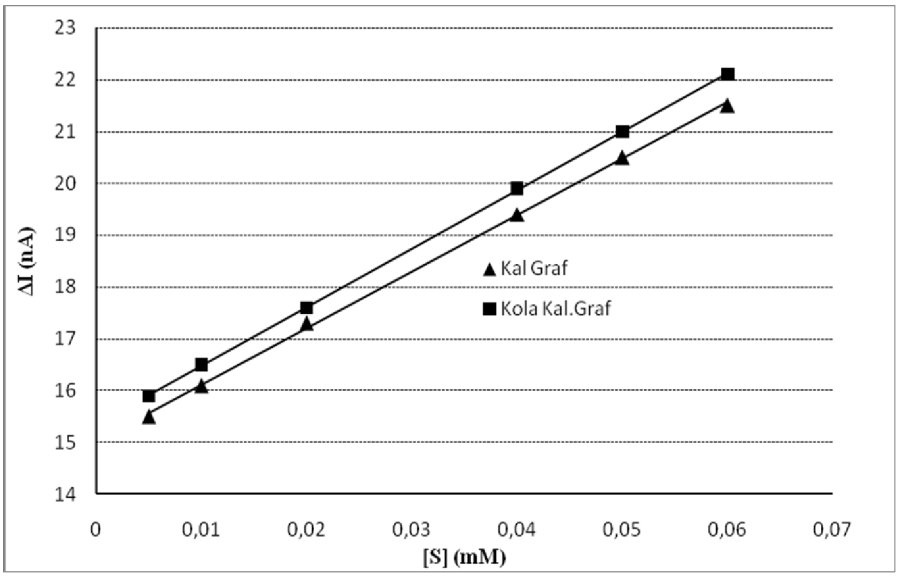
Elma suyu



Şekil 4.74 Muz kabuğu biyosensörü ile elma suyunda fenolik bileşik analizi

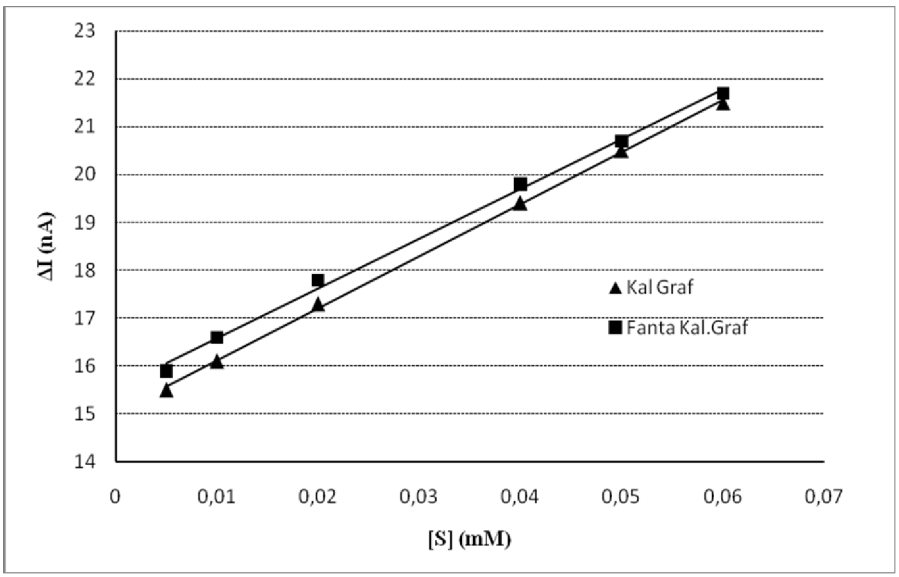
4.3.7.2 Taze bakla biyosensörü ile fenolik bileşik tayinleri sonuçları

Kola



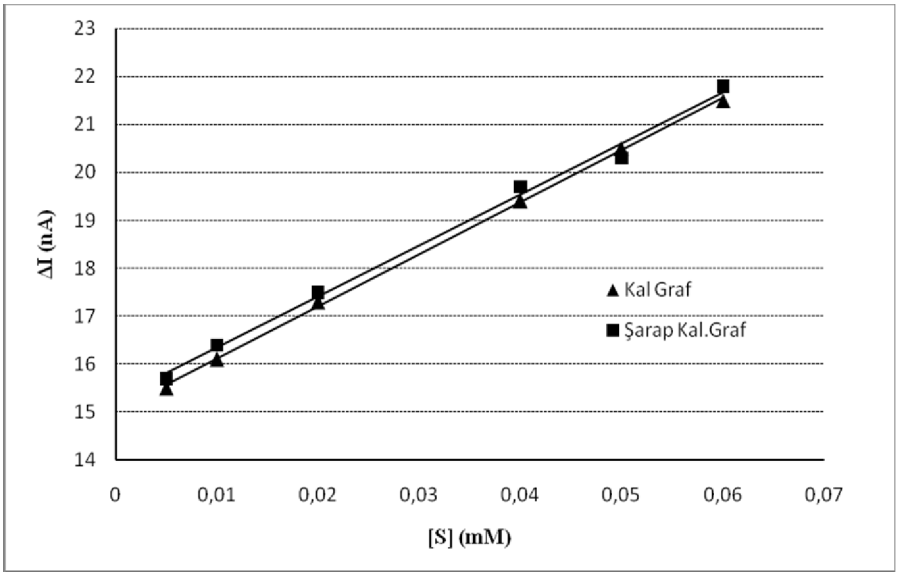
Şekil 4.75 Taze bakla biyosensörü ile kolada fenolik bileşik analizi

Portakallı gazlı içecek



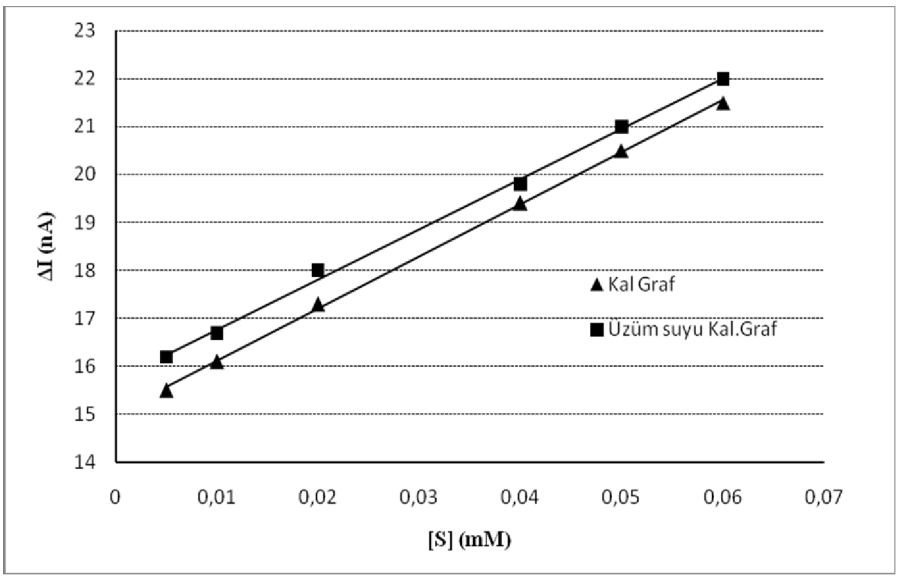
Şekil 4.76 Taze bakla biyosensörü ile portakallı gazlı içecekte fenolik bileşik analizi

Beyaz şarap



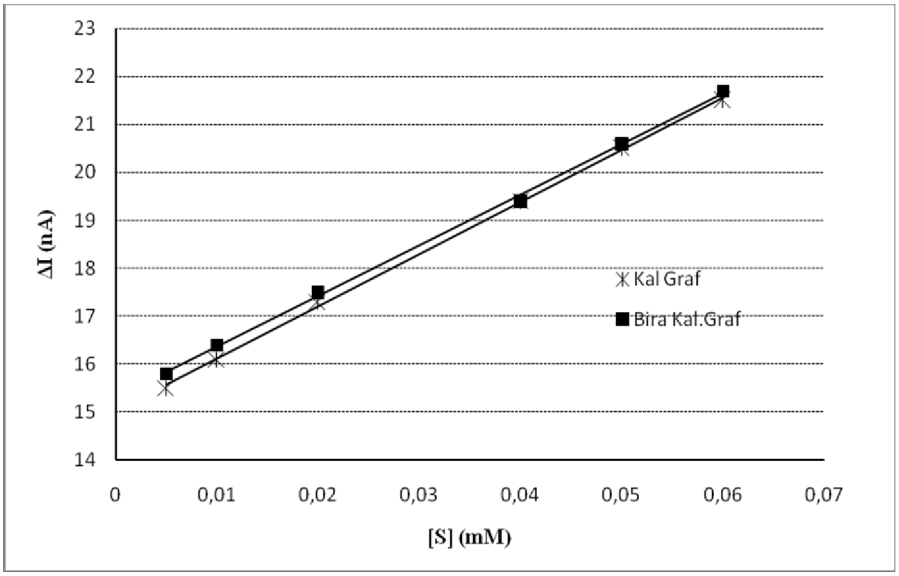
Şekil 4.77 Taze bakla biyosensörü ile beyaz şarapta fenolik bileşik analizi

Üzüm suyu



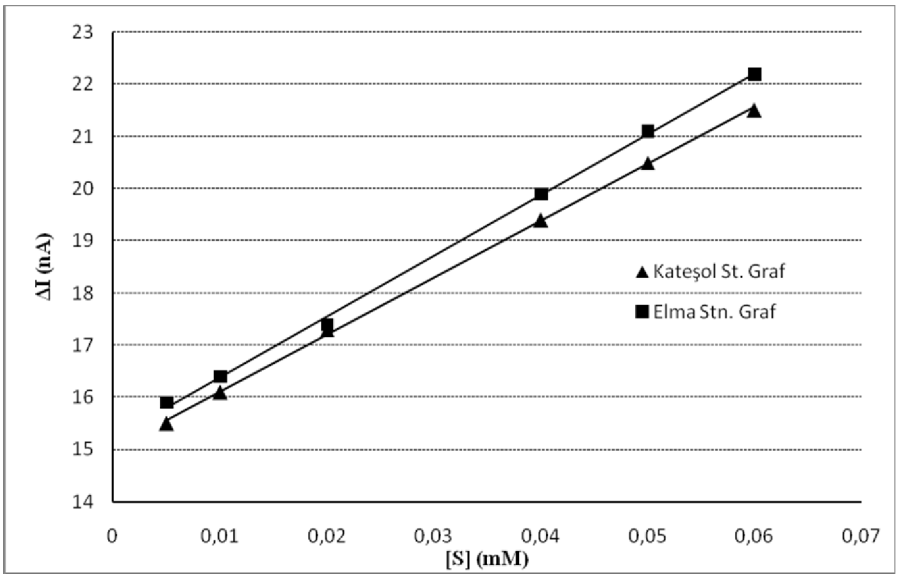
Şekil 4.78 Taze bakla biyosensörü ile üzüm suyunda fenolik bileşik analizi

Bira



Şekil 4.79 Taze bakla biyosensörü ile birada fenolik bileşik analizi

Elma suyu



Şekil 4.80 Taze bakla biyosensörü ile elma suyunda fenolik bileşik analizi

Örnekler seyreltme yapılmadan kullanıldıklarında oldukça yüksek biyosensör cevaplarına neden olmaktadırlar. Bu nedenle her bir örnek denenerek bulunan belirli oranlarda seyreltilerek kullanılmıştır. Seyreltilmiş örneklerle, standart ekleme yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafikleri her iki bitkisel doku temelli biyosensörde de fenolik bileşik kalibrasyon grafiği ile oldukça uyumlu bulunmuştur. Bu durum her iki bitkisel doku temelli biyosensörün incelenen içecek örneklerinde fenolik bileşik tayini için kullanılabilirliğini göstermiştir.

Ayrıca, biyosensörlerin optimum çalışma koşullarında içecek örneklerine ilave edilen ve analiz sonucunda standart grafikleri yardımıyla hesaplanan kateşol standardı miktarları, iki farklı konsantrasyonda dört kez tekrarlanan analizlerin sonucu ve geri kazanım oranları, muz kabuğu biyosensörü için Tablo 4.4 ve taze bakla biyosensörü için Tablo 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.4 Muz kabuğu biyosensörü ile çeşitli örneklerde fenolik bileşik tayini

ÖRNEK	EKLENEN MİKTAR (µM)	BULUNAN MİKTAR (µM)	% GERİ KAZANIM
Elma suyu (Pınar %100)	26	26,19 ± 0,07	100,7
	40	40,20 ± 0,19	100,5
Kola (CocaCola)	26	26,89 ± 0,51	103,42
	52	52,58 ± 0,42	101,1
Portakallı gazlı içecek (Fanta)	30	30,58 ± 0,36	101,93
	72	71,82 ± 0,28	99,75
Üzüm suyu (Tamek %100)	40	42,56 ± 0,28	106,4
	72	74,17 ± 0,43	105,96
Bira (Efes Pilsen)	44	44,71 ± 0,28	101,60
	68	67,55 ± 0,29	99,34
Beyaz Şarap (Güzel Marmara)	34	34,04 ± 0,26	100,12
	66	65,50 ±0,26	99,24

Tablo 4.5 Taze bakla biyosensörü ile çeşitli örneklerde fenolik bileşik tayini

ÖRNEK	EKLENEN MİKTAR (µM)	BULUNAN MİKTAR (µM)	% GERİ KAZANIM
Elma suyu (Pınar %100)	22	22,08 ± 0,46	100,36
	50	50,68 ± 0,82	101,36
Kola (CocaCola)	32	32,32 ± 0,50	101,0
	54	54,18 ± 0,77	100,34
Portakallı gazlı içecek (Fanta)	27	27,36 ± 0,65	101,34
	50	50,09 ± 0,46	100,18
Üzüm suyu (Tamek %100)	22	22,58 ± 0,77	104,55
	54	54,54 ± 0,50	101,0
Beyaz Şarap (Güzel Marmara)	16	15,98 ± 0,49	99,87
	46	46,10 ±0,82	100,22
Bira (Efes Pilsen)	12	11,93 ± 0,41	99,42
	50	49,59 ± 0,81	99,18

Tablo 4.4 ve Tablo 4.5'den görüldüğü gibi her iki bitkisel doku temelli biyosensörle de standart ekleme metoduyla elde edilen sonuçlar oldukça iyidir. Bu durum çalışılan içecek örneklerinde her iki bitkisel doku temelli biyosensörle kateşol standardı kullanılarak fenolik bileşiklerin yüksek duyarlılık ve doğrulukla analizlenebileceğini göstermiştir.

5. TARTIŞMA

Bitkisel doğal bileşiklerin büyük bir kısmını kapsayan fenolik bileşikler, aynı zamanda antioksidan olarak bilinen ve özellikle kanser, kalp ve damar hastalıkları riskini azaltan maddelerin de en büyük bileşenleridir. Bu nedenle özellikle gıda analizleri, biyolojik ve tıbbi çalışmalar açısından bu maddelerin tayini amaçlı hassas ve güvenilir metotların geliştirilmesi çok önemlidir.

Günümüzde fenolik bileşiklerin tayinine yönelik olarak, yüksek basınç sıvı kromatografisi, gaz kromatografisi ve kapiler elektroforez gibi kromatografik yöntemler, Folin-ciocalteu ve 1,10-Fenantrolin gibi spektrofotometrik yöntemler ve polifenol oksidazların kullanıldığı enzimatik yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bunlar pahalı ekipman ve kimyasallara ihtiyaç duyan oldukça zaman alıcı yöntemlerdir.

Son yıllarda bu tür bileşiklerin analizleri için pratik ve çabuk sonuç veren biyosensörik metotların önemi artmıştır. Özellikle ticari saf enzimlerle oluşturulan biyosensörlerin yerine analiz edilecek bileşik için uygun olan enzimleri içeren bitkisel dokuların kullanılmasıyla hazırlanan doku biyosensörleri materyal bolluğu ve ekonomik bakımdan avantajlar sağlamaktadır.

Bu doktora tezinde fenolik bileşikleri substrat olarak kullanan polifenol oksidaz enzimini bol miktarda bulunduran bitki dokuları incelenerek, muz kabuğu ve taze bakla biyosensör hazırlamada kullanılacak bitkisel dokular olarak belirlendi. Bu dokular camsı karbon çalışma elektrodu yüzeyine immobilize edilerek, standart olarak kullanılan kateşole karşı verdikleri biyosensör cevapları incelendi. Hazırlanan bitkisel doku temelli biyosensörlerin optimizasyonu, karakterizasyonu, farklı fenolik bileşiklere uygulanabilirliği, inhibitörlerden etkilenme dereceleri ve çeşitli içecek örneklerinde fenolik bileşik tayini amacıyla kullanılabilirlikleri araştırıldı.

Jelatin bazlı, çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehitin kullanıldığı ince film şeklinde her iki doku elektroda immobilize edildi. Her iki doku ile hazırlanan biyosensörlerin ilk fenolik bileşik tayinindeki performansları yeterli bulundu.

Biyosensör hazırlama koşullarından; doku miktarı belirlenmesi, kullanılacak jelatin ve çapraz bağlayıcı miktarlarının belirlenmesi; hem muz kabuğu hem de taze

bakla sensörü için optimize edildi. Muz kabuğu ve taze bakla biyosensörleri için sırasıyla 7,96, 10,6 mg/cm^2 doku, 0,88, 0,98 mg/cm^2 jelatin ve batırılan çapraz bağlayıcı glutaraldehit çözeltisi konsantrasyonu (g/mL) her iki biyosensör için % 1,25 olarak bulundu. Yapılan literatür çalışmaları ile kıyaslandığında immobilizasyonda kullanılan optimum glutaraldehit ve jelatin miktarları oldukça benzer bulundu. Örneğin okzalat tayini için geliştirilen ıspanak dokusu temelli bir biyosensörde optimum jelatin miktarı 0,89 mg/cm^2, glutaraldehit miktarı % 2,5 ayrıca indirgenmiş glutationun belirlenmesi için geliştirilmiş salatalık dokusu temelli bir biyosensörde optimum jelatin miktarı 0,70 mg/cm^2, glutaraldehit miktarı % 2,5 olarak verilmiştir. Biyosensör hazırlanmasında kullanılan doku miktarı, dokudaki istenilen enzimin aktivitesi ve miktarına bağlı olduğundan literatürde bitkisel doku temelli biyosensörlerde geniş bir aralıkta verilmiştir (Sezgintürk ve Dinçkaya 2003, Sezgintürk ve Dinçkaya 2004a).

Biyosensör çalışma koşullarından; ortam tampon pH'ının belirlenmesinde; her iki biyosensör için optimum pH 7.0 idi. pH'ı 7.0 olan tampon konsantrasyonu optimizasyonunda; her iki biyosensör için 66 mM değerinde en yüksek biyosensör cevabı alındı. Literatürde fenolik bileşik tayinine yönelik Karadeniz bölgesi kültür mantarı dokusu temelli bir biyosensör çalışmasında biyosensörün optimum pH'ı 8.0 tampon konsantrasyonu 50 mM olarak, ayrıca fenolik bileşik tayinine yönelik hazırlanmış saf mantar PPO enzimi temelli bir biyosensör çalışmasında biyosensörün optimum pH'ı 8,0 tampon konsantrasyonu 100 mM olarak verilmiştir. Optimum pH ve tampon konsantrasyonu değerleri literatür ile karşılaştırıldığında, immobilizasyon yöntemlerinin ve reaksiyonu gerçekleştiren biyobileşenlerin yani enzimlerin polifenol oksidazlar olması göz önüne alındığında değerler uyumlu bulundu (Gutes vd., 2004, Topcu vd., 2004).

Sıcaklık optimizasyonu denemelerinde; muz kabuğu biyosensörü için 35 ^{o}C, taze bakla biyosensörü için 37.5 ^{o}C optimum değerler olarak bulundu. Bu sıcaklıklar fizyolojik sıcaklık değerleri olduğu için ulaşılması kolay, ekstra enerji gerektirmeyen değerlerdir. Literatürde fenolik bileşik tayinine yönelik mantar dokusu temelli bir biyosensör çalışmasında ve fenol tayinine yönelik yerelması dokusu temelli bir biyosensör çalışmasında, biyosensörlerin optimum sıcaklığı 35 ^{o}C olarak verilmiştir. Elde edilen sonuçlar literatür ile karşılaştırıldığında işlevsel enzimin PPO olması göz

önüne alınınca, oldukça yakın sonuçlar elde edildiği görüldü (Odacı vd., 2004, Sezgintürk ve Dinçkaya 2003).

Biyosensörlerin karakterizasyon çalışmaları kapsamında; ilk önce standart fenolik bileşik olarak belirlenen kateşolün tayin aralığının belirlenmesi çalışıldı. Optimum çalışma koşullarında, muz kabuğu biyosensörü için 10-80 µM ve taze bakla biyosensörü için 5-60 µM kateşol aralığı, lineer ölçüm aralıkları olarak belirlendi. Muz kabuğu biyosensörü lineer ölçüm aralığı bakımından 70 µM'lık bir aralıkla, taze bakla biyosensörüne göre (55 µM) daha geniş bir ölçüm aralığına sahiptir. Literatürde fenolik bileşik tayinine yönelik mantar dokusu temelli bir biyosensör çalışmasında, standart olarak kateşol kullanıldığında fenolik bileşik tayin sınırları 10-40 µM verilmiştir. Bu durum mantar dokusu yerine muz veya taze bakla dokuları kullanıldığında, tayin aralığının 20-40 µM kadar genişlediğini göstermektedir (Topcu vd., 2004).

İkinci karakterizasyon çalışması; aynı substratın sabit miktarlarına karşı kaç kez doğru ölçüm alınabileceğini belirleyen tekrarlanabilirlik çalışması olup; muz kabuğu biyosensörü ile artarda 6, taze bakla biyosensörü ile 5 kez aynı konsantrasyonda ölçüm alındı. Bu verilerden hesaplanan standart sapma ve varyasyon katsayıları muz kabuğu biyosensörü için ±0,0014 ve % 2,89 ve taze bakla biyosensörü için; ±0,0064 ve %1,59 bulundu. Oldukça küçük standart sapmaların elde edilmesi ve varyasyon katsayısının biyosensörler için kabul edilebilir sınır olan % 5'den küçük bulunması, hazırlanan iki biyosensörün de fenolik bileşik analizinde yüksek doğruluk ile kullanılabileceğini gösterdi.

Biyosensörlerin işlem kararlılığının belirlenmesi için yapılan çalışmalarda, muz kabuğu biyosensörünün 30 dk. aralıklarla 6 ölçüm sonunda % 98, 12 ölçüm sonunda %61 oranında, taze bakla biyosensörünün ise 40 dk. aralıklarla 5 ölçüm sonunda %100, 12 ölçüm sonunda %72 oranında aktivitelerini koruduğu gözlendi. Bu verilere göre her iki biyosensörün ortalama 10 ölçüm için işlemsel olarak kararlı oldukları söylenebilir. Literatürde benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında yaklaşık 8-10 ölçümde % 20-30 aktivite kayıpları en çok karşılaşılan kabul edilir değerlerdir (Gutes vd., 2004, Odacı vd., 2004, Sezgintürk ve Dinçkaya 2003).

Depo kararlılığı çalışmalarında; her iki biyosensör 25 gün boyunca fenolik bileşik tayininde kullanıldığında grafiklerden anlaşıldığı gibi, 25. gün sonunda hala yaklaşık % 75 doğrulukla ölçüm yapabildikleri görüldü. Genel olarak immobilizasyon materyali olarak jelatinin kullanıldığı biyosensörlerde, tabakanın uygun koşullarda korunsa bile kısmen kuruması nedeniyle depo kararlılıkları 10-30 gün arasında bulunmuştur (Topcu vd., 2004).

Kateşolün dışında toplam 12 fenolik bileşiğin, farklı konsantrasyonlarına karşı optimum şartlarda; her iki biyosensörün doğrusal tayin aralıkları tespit edildi. İlgili tablolardaki sonuçlara göre, genel olarak muz kabuğu sensöründe bileşiklerin tayin aralıkları, taze bakla sensöründeki ile benzerlik göstermekle birlikte az sayıda substrat için biraz daha geniş bulundu. Sensörlerin substratlara karşı % aktivite bakımından anlamlı farklılıkları vardır. Sensörlerde enzim kaynağı olarak kullanılan bitki dokuları enzimler-enzim sistemlerini birlikte içermeleri nedeniyle fazla sayıda substrata duyarlılık gösterdiler. Ayrıca PPO enzimleri grup spesifikliğine sahip olduğundan keskin substrat seçiciliği görülmemesi beklenen bir sonuçtur. İncelenen fenolik substratlardan herhangi birini bulunduran örneklerde, hazırlanan her iki sensör ile de tespit edilen doğrusal aralıklarda fenolik bileşik analizleri mümkündür.

Her iki sensör için kateşol substratına karşı biyosensör cevabı üzerine etkiyebilecek 8 etken madde çalışıldı. Deneysel verilere göre hazırlanan grafiklerden anlaşıldığına göre; muz kabuğu ve taze bakla sensörleri için en etkin inhibitör etkisini sırasıyla % 18,77 ve % 21,25 olarak civa gösterdi. Diğer maddeler her iki sensörde de biyosensör cevabını en fazla % 10 oranında azalttılar. Bitkisel dokuların kullanılmasıyla enzimler, doğal mikro çevreleri ile birlikte elektroda immobilize edildiklerinden, doğal korunaklılıkları yanında immobilizasyon yoluyla da inhibitörlerden etkilenme oranlarının çok düştüğü görüldü. Bu özellik doku sensörlerinin avantajlarındandır.

Örnek analizlerinde; hazırlanan ve karakterize edilen her iki biyosensör ile günlük hayatta sıkça tüketilen, bitkisel kaynaklı içeceklerin içerdiği fenolik bileşiklerin tayininde kullanılabilirliklerini test etmek için analizler yapıldı. Bu analizler standart ekleme yöntemiyle, optimize edilen seyreltmeler yapılarak gerçekleştirildi. Sonuç grafikleri değerlendirildiğinde kola, %100 elma suyu, portakallı gazlı içecek, %100 üzüm suyu, bira ve beyaz şarap örneklerindeki fenolik bileşiklerin toplamı, kateşol

standardına göre her iki sensör ile uluslararası kabul edilebilir hata kriterleri kapsamına girecek şekilde tayin edilebildiği görüldü.

Sonuç olarak;

1- Bu tez kapsamında; literatürde daha önce hiç yer almayan, PPO aktivitesi oldukça yüksek olan, muz kabuğu ve taze bakla dokularının ilk kez tespiti yapıldı.

2- İki bitki dokusu da biyosensör hazırlanmasında biyomateryal olarak ilk kez kullanıldı ve oldukça iyi performans gösterdiler.

3- Her iki biyosensörün de fenolik bileşiklerin tayini için optimizasyonları ve karakterizasyonları gerçekleştirildi.

4- Geliştirilen biyosensörlerin farklı fenolik bileşiklerin tayini için optimize koşullarda güvenle kullanılabilecekleri gösterildi.

5- Biyosensörlerin PPO enzimleri için inhibitör olabilecek pek çok maddenin etkisinden korunduğu tespit edildi.

6- Çok kullanılan, bitkisel kaynaklı içeceklerdeki fenolik madde miktarı tayinleri için, iki biyosensörün de yeterli işlem-depo kararlılıkları ve yüksek doğruluk ile kullanılabilecekleri belirlendi.

Denemeler sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde, geliştirilen amperometrik esaslı bitkisel doku temelli biyosensörlerin laboratuvar düzeyinde kolaylıkla uygulanabilecek pratik ve ekonomik sistemler olduğu ortadadır. Fenolik bileşik standardı olarak kateşolün kullanılmasıyla, toplam fenolik bileşik konsantrasyonlarının tayini yanında, çalışma kapsamında belirlenen 12 farklı fenolik bileşiği içeren örneklerde her birinin tek tek analizi de mümkündür. Saf polifenol oksidaz yerine, bu enzimi yüksek oranda içeren dokuların kullanılması, polifenol oksidazların grup spesifitesi göz önüne alındığında bir dezavantaj yaratmamaktadır. Bu

durum saflaştırma adımlarının elimine edilmesi, ekonomik olması ve ticari preparat ihtiyacını ortadan kaldırması bakımından oldukça pratik ve avantajlı bir sistemdir.

KAYNAKLAR

Abdullah, J., Ahmad, M., Karuppiah, N., Heng, L.Y., Sidek, H., 2005, İmmobilization of tyrosinase in chitosan film for an optical detection of phenol, Sensors and Actuators B Chem. 114, 604-609.

Akyılmaz E., 1996, Preparation of ascorbate oxidase enzyme electrode and its usage for L-ascorbic acid determination, Master of thesis, E.Ü. Faculty of Science, 11p.

Akyılmaz, E., Dinçkaya, E., 2000, A mushrom (Agaricus bisporus) tissue homogenate based alcohol oxidase electrode for alcohol determination in serum, Talanta, 53, 505-509.

Aydın, N., Kadıoğlu, A., 2001, Changes in the chemical composition, polyphenol oxidase an peroxidase activities during devolopment and ripening of medlar fruits (Mespilis germenica). Bulg. J. Plant Physiol.,27, (3-4), 85-92.

Awad, M.A., de Jager, A., 2003. Influences of air and controlled atmosphere storage on the concentration of potentially healthful phenolics in apples and other fruits. *Postharvest Biology and Technology,* (27), 53-58.

Bogdanovskaya, V.A., Tarasevich M.R., 1996, Electrochemical biosensors for medicine and ecology, Biosensors and Bioelectronics, 11(9), 853-861.

Brenes, M., Romero, C., Garcia, A., Hidalgo F.J., Méndez, R., 2004, Phenolic compounds in olive oils intended for refining: formation of 4-Ethylphenol during olive paste storage, J Agric Food Chem (52), 8177-8181.

Brett, A.M., Oliveira, Macedo, T.R.A., Raimundo, D., Marques, M.H., Serrano, S.H.P., 1998, Voltammetric behaviour of mitoxantrone at a DNA-biosensor, Biosensors and Bioelectronics, 13: 861-867.

Chevalier, T., Rigal, D., Didier, M., Frederic, G., Forget, F.R., Fills-Laycon, B.R., 1999, Moleculer cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase. Plant Physiol., 119(4), 1261-1270.

Clark, L.C.Jr., Lyons, C., 1962, Electrode system for continuous monitoring in cardiovascular surgery. Ann. NY Acad. Sci. 102: 29-45.

Climent, P.V., Serralherio, M.L.M., Robelo, M.J.F., 2001, Development of a new amperometric biosensor based on polyethersulphone membrane. Pure Appl. Chem., 73(12), 1993-1999.

Coulet, P. R. , 1991, "What is a Biosensor?" Chapter 1; " Biosensor principles and applications", Ed: Blum, L. J., Coulet, P. R, Marcel Dekker Inc., New York, sayfa 1-6.

Cui, Y., Barford, J.P., Renneberg, R., 2006, Development of an interference-free biosensor for glucose-6-phosphate using a bienzyme-based Clark-type electrode, Sensors and Actuators B Chemical, 123, 696–700.

Dey, P.M., Harborne, J.B., 1989, Methods of Plant Biochemistry, Vol.1, Acedemic Press, London.

D'Orazio, P., 2003, Biosensors on clinical chemistry. Clinica Chemica Acta, 334, 41-49.

Dinçkaya, E., 1999, Enzim sensörleri, Biyosensörler (Ed. Azmi Telefoncu), Ege Ün. Yayınları, 81-142.

Duran, N., Esposito, E., 2000, Potantial aplication of oxidative enzymes and

phenoloxidase-like compound in wastewater and soil treatment: a review. Aplied Catalysis B: Environmental, 28, 83-99.

Duran, N., Rose, A.M., D'Annibella, A., Gianfreda, C., 2002, Aplication of laccases and tyrosinases (polyphenoloxidases) immobilized on different supports: a review. Enzyme and Microbial Technology, 31, 907-931.

D'Souza, S.F., 2001, Microbial biosensors, Biosensors and Bioelectronics, 26, 337-353.

Ercivan, P., Kaşıkara Pazarlıoğlu, N., Telefoncu, A., 1997, Doğal Meyva Sularının Fenolik İçeriklerinin Depolama Süresine Bağlı Değişimi, XI.Ulusal Kimya Kongresi, 16-20 Haziran , Van.

Espesito, 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.

Freeman, A., Lilly, M.D., 1998, Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized microbial cells, Enzyme and Microbial Technology, 23, 335-345.

Fatibello-Filho, O., Lupetti, K.O., Vieria, I.C., 2001, Chronoamperometric determination of paracetamol usin an avocado tissue (Persea americana) biosensor, Talanta, 55, 685-692.

Gajovic, N., Warsinke, A., Scheller F.W., 1998, A bienzyme electrode for L-malate based on a novel and general design, J. Biotechnology 61, 129-133.

Gamez-meza, N., Norđega-Rodrđguez J.A., Medđna-Juarez L.A., Ortega-Garcđa, J., Cazarez-Casanova R. Angulo-Guerrero O., 1999, Antioxidant activity in soybean oil of extracts from thompson grape bagasse, J.A.O.C.S., 76, 1445-1454.

Garcia, E., Barrett D.M., 2002, Preservative treatments for fresh-cut fruits and vegetables. In: O. Lamikanra, Editor, Fresh-cut fruits and vegetables: Science, technology and market, CRC Press, Boca Raton, FL, 267–303.

Gomes, S.A.S.S., Nodueria, J.M.F., Rebelo, J.M.F., 2004, An amperomtric biosensor for polyphenolic compounds in red wine, Biosensors and Bioelectronics 20, 1211-1216.

Gomez-Loppez, V. M., 2002, Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two varieties of avocado. Food Chemistry, 77, 163-169.

Gonzalez, M., Guzman, B., Rudyk, R., Romano, E., Molina, M.A.A, 2003, Spectrofotometric detection of phenolic compounds in propolis, Lat. Am. J. Pharm 22 (3), 243-248.

Gutes, A., Cespedes, F., Alegret, S., del Valle, M., 2004, Determination of Phenolic Compounds by a Polyphenol Oxidase amperometric biosensor and artifical natural network analysis, Biosensors and Bioelectronics, 20, 1668-1673.

Harborne, J.B., 1964, Biochemistry of Phenolic compounds, Acedemic Press, London.

Heinonen, I.M., 2002, Antioxidants in Fruits, Berries and Vegetables. In W. Jongen (ed), fruit and vegetable processing – improving qualty. CRC Press, USA.

Heinio, R.L, Liukkonen, K.H., Myllymaki, O., J. Pihlava, J.M., Adlercreutz, H., Heinonen, S.M., Poutanen, K., 2008, Quantities of phenolic compounds and their impacts on the perceived flavour attributes of rye grainJournal of Cereal Science, 47, 566–575.

HSDB., 1996. Hazardous Substances Data Bank. National Library of Medicine, Bethesda, MD (TOMES CD-ROM Version). Denver, CO: Micromedex, Inc. (Edition expires 7/31/96).

Junhui, Z., Hong, C., Ruifu, Y., 1997, DNA based biosensors. Biotechnology Advances, 15 (1), 43-58.

Kapoor, M., 1996, How to cross-link proteins, Cellular, Molecular and Microbial Biology Division, University of Calgary, Calgary, Canada, T2N 1N4.

Karakuş, E., Pekyardımcı, Ş., Kılıç, E., 2005, Urea biosensors based on PVC memrane containing palmiti acid, Artifical Cells Blood Substitutes and Biotechnology, 33, 329-341.

Killard, A.J., Smith, M.R., 2000,Creatin biosensors: principles and desings, Reviews, TİBTECH, 18, 433-437.

Kochana, J., Nowak, P., Jarosz-Wilkolaska, A., Bieron, M., 2008, Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds, Microchemical Journal, 89, 171–174.

Lei, Y., Chen, W., Mulchandani, A., 2005, Microbiyal biosensors. Analytica Chimica Acta, 568(2006), 200-210.

Leonard, P., Hearty, J., Brennan, J., Dunne, L., Quinn, J., Chakraborty, T., O'Kennedy, R., 2003 Adances in biosensors for detection of pathogens in food and water. Enzyme and Microbial Technology, 32, 3-13.

Lima L.D.L. , Duarte A.C. ve Esteves V.I. , 2007, Optimization of phenolic compounds analysis by capillary electrophoresis, Talanta, 72, 1404-1409.

Macholan, L., 1987, Recent progress in developing enzyme and tissue-based membrane electrodes., Acta-Biotechnol., 7(69), 547-553.

Malhotra, B.D., Chaubey, A., 2003, Biosensor for clinical diagnostics industry. Sensors and Actuators B, 91, 117-127.

Markowski, J. and Plocharski, W., 2006, Determinaton of phenolic compounds apples and processed apple products, Journal of Fruit andOrnamental Plant ReserchVol.14 (Suppl.2), 133-142.

Maslarova, N.V.Y., 2001, Inhibiting Oxidation. In J. Pokorny, N. Yanishlieva, and M. Gordon (eds), Antioxidants in food. CRC Press, USA.

Mayer A. M., 1987, Polyphenol oxidases in plants- recent progress, *Phytochemistry*. Vol. 11, 11-20.

McDonald, T.A., Holland, N.T., Skibola, C., Duramad, P., Smith, M.T., 2001, Hypothesis: phenol and hydroquinone derived mainly from diet and gastrointestinal flora activity are causal factors in leukemia. Leukemia (15), 10-20.

McGown, L.B., Joseph, M.J., Pitner,J.B.,Vonk, G.P. ve Linn, C.P., 1995, The Nucleic acid ligand: A new tool for molecular recognition, Anal. Chem., 67: 663 A-668 A.

Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Ozsoz, M., 2002, Indicator-free DNA biosensor based on adenine and guanine signals, Electroanalysis, 14(18): 1245-1250.

Meyer, A.S., Suhr, K.I., and Nielsen, P., 2000, Natural Food Preservatives. In T. Ohlsson and N. Bengtsson (eds), Minimal processing technologies in the food industry. CRC Press, USA.

Minuti, L., Pellegrino, R., 2008, Determination of phenolic compounds in wines by novel matrix solid-phase dispersion extraction and gas chromatography/mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 1185, 23–30.

Mulchandani, P., Hangarter, C.M., Lei, Y., Chen, W., Mulchandan, A., 2005,

Amperometric microbial biosensor for p-nitrophenol Moraxella sp.-modified carbon paste electrode, Biosensors and Bioelectronics 21, 523-527.

Odacı, D., Timur, S., Telefoncu, A., 2004, Immobilized Jarusalem Artichoke (Helianyus tuberosus) Tissue Electrode for Phenol Detection, Artifical Cells, Blodd Substitutes, and Biotechnology, 32, 2, 315-323.

Portaccio, M., Di Martimo, S., Maiuri, P., Durante, D., De Luca, O., Leore, M., Bencivenga, U., Rossi, S., De Maio, A., Mita, D.G., 2006, Biosensors for phenolic compounds: The catechol as a substrate model, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 41, 97-102.

Rensburg, W.J., Ferreira, D., Jacobus, E.M., Stenkamp, A., 2000, Tyrosinase catalyzed biphenyl construction from flavon-3-ol substrates. Phytochemistry, 53, 285-292.

Rose, P.J., Mark, H.F., Bikales, N.M., Overberger, C.G., Menges, G., Kroscwitz, J.I., 1987, Encylopedia of polymer science and enngineering, second ed., vol.7, Wiley nterscience, New-York. 89.

Sağıroğlu, A. , 2003, Bitkisel doğal bileşikler kimyası, Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümü biyokimya anabilim dalı, 12-13.

Sezgintürk, M.K., Dinçkaya, E., 2003, A novel amperometric biosensor based on spinach (Spinacia oleracea) tissue homogenate for urinary oxalate determination, Talanta, 59, 545-551.

Sezgintürk, M.K., Dinçkaya, E., 2004a, Direct determination of sulfite in food sampels by a biosensor based on plant tissue homogenate, Talanta 65, 998-1002.

Sezgintürk, M.K., Dinçkaya, E., 2004b, An amperometric inhibitor biosensor for the determination of reduced glutatione (GSH) without any derivatization some plants, Biosensors & Bioelectronics, 19, 835-841.

Sezgintürk, M.K., Göktuğ, T., Dinçkaya, E., 2005, Detection of benzoik asit by an amperometric inhibitor biosensor on mushrom tissue homogenate, Food Technol. Biotechnol. 43 (4), 329-334.

Sharma, S.K., Sehgal, N., Kumar, A., 2003, Biomoleculs for development of biosensor and their aplication. Current Applied Physics, 3, 307-316.

Shi, H., Noguchi, N., and Niki, E., 2001, Intoducing Natural Antioxidants. In J. Pokorny, N. Yanishlieva and M. Gordon (eds), Antioxidants in food. CRC Press, USA.

Sidweel, S.K., Rechnitz, G.A., 1986, Progress and challenges for biosensors using plant tissue materials. Biosensors, 2(4), 221-233.

Singh, J., Gupta, K., Arora S.K., 1994, Changes in the anti-nutritional factors of developing seeds and pod walls of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.). Plant Foods Hum Nutr (46), 77-84.

Sternitzke, A., Legrum, W., Netter, K.J., 1992, Effects of phenolic smoke condensates and their components on hepatic drug metabolizing systems, Food Chem Toxicol 30(9), 771-781.

Telefoncu, A., 1997, İmmobilize enzimler, Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu Kitabı, (Ed. Azmi Telefoncu) 183-196, Ege Üniversitesi yayınları.

Telefoncu, A., 1999, Mikrobiyal Biyosensörler, Biyosensörler (Ed. Azmi Telefoncu) 178-185, Ege Üniversitesi yayınları.

Thomas, S., Russell, A.D., 1974, Temperature-Induced Changes in the Sporicidal Activity andChemical Properties of Glutaraldehyde, Aplied Microbiology, 28(3), 331-335.

Timur, S., Pazarlıoglu, N., Pilloton, R., Telefoncu, A., 2003, Detection of phenolic

compounds by thick film sensors based on Pseudomonas putida. Talanta, 61, 87-93.

Tombach, B., Schneider, J., Matzkies, F., Schaefer, R.M., Chemnitius, G.C., 2001, Amperometric creatinine biosensor for hemodialysis patients. Clinica Chimica Acta, 312(1-2), 129-134.

Topcu, S., Sezgintürk, M.K., Dinçkaya, E., 2004, Evaluation of a new biosensor-based mushrom (Agaricus bisporus) tissue homogenate: investigation of certain phenolic compouns and some inhibitor effects, Biosensors and Bioelectronics 20, 592-597.

Wang, J., Naser, N., 1991, Reticulated vitreous carbon-plant tissue composite bioelectrodes. Analitica Chemica Acta., 242 (2) 259-265.

Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Dontha, N., Shiraishi, H., Luo, D., Valera, F. S., 1997a, Sequence-spesific electrochemical biosensing of M. tuberculosis DNA, Anal. Chim. Acta, 337: 41-48.

Wang, J., Rivas, Cai, X., Palecek, E., Nielsen, P., Shirashi, H., Dontha, N., Luo, D., Parrado, C., Chicharro, M., farias, P.A.M., Valera, F.S., Grant, D.H., Ozsoz, M., Flair, M.N., 1997b, DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A Review, Anal. Chim.Acta , 347: 1-8.

Wang, J., Nielsen, P., Jiang, M., Cai, X., Fernandes, J.R., Grant, D.H., Ozsoz, M., Beglieter, A., Mowat, M., 1997c, Mismatch sensitive hybridization detection by peptide nucleic acids immobilized on a quartz crystal microbalance, Anal. Chem., 69: 5200-5202.

Wang, J., Rivas, G., Fernandes, J.R., Jiang, M., Paz, J.L.L.,Waymire, R., Nielsen, T.W., Getts, R.C., 1998, Adsorption and detection of DNA dendrimers at carbon electrodes, Electroanalysis, 10(8): 553-556.

Wciso, M., Compagnone, D., Trojanowicz, M., 2006, Enantioselective screen-printed

amperometric biosensor for the determination of D-amino acids, Biolectrochemistry, 71, 223-230.

Whitaker, J. R., 1994, Principles of Enzymology for the Food Sciences, New York : Marcel Dekker.

Velasco-Garcia, M.N., Monttram. T., 2004, Biosensor technology eddresing agricultural problems. Biosystem Engineering, 84(1),1-12.

Vieria, I.C., Fatibello-Filho, O., 2000, Biosensor based on paraffin/graphite modified with sweet patato tissue for the determination of hydroquinon in cosmetic cream in organic phase, Talanta, 52, 681-689.

Yıldız, A., 1999, Elektrokimyasal Biyosensörler, Biyosensörler (Ed. Azmi Telefoncu) 42-50, Ege Üniversitesi yayınları.

Yıldız, H.B., Toppare L., Gürsel Y.H. ve Yağci Y., 2006, Immobilization of polyphenol oxidase in conducting graft copolymers and determination of phenolic amount in red wines with enzyme electrodes, Enzyme and Microbial Technology, 39, 4, 945-948.

Yılmaz, H., Taşkın, T., Otyludil, B., 2003, Polyphenol oxidase activity during rooting in cuttings of grape (Vitis vinifera L.) varieties. Turk J. Bot., 27, 495-498.

Zavala, F.A.Y., Wang, S.Y., Wang, C.Y., Aguilar, G.A.G., 2004, Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. Lebensm.-Wiss.u.-Technol. (37), 687–695.

Zhou, Y.L., Zhi, J.F., 2006, Development of an amperometric biosensor based on covalent immobilization of tyrosinase on a boron-doped diamond electrode, Electrochemistry Comunications 8, 1811-1816.

Ziyan, E., Pekyardımcı, S., 2003, Characterization of Polyphenol Oxidase from Jerusalem Artichoke (Helianthus tuberosus), Turk. J. Chem., 27, 217-226.

http://www.sagliksayfam.com/besinler-ve-ozellikleri/anamurmuzu

http://www.karanlar.com

http://www.nedir.cc/bitkiler/bakla

http://www.sagliksayfam.com/besinler-ve-ozellikleri/bakla

http://en.wikipedia.org/wiki/catechol

ÖZGEÇMİŞ

1978 Yılında Ankara'da doğdum. İlk öğrenimimi Bayrampaşa Nail Reşit İlkokulu'nda, orta öğrenimimi Çapa Ortaokulu'nda, lise öğrenimimi Bayrampaşa Rıfat Canayakın Süper Lisesi'nde 1997 yılında tamamladım. 2001 yılında Trakya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden mezun oldum. Yüksek lisansımı 2001-2004 yılları arasında Trakya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı'nda tamamladım. 2004 yılında aynı bölümde doktora öğrenimime başladım.

2002 yılından itibaren Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım. Evliyim.