T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FENOLİK BİLEŞİKLERİN TAYİNİNDE BAKTERİ VE BİTKİ DOKUSU ESASLI BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Nurten ASLAN

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

2019

T.C

DİCLE UNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Nurten ASLAN tarafından yapılan "Fenolik Bileşiklerin Tayininde Bakteri ve Bitki Dokusu Esaslı Biyosensör Geliştirilmesi" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan: Prof. Dr. Sait YÜCEL

Üye : Prof. Dr. Mehmet DOĞRU

Üye : Prof. Dr. Sevda KIRBAĞ

Üye: Prof. Dr. Reyhan GÜL GÜVEN (Danışman)

Üye: Doç. Dr. Yunus ESEN

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 25/11/2019

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../20

Prof. Dr. Sevtap SÜMER EKER

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarımın her aşamasında beni destekleyen ve her türlü yardımlarını esirgemeyen bilimsel azmini, çalışma tekniklerini ve başarılarını örnek aldığım çok kıymetli hocam **Sayın Prof. Dr. Reyhan GÜL GÜVEN**'e en derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam esnasında her zaman ilgisini ve yardımını esirgemeyen **Sayın Prof. Dr. Kemal GÜVEN**'e, bakteri çalışmalarımda yardımı için **Ayşe EREN**'e, yardımları için **Tacettin TUNÇ**'a ve ZGEF.17.007 nolu proje kapsamında bu çalışmayı destekleyen **Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri** birimine teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu tezin en başından beri yanımda olan sabırlarını ve sevgilerini asla esirgemeyen sevgili aileme ve arkadaşlarım **Hicran YAPAN ARSLAN, Semra TİTİZ** ve **Ali Evren ARSLANOĞLU**'na sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

NURTEN ASLAN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **I**
İÇİNDEKİLER ..... **II**
ÖZET ..... **V**
ABSTRACT ..... **VII**
ÇİZELGE LİSTESİ ..... **IX**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **X**
KISALTMALAR VE SİMGELER ..... **XII**
1. GİRİŞ **1**
1.1. Fenolik Bileşikler ve Özellikleri 1
1.2. Fenolik Bileşiklerin Kimyasal Yapıları 1
1.2.1. Fenolik Asitler 1
1.2.2. Flavonoidler 1
1.3. Fenolik Bileşiklerin Tespit Edilmesinin Önemi 3
1.4. Polifenoloksidaz ve Önemi 4
1.4.1. Polifenoloksidazların Substratları 5
1.4.1.1. Katekol 6
1.4.2. Polifenoloksidazların Katalizlediği Tepkimeler 6
1.5. Fenolik Bileşiklerin Tayin Yöntemleri 7
1.6. Biyosensörler 8
1.6.1. Biyosensörlerin Tarihçesi 9
1.6.2. Biyosensörlerin Yapı ve Fonksiyonu 13
1.6.3. Biyosensörlerin Sınıflandırılması 14
1.6.3.1. Biyoaktif Tabaka-İletim ve Ölçüm Sistemi İçeriğine Göre Biyosensörlerin Sınıflandırılması 14
- Elektrokimyasal Esaslı Biyosensörler: 14
1.6.3.2. Biyoaktif Tabakada Kullanılan Biyobileşen Türüne Göre Biyosensörleri Sınıflandırılması 16
- Biyoajanlar (Biyoaktif tabaka) 16
1.6.4. Biyolojik Bileşenlerin İmmobilizasyonu 18
1.6.5. Jelatin 21
1.6.6. Glutaraldehit 22
1.6.7. İdeal Bir Biyosensörde İstenilen Özellikler 22

1.6.8. Biyosensör Teknolojisinin Avantaj ve Dezavantajları 25
1.6.9. Biyosensör Türleri ve Uygulama Alanları 26
1.7. Çalışmada Kullanılan Biyoaktif Bileşenler 30
1.7.1. Mısır Bitkisi (*Zea mays)* 30
1.7.2. Mısır Püskülü 30
1.7.3. Biber (*Capsicum annuum* L.) 31
1.7.4. *Pseudomonas putida* 32
1.7.4.1. Sınıflandırılması 32
1.7.4.3. Genomik Yapısı 33
1.7.4.4. Hücre Yapısı ve Metabolizması 34
1.7.4.5. Ekolojileri 35
1.7.4.7. Biyoteknolojiye Uygulama 36
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 37
3. MATERYAL VE METOT 45
3.1. Materyal 45
3.1.1. Cihazlar 45
3.1.2. Kimyasallar 46
3.2. Metodlar 46
3.2.1. Mısır Püskülü Ham Ekstratının Hazırlanışı 46
3.2.2. Biber Tohumu Ham Ekstratının Hazırlanışı 47
3.2.3. Bakteri Temelli Biyosensör için Uygun Bakterinin Seçilmesi 47
3.2.4. Bakteri Ham Ekstratının Hazırlanışı 47
3.2.5. Aktivite Tespiti 47
3.2.6. Mısır Püskülünün Sensör için Hazırlanması 48
3.2.7. Biber Tohumunun Sensör İçin Hazırlanması 48
3.2.8. Biyosensörün Ölçüm Prosedürü 50
3.2.9. Uygun Substratın Belirlenmesi 51
3.2.10. Biyosensörlerin İmmobilizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu 52
3.2.10.1. Doku Miktarının Tespiti 52
3.2.10.2. Jelatin Miktarının Biyosensörlerin Cevabına Etkisi 53
3.2.10.3. Glutaraldehit Yüzdesinin Biyosensörlerin Cevabına Etkisi 54
3.2.11. Biyosensörlerin Çalışma Koşullarının Belirlenmesi 55
3.2.11.1. Opitimum pH Değerlerinin Belirlenmesi 55
3.2.11.2. Uygun Tampon Derişiminin Tespiti 55

3.2.11.3. Optimum Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi....55
3.2.12.1. Doğrusal Ölçüm Aralığının Tespit Edilmesi....55
3.2.12.2. İşlem Kararlılığı....55
3.2.12.3. Raf Ömrü....56
3.2.12.4. Biyosensörlerin Cevabı Üzerine Girişimlerin Etkisi....56
3.2.12.5. Biyosensörlerin Gerçek Örneklere Uygulanabilirliğinin Tespiti....56
4. ARAŞTIRMA BULGULARI....59
4.1. Substrat Olarak Kullanılacak Standart Fenolik Bileşiğin Seçilmesi....59
4.2. Biyosensörlerin Hazırlanma Koşullarının Optimizasyonuna Ait Bulgular....60
4.2.1. Uygun Doku Miktarının Tespit Edilmesi....60
4.2.2. Uygun Jelatin Miktarının Tespit Edilmesi....62
4.2.3. Uygun Glutaraldehit Yüzdesinin Tespit Edilmesi....64
4.3. Biyosensörlerin Çalışma Koşullarının Optimizasyonuna Ait Bulgular....65
4.3.1. Optimum pH....65
4.3.2. Optimum Sıcaklık....67
4.4. Biyosensörlerin Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular....69
4.4.1. Doğrusal Ölçüm Aralığının Tespiti....69
4.4.2. İşlem Kararlılığı....70
4.4.3. Raf Ömrü....72
4.4.4. Gerçek Numune Analizi....74
4.4.5. Biyosensörlerin Cevabı Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi....75
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR....77
6. KAYNAKLAR....81
ÖZGEÇMİŞ....97

ÖZET

FENOLİK BİLEŞİKLERİN TAYİNİNDE BAKTERİ VE BİTKİ DOKUSU ESASLI BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Doktora Tezi

Nurten ASLAN

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2019

Bu çalışmada fenolik bileşikleri substrat olarak kullanan, polifenoloksidaz enzimi aktivitesi gösteren mısır püskülü, biber tohumu ve *Pseudomonas putida* kullanılarak, çeşitli örneklerde fenolik bileşik tespiti amacıyla biyosensörler geliştirildi. Bu amaçla mısır püskülü, biber tohumu ve *Pseudomonas putida'*nın ham enzim ekstraktlarının spektrofotometrik yöntemle 0.1 M katekol varlığında polifenol oksidaz enzimi aktiviteleri tespit edildi.

Biyosensör geliştirmek için bitki dokuları ve bakteri, immobilizasyon materyali olarak jelatin ve çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılarak oksijen elektrotudu üzerine immobilize edildi. Hazırlanan biyosensörlerin biyosensör cevapları üzerine sıcaklık ve pH etkisi tespit edildi, biyosensörlerin biyolojik bileşenlerini oluşturan mısır püskülü, biber tohumu ve bakteri, glutaraldehid ve jelatin miktarının biyosensör üzerine etkisi incelendi. Hazırlanan biyosensörler ile subsrat olarak kullanılan katekolün lineer aralığı belirlendi, sonuçlarının tekrarlanabilirliği, depo kararlılığı, bazı kimyasalların girişim etkisi ve biyosensörlerin gerçek örneklerdeki fenolik bileşiklerin belirlenmesinde uygulanabilirliği incelendi.

Yapılan çalışmalarda, mısır püskülü homojenatı ile hazırlanan biyosensörün optimum pH'ı 7.0, optimum sıcaklık 40 ºC olarak tespit edildi. Biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyon çalışmalarında; en uygun doku miktarı 100 mg, en uygun jelatin miktarı 10 mg ve en uygun glutaraldehit yüzdesi % 1.5 olarak belirlendi. En uygun subsratın katekol olduğu tespit edildi. Biyosensörün katekol için tayin sınırları 0.05 – 0.2 M aralığı olarak belirlendi. Mısır püskülü homojenatı ile hazırlanan biyosensörün işlem kararlılığını ve tekrarlanabilirliği belirlemek için 30 dk arayla 6 kez ölçüm yapıldı. Biyosensörün depo kararlılığının belirlenmesinde ise; 30 gün boyunca farklı zamanlarda ölçümler alındı. İlk 20 gün aktivitenin devam ettiği tespit edildi. Çinkonun en çok girişim etkisi yaptığı tespit edildi. Mısır biyosensörü ile elma suyu ve Elazığ İli Maden ilçesindeki Bakır işletmesi yakınındaki atık su numunesinde fenol analizi yapıldı.

Yapılan çalışmalarda, biber tohumu homojenatı ile hazırlanan biyosensörün optimum pH'ı 7.0 ve optimum sıcaklığı 40 ºC olarak tespit edildi. Biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyon çalışmalarında ; en uygun doku miktarı 100 mg, en uygun jelatin miktarı 10 mg ve en uygun gluteraldehit yüzdesi % 1olarak belirlendi. Optimum koşullarda hazırlanan bitki dokusu esaslı biyosensörün en uygun substratı olan katekol için lineer aralık 0.05-0.2 M olarak belirlendi. Biyosensörün işlem kararlılığı ve tekrarlanabilirliğini tespit etmek için 30 dk arayla 6 kez ölçüm yapıldı. Biyosensörün depo kararlılığının tespitinde ise ; 35 gün süresince farklı zamanlarda ölçümler yapıldı. Aktivitenin ilk 30 gün devam ettiği tespit edildi. Çinko ile manganın en çok girişim etkisi yaptığı tespit edildi. Biber biyosensörü ile elma suyu ve Elazığ İli Maden ilçesindeki Bakır işletmesi yakınındaki atık su numunesinde fenol analizi yapıldı.

Bakteri ile hazırlanan biyosensörün optimum pH'ı 7.0 ve optimum sıcaklığı 30 ºC olarak belirlendi. Optimum özüt miktarı 100 mg, optimum jelatin miktarı 5 mg ve optimum glutaraldehit yüzdesi % 1,5 olarak belirlendi. Optimum koşullarda hazırlanan bakteri esaslı biyosensörün en uygun subsratı olan katekol için lineer aralık 0.01 –0.1 M olarak belirlendi. Bakteri homojenatı ile hazırlanan biyosensörün işlem kararlılığı ve tekrarlanabilirliğini tespit etmek için 30 dk arayla 5 kez ölçüm yapıldı. Biyosensörün depo kararlılığının tespitinde ise; 30 gün süresince ölçümler yapıldı. İlk 30 gün, aktivitenin devam ettiği tespit edildi. Bazı kimyasalların girişim etkisi incelendiğinde ise nikelin en çok girişim etkisi yaptığı tespit edildi. Bakteri biyosensörü ile elma suyu ve Elazığ İli Maden ilçesindeki Bakır işletmesi yakınındaki atık su numunesinde fenol analizi yapıldı.

Anahtar Kelimeler: Biyosensör, Mısır Püskülü, Biber Tohumu, *Pseudomonas putida*, Fenol Tayini.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF THE BACTERIA AND PLANT TISSUE-BASED BIOSENSOR FOR DETERMINATION OF PHENOLIC COMPOUNDS
PhD Thesis

DICLE UNIVERSITY
INSTİTUTE OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

2019

In this study, biosensors have been developed for the detection of phenolic compounds in various samples using corn tassel, pepper seed and *Pseudomonas putida* isolated from Batman South Raman, which showed polyphenoloxidase enzyme activity using phenolic compounds as substrate. For this purpose, polyphenol oxidase enzyme activities of the crude enzyme extracts of corn tassel, pepper seed and *Pseudomonas putida* were determined in the presence of 0.1 M catechol by spectrophotometric method.

To develop biosensors, plant tissues and bacteria were immobilized onto oxygen electrode using gelatin as the immobilization material and glutaraldehyde as the crosslinker. The effect of temperature and pH on the biosensor responses of the prepared biosensors were determined and the effect of corn tassel, pepper seed and bacteria, glutaraldehyde and gelatin amount on the biosensor were examined. The linear range of the catechol used as a substrate was determined by the biosensors prepared, the reproducibility of the results, storage stability, interference effect of some chemicals and the applicability of biosensors in the determination of phenolic compounds in real samples were examined.

In the studies, the optimum pH of the biosensor prepared with corn tassel homoganete was 7.0 and the optimum temperature was 40 ºC.In optimization studies of bioactive layer components; The most suitable tissue amount was 100 mg, the most suitable gelatin amount was 10 mg and the most suitable glutaraldehyde percentage was determined as 1.5%.The linear range for catechol, which is the most suitable substrate of plant tissue-based biosensor prepared under optimum conditions, was determined as 0.05-0.2 M. In order to determine the stability and reproducibility of the biosensor, measurements were carried out 6 times at 30 min intervals. In determination of storage stability of biosensor; measurements were performed at different intervals for 30 days. It was determined that the activity continued for the first 20 days. It was found that zinc had the most interference effect. Phenol analysis of apple juice and waste water samples nearby copper mining field in Maden town of Elazığ city.

The optimum pH of the biosensor prepared with pepper seed homogenate was 7.0 and the optimum temperature was 40 ºC. In optimization studies of bioactive layer components; The most suitable tissue amount was 100 mg, the most suitable gelatin amount was 10 mg and the most suitable glutaraldehyde percentage was determined as 1%. The linear range for catechol, which is the most suitable substrate of plant tissue-based biosensor prepared under optimum conditions, was determined as 0.1 –0.2 M. In order to determine the stability and reproducibility of the biosensor, measurements were carried out 6 times at 30 min intervals. In determination of storage stability of biosensor; Measurements were performed at different intervals for 35 days. It was determined that the activity continued for the first 30 days. It was determined that zinc and manganese had the most interference effects. Phenol analysis of apple juice and waste water samples nearby copper mining field in Maden town of Elazığ city.

The optimum pH of the biosensor prepared with the bacteria was 7.0 and the optimum temperature was determined as 30 ºC. The optimum extract amount was 100 mg, the optimum gelatin amount was 5 mg and the optimum glutaraldehyde percentage was 1.5%. . The linear range for catechol, which is the most suitable substrate of bacterial-based biosensor prepared under optimum conditions, was determined as 0.1 –0.4 M. In order to determine the stability and reproducibility of the biosensor prepared with bacterial homogenate, measurements were carried out 5 times at 30 min intervals. In determination of storage stability of biosensor; Measurements were performed for 30 days. It was determined that the activity continued during the first 30 days. When the interference effect of some chemicals was examined, it was found that nickel had the most interference effect. Phenol analysis of apple juice and waste water samples nearby copper mining field in Maden town of Elazığ city.

Key Words: Biosensor, Corn tassel, Pepper seed, *Pseudomonas putida*, Phenol determination.

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge 1.1.	İmmobilizasyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları	21
Çizelge 3.1.	Cihazlar ve markaları	45
Çizelge 3.2.	Mısır püskülü biyosensörü için immobilizasyon parametrelerinin optimizasyonu	52
Çizelge 3.3.	Biber tohumu biyosensörü için immobilizasyon parametrelerinin optimizasyonu	52
Çizelge 3.4.	Bakteri biyosensörü için immobilizasyon parametrelerinin optimizasyonu	52
Çizelge 3.5.	Mısır püskülü biyosensörü jelatin miktarı optimizasyonu için hazırlanan sensörler	53
Çizelge 3.6.	Biber tohumu biyosensörü jelatin miktarı optimizasyonu için hazırlanan sensörler	53
Çizelge 3.7.	Bakteri biyosensörü jelatin miktarı optimizasyonu için hazırlanan sensörler	53
Çizelge 3.8.	Mısır püskülü biyosensörü için gluteraldehit yüzdesi optimizasyonu için hazırlanan sensörler	54
Çizelge 3.9.	Biber tohumu biyosensörü için gluteraldehit yüzdesi optimizasyonu için hazırlanan sensörler	54
Çizelge 3.10.	Bakteri biyosensörü için gluteraldehit yüzdesi optimizasyonu için hazırlanan sensörler	54
Çizelge 4.1.	Mısır püskülü biyosensörü ile fenol tayini	74
Çizelge 4.2.	Biber tohumu biyosensörü ile fenol tayini	74
Çizelge 4.3.	Bakteri biyosensörü ile fenol tayini	75
Çizelge 5.1.	Biyosensörlerin bazı özelliklerinin karşılaştırılması	80

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.1.	Flavonoidlerin genel yapısı	2
Şekil 1.2.	Polifenol oksidaz enziminin yapısı	4
Şekil: 1.3.	Enzimatik Esmerleşme Reaksiyonu	5
Şekil 1.4.	Polifenoloksidaz enziminin bazı substratlarının yapısı	6
Şekil 1.5.	Katekolun genel yapısı	6
Şekil 1.6.	Polifenol oksidazın katalizlediği tepkimeler	7
Şekil 1.7.	Biyosensörlerin şematik gösterimi	8
Şekil 1.8.	Biyosensörlerin bileşenleri	9
Şekil 1.9.	Clark'ın oksijen elektrodu	12
Şekil 1.10.	YSI 23A Glukoz Biyosensorü	13
Şekil 1.11.	Kişişel glukoz ölçüm cihazı	13
Şekil 1.12.	Biyoaktif tabaka-iletim ve ölçüm sistemi içeriğine göre biyosensörler	14
Şekil 1.13.	Amperometrik biyosensörlerin genel yapısı	15
Şekil 1.14.	Piezoeletrik esaslı biyosensörlerin görünümü	16
Şekil 1.15.	Bitki dokuları	17
Şekil 1.17.	İmmobilizasyonunda kullanılan teknikler	20
Şekil 1.18.	Glutaraldehit'in yapısı	22
Şekil 1.19.	Biyosensörlerin genel kullanım alanları	27
Şekil 1.20.	Gebelik testi	29
Şekil 1.21.	Mısır püskülü	31
Şekil 1.22.	Biber Tohumu	31
Şekil 1.23.	*Pseudomonas putida*	32
Şekil 3.1.	Aktivite tespiti	48
Şekil 3.2.	Çalışma elektrodu	50
Şekil 3.3.	Elektrod sistemi	51
Şekil 3.4.	Biyosensörlerin farklı örneklere uygulanabilirliğinin incelenmesi	57
Şekil 4.1.	Mısır püskülü için uygun substratın seçimi	59
Şekil 4.2.	Biber tohumu için uygun substratın seçimi	60
Şekil 4.3.	Bakteri için uygun substratın seçimi	60
Şekil 4.4.	Mısır püskülü biyosensörü için doku miktarının biyosensör cevabına etkisi	61
Şekil 4.5.	Biber tohumu biyosensörü için doku miktarının biyosensör cevabına etkisi	61
		61

Şekil 4.6. Bakteri biyosensörü için doku miktarının biyosensör cevabına etkisi 62
Şekil 4.7. Mısır püskülü biyosensörü için jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi 62
Şekil 4.8. Biber tohumu biyosensörü için jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi 63
Şekil 4.9. *Pseudomonas putida* biyosensörü için jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi 63
Şekil 4.10. Mısır püskülü biyosensörü için glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi 64
Şekil 4.11. Biber tohumu biyosensörü için glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi 64
Şekil 4.12. *Pseudomonas putida* biyosensörü için glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi 65
66
Şekil 4.13. Mısır püskülü biyosensörü için optimum pH grafiği 67
Şekil 4.15. Bakteri biyosensörü için optimum pH grafiği 67
Şekil 4.16. Mısır püskülü biyosensörü için optimum sıcaklık grafiği 68
Şekil 4.17. Biber tohumu biyosensörü için optimum sıcaklık grafiği 68
Şekil 4.18. Bakteri biyosensörü için optimum sıcaklık grafiği 69
Şekil 4.19. Mısır püskülü biyosensörü için katekol kalibrasyon eğrisi 69
Şekil 4.20. Biber tohumu biyosensörü için katekol kalibrasyon eğrisi 70
Şekil 4.21. Bakteri biyosensörü için katekol kalibrasyon eğrisi 71
Şekil 4.22. Mısır püskülü biyosensörü için işlem kararlılığı 71
Şekil 4.23. Biber tohumu biyosensörü için işlem kararlılığı 71
Şekil 4.24. Bakteri biyosensörü için işlem kararlılığı 72
Şekil 4.25. Mısır püskülü biyosensörü için depo kararlılığı 73
Şekil 4.26. Biber tohumu biyosensörü için depo kararlılığı 73
Şekil 4.27. Bakteri biyosensörü için depo kararlılığı 74
Şekil 4.28. Gallik asit standart grafiği 75
Şekil 4.29. Mısır Püskülü biyosensörü için inhibitör denemeleri 76
Şekil 4.30. Biber tohumu biyosensörü için inhibitör denemeleri 76
Şekil 4.31. Bakteri biyosensörü için inhibitör denemeleri 76

KISALTMALAR VE SİMGELER

PFO	:Polifenoloksidaz enzimi
E.C	:Enzim kod numarası
ÇO	:Çözünmüş Oksijen
E.Ü	:Enzim ünitesi
mM	:Milimolar
µm	:Mikrometre
M	:Molar
PEG	:Polietilen glikol
mg/L	:1 litre çözeltideki maddenin miligram miktarı
PHA	:Poly-3-hidroksialkanoat
BOİ	:Biyolojik oksijen ihtiyacı
NB	:Nutrient Broth

1. GİRİŞ

1.1. Fenolik Bileşikler ve Özellikleri

Fenolik bileşikler, yapılarıyla en az bir fenol ünitesine sahip olan küçük moleküller grubudur. Kimyasal yapılarına dayanarak, fenolik bileşikler fenolik asitler, flavonoidler, tanenler, kumarinler, ligantlar, kinonlar, stilbenler ve curcuminoidler gibi farklı alt gruplara ayrılabilir. Fenolik bileşikler, meyve ve sebzeler de dahil olmak üzere çoğu bitki dokusunda bulunan her yerde bulunan fitokimyasallardır (Rosa ve ark. 2019). Fenolik bileşiklerin çoğu, bitkilerin hücre içi endoplazmik retikulumunda sentezlenir ve vakuolde saklanır. Bağlı fenolik bileşikler, çözünür fenolik bileşiklerin hücre duvarına taşınmasıyla oluşturulur, bunlar daha sonra hücre duvarı makromolekülleri ile ester ve glikosidik bağlar yoluyla konjüge edilir ve böylece hücre duvarı oluşumuna katkıda bulunur (Agati ve ark. 2012).

1.2. Fenolik Bileşiklerin Kimyasal Yapıları

Fenol (benzo fenol veya hidroksibenzen) fenolik bileşiklerin ilk üyesi (C_6H_5OH) olarak bilinir (Dixon ve Paiva 1995). Bitkisel materyallerde bulunan fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler gibi alt gruplara ayrılırlar.

1.2.1. Fenolik Asitler

Fenolik asitler serbest, konjuge, çözünür ve çözünmeyen bağlı formlarda bulunan, flavonoid olmayan fenolik bileşiklerin en yaygın şekilde dağılmış olanları arasındadır. Fenolik asitler tüm besin gruplarında bulunur ve bunlar tahıllarda, yağlı tohumlarda, sebzelerde, meyvelerde, içeceklerde ve bitkilerde bol miktarda bulunur. Diğerlerinin yanı sıra, hidroksil radikalini, süperoksit radikal anyonunu, çeşitli organik radikalleri, peroksil radikalini, peroksinitrit ve tekli oksijeni temizleyerek antioksidan aktivite gösterebilirler (Chandrasekara 2019).

1.2.2. Flavonoidler

Flavonoidler, hücre sinyalleme yolları ve antioksidan etkiler yoluyla sağlık yönünden faydalı olduğu düşünülen bir grup bitki metabolitidir. Bu moleküller çeşitli meyve ve sebzelerde bulunur. Flavonoidler, 15 karbon atomu içeren polifenolik moleküllerdir ve suda çözünür. Flavonoidler bitkilerde her yerde bulunur ve insan diyetinde bulunan en yaygın polifenolik bileşik türüdür. Flavonoidler yönünden zengin yiyeceklerin örnekleri arasında soğan, maydanoz, yaban mersini, muz, bitter çikolata ve kırmızı şarap bulunur (Robertson 2018).Yapısal olarak beş grupta incelenirler;

a- Antosiyanidinler

b- Flavonlar ve flavonollar

c- Flavanonlar

d- Kateşinler ve löykoantosiyanidinler

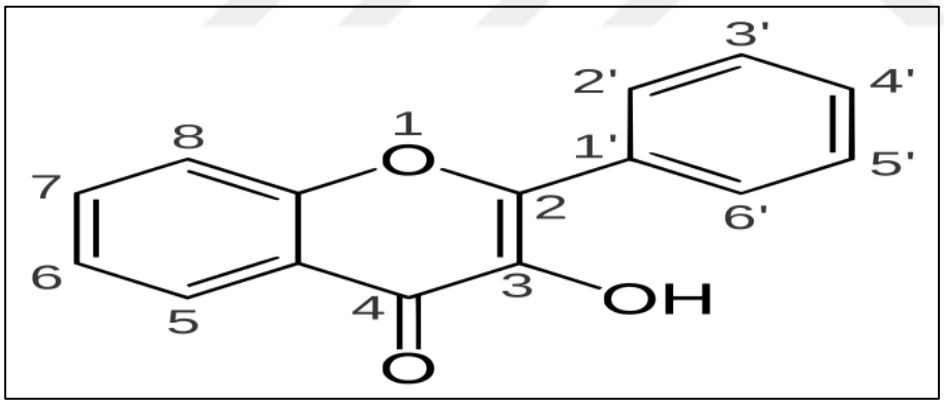
e- Proantosiyanidinler

a.Antosiyanidinler

Antosiyaninler fenolik gruba ait suda çözünür renkli pigmentlerdir. Kırmızı, mor ve mavi renklerden sorumlu antosiyaninler meyve ve sebzelerde bulunur. Meyveler, kuş üzümü, üzüm ve bazı tropik meyveler yüksek antosiyanin içeriğine sahiptir. Bu pigmentlerin rengi ve stabilitesi, pH, ışık, sıcaklık ve yapıdan etkilenir. Asidik durumda, antosiyaninler kırmızı görünür, ancak pH arttığında maviye döner (Tang ve ark. 2017).

b. Flavonlar ve Flavonollar

Şekil 1.1'de görüldüğü üzere orta halkanın 3. karbon atomuna flavonlarda (H), flavonollarda (OH) grubu bağlanmıştır. Antosiyanidinler gibi bunlarda şekerlerle glikozit halinde bağlanmış şekilde bulunurlar (Castillo ve ark. 2004).



Şekil 1.1. Flavonoidlerin genel yapısı

c. Flavanonlar

Flavanonlar turunçgillerde yaygın olarak bulunurlar (Turna 2006).

d. Löykoantosiyanidinler ve Kateşinler

Üçüncü karbon atomunda bir OH grubu içeren flavonoidlere kateşinler adı verilir (Zhang ve Rechnitz 1994). Kateşinler gıdalarda sık olarak bulunan flavonoid grubunu meydana getirirler.

e. Proantosiyanidinler

Proantosiyanidinler bitkisel kaynaklı gıdalarda fazla olup ; (-)-epikateşin ve (+)-kateşin kombinasyonlarından oluşan dimerlerdir (Zhang ve Rechnitz 1994, Castillo ve ark. 2004).

1.3. Fenolik Bileşiklerin Tespit Edilmesinin Önemi

Dünyada 20.yy'ın sonlarına doğru hızlı bir endüstriyel değişim meydana gelmiştir. Bunun sonucu olarak doğaya çok miktarda endüstriyel atık bırakılmış ve bu atıkların zamanla zararlı etkileri görülmeye başlanmıştır. Fenol ve fenol türevleri de bu atık türlerinin en önemlilerindendir. Fenol bileşikleri ve homologlarının çoğu zehirli maddelerdir. Fenolik çevre kirliliğine yol açan bu toksik bileşikler deri ve mukoz membran aracılığıyla rahatça absorbe olarak akciğer, karaciğer, böbrek ve üreme sisteminde hasarlara sebebiyet verirler (Shan ve ark. 2009). Güneşten gelen ultraviyole ışınları, suda bulunan fenol ve nitrit iyonları arasında bir reaksiyona neden olabilir ve reaksiyon sonucunda oluşan 2-nitrofenol ve 4-nitrofenol ise suda yaşayan organizmalar için toksik etki yapabilir (Patnaik ve Khoury 2004). Bu nedenle fenolik bileşiklerin çevre, gıda ve endüstriyel örneklerde tayinleri oldukça önemlidir.

Endüstriyel atıkların önemli bir kolu olan fenolün dünya çapında kullanım alanlarından en önemlisi fenolik reçine üretimidir. Fenolik reçineler, kâgıt endüstrisi, kauçuk işletme endüstrisi ile yalıtım ve yüksek sürtünmeye dayanıklı malzeme üretiminde kullanılmaktadır. Bundan başka bazı fenolik bileşikler ilaç endüstrisinde de kullanılmaktadır (Sokol 1998).

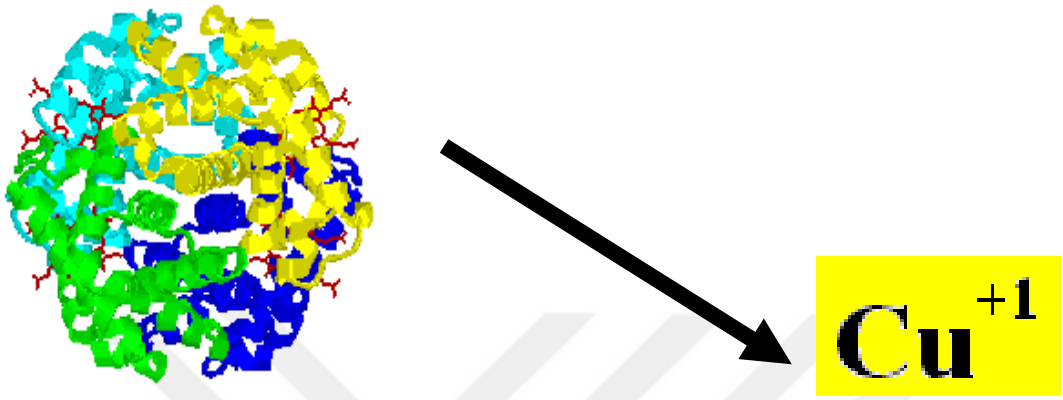
Doğada 8.000'e yakın fenolik bileşik bilinmektedir. Bunlardan bazıları fenol, rezorsinol, orsinol, pirogallol , katekol, gallik asit, siringik asit gibi hidroksi benzoik asitler, flavonoidler ve diger fenol ürünleridir. Bu kadar geniş bir sınıfa sahip olan fenolik bileşiklerin tayin edilmelerinde bir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

Fenolik bileşiklerin tayinleri için gaz kromatografi ve spektrofotometri gibi metotlar mevcuttur (Lupetti ve ark. 2004, Bagheri ve ark. 2004, Faraji 2005). Bu metotlar birçok ön hazırlık gerektiren işlemler içerir. Biyosensör ile fenolik bileşiklerin tayin edilmelerinde enzim olarak substrat olan fenolik bileşiği moleküler oksijeni kullanarak dönüşüme uğratan polifenoloksidazlar kullanılmaktadır. Polifenol oksidaz enziminin kullanıldığı amperometrik biyosensörler ise hızlı ve duyarlı tayin için bu metodlara bir alternatiftir (Shan ve ark. 2007).

1.4. Polifenoloksidaz ve Önemi

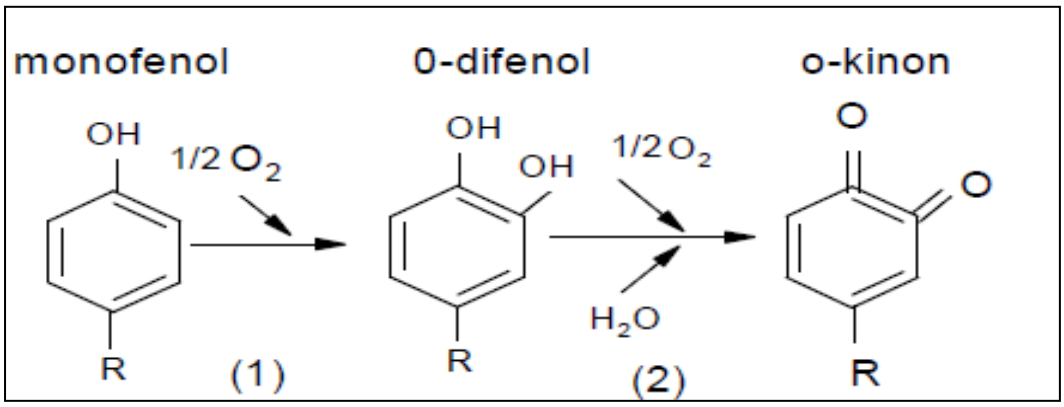
Polifenoloksidazlar, oksidoredüktaz sınıfı enzimlerdir. Kofaktör olarak Şekil 1.2'de görüldüğü gibi iki adet kompleksleşmiş Cu^{+2} içerirler. Polifenol oksidazlar dışında tirozinaz,

fenol oksidaz, kateşolaz olarak da bilinirler. Bu enzimler canlılarda bakterilerden memelilere kadar uzanan geniş bir yelpazede dağılım gösterirler (Duran ve ark. 2002). Bu grubun ortak özelliği, moleküler oksijen varlığında fenollerin oksidasyonunu katalizleme kapasitelerinin olmasıdır (Shi ve ark. 2002).



Şekil 1.2. Polifenol oksidaz enziminin yapısı

PFO'lar, evrimsel olarak bakterilerden memelilere kadar pek çok canlıda bulunan, hasar görmüş dokularda fenolik maddelerin kahverengi pigmentleri üreten kinonlara oksidasyonunu katalizleyen bakır proteinlerinin bir grubudur (Mayer 1986). PFO'ın aktif bölgesi iki bakır atomundan oluşmakta ve enzim, moleküler oksijen varlığında monofenollerin hidroksillenmesi (monofenolaz aktivitesi) ve o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonu (difenolaz aktivitesi) olmak üzere iki farklı reaksiyonu katalizlemektedir. Bu reaksiyonu melaninlerin oluşumunu sağlayan kinonların enzimatik olmayan polimerizasyonu, yüksek molekül kütleli pigmentler ve koyu renk takip etmektedir (Peñalver ve ark. 2005, Espín ve ark. 1998). PFO için önerilen etki mekanizması fenolik bileşiklerin oksidasyon kapatesine dayanmaktadır. Doku hasar gördüğünde, PFO'ın bulunduğu hücresel bölüm olan plastidlerin kopması, enzimin, bu bileşiklerin ana depolama organeli olan vakuolün kopması sonucu açığa çıkan fenolik bileşiklerle temasa geçmesine yol açmaktadır (Mayer ve Harel 1979).



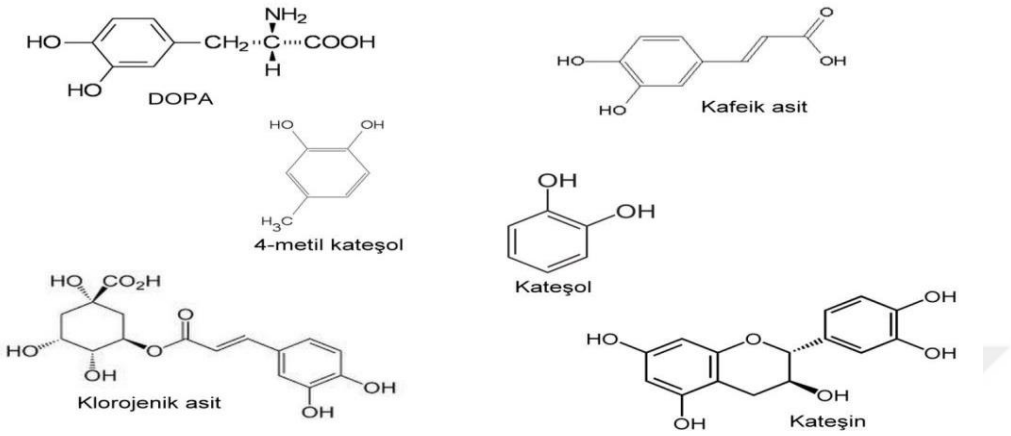
Şekil: 1.3. Enzimatik Esmerleşme Reaksiyonu (Cemeroğlu ve ark. 2001)

Bitkilerdeki PFO'ın görevi henüz net olmamakla beraber, bağışıklık reaksiyonlarında, bitki bileşenlerinin biyosentezinde ve fotosentez yapan dokularda serbest radikal süpürücü görevi gördüğü (Heimdal ve ark. 1994), hasar görmüş yaprak yüzeylerinde çürümede ve ayrıca böceklere ve bitki patojenlerine karşı savunmada görev aldığı ileri sürülmektedir (Aydemir 2004). Fenolik bileşiklerin fiziksel polifenolik bariyerlerin oluşumunda öncü olarak etki ederek patojen translokasyonunu sınırlandırdıkları ifade edilmektedir. PFO tarafından oluşturulan kinonların bitki proteinlerini bağlayabildikleri, protein sindirilebilirliğini ve besleyici değerini düşürebildikleri bilinmektedir (Ryan 2000). Ayrıca, fenolik substratların PFO tarafından oksidasyonunun olgunlaşma sırasında pek çok meyve ve sebzede kahverengileşmenin en büyük nedeni olduğu düşünülmektedir. Söz konusu durum besinsel kalite ve görünümü etkilediği, tüketici kabulünü azalttığı ve dolayısıyla gıda üreticileri ve gıda işleme endüstrisine önemli ekonomik etkilere neden olduğu için önemlidir (Nuñez-Delicado ve ark. 2005). Meydana gelen meyve kayıplarının %50'sinden fazlasının enzimatik esmerleşmenin bir sonucu olduğu tahmin edilmekte olup bu prosese en duyarlı ürünlerin tropikal ve subtropikal meyve ve sebzeler olduğu belirlenmiştir (Whitaker ve Lee 1995).

1.4.1. Polifenoloksidazların Substratları

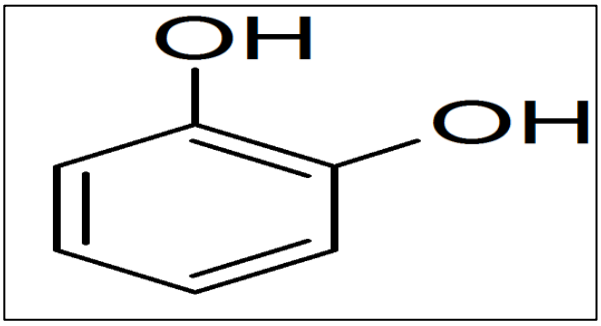
Meyve ve sebzeler çok miktarda fenolik madde içerirler. Bunlardan bazıları polifenoloksidazın substratlarıdır. PFO substratlarından bazıları meyve ve sebzelerde doğal olarak bulunmaktadır. Örneğin, enzimatik esmerleşmeye çok elverişli elma, klorojenik asit, kateşin ve epikateşin bakımından zengindir (Podsedek ve ark. 2000). Polifenoloksidazın sebze ve meyvelerdeki en yaygın doğal substratları, flavonoid tipi fenollerle, basit fenollerdir. Flavonoidler, bitkilerin yenilebilir kısmı ile kök, gövde, yaprak, meyve ve tohum kısımlarında bulunur. Bitkilerin çeşitli bölümlerinde homojen bir şekilde dağılmışlardır. Farklı konsantrasyonlardaki polifenoller, kararma reaksiyonlarının meydana gelmesinde etkilidir. Bunlardan bazıları katekinler, sinamik asitesterleri, 3,4 - dihidroksifenil alenin (DOPA) 3,4-dihidroksifenil etilamin (dopamin) ve tirozindir (Doğan 2002). Fenolik substratlardan her

bitkide bulunan tirozin aynı zamanda proteinlerin yapısını oluşturan aminoasitlerden biridir. Dopamin (3,4-dihidroksifenil etil amin) ve tirozinin PFO ile hidroksilasyon sonucu oluşan L-DOPA (3,4-dihidroksifenil alenin) bitki dokularında mevcuttur. Katekol en basit fenoldür. Hidroksilli B halkasına sahiptir (Şakiroğlu 1994).



Şekil 1.4. Polifenoloksidaz enziminin bazı substratlarının yapısı

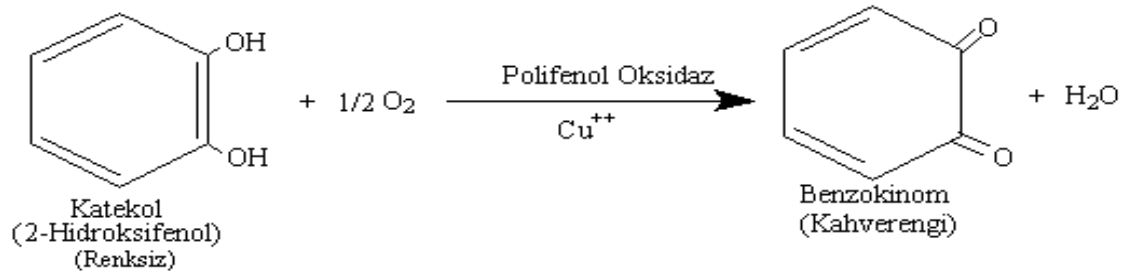
1.4.1.1. Katekol: Bitkilerde doğal olarak bulunan doğal bir fenolik bileşiktir. Kimya endüstrisi ve medikal açıdan geniş bir yelpazede kullanım alanı bulmuştur. Deri ve kürk boyamada, kozmetikte parfümlerde ve saç boyalarında, fotografçılıkta geniş bir kullanım alanına sahiptir. Ayrıca pek çok farmosötigin aktif bileşeni olmakla birlikte önemli antioksidan maddedir (Screeening Assesment for catechol; 2008).



Şekil 1.5. Katekolun genel yapısı

1.4.2. Polifenoloksidazların Katalizlediği Tepkimeler

Polifenol oksidaz enzimi meyve ve sebzelerdeki moleküler oksijen varlığında fenolik bileşikleri yükseltgeyen bir enzimdir. PFO enzimi, moleküler oksijen ile iki tür reaksiyonu katalizler.



Şekil 1.6. Polifenol oksidazın katalizlediği tepkimeler

Hidroksilasyon reaksiyonu: Monofenollerin hidroksilasyonu ile o-dihidroksifenollere yükseltgenmesi (Kresolaz aktivitesi).

Oksidasyon reaksiyonu: o-Dihidroksifenollerin o-kinonlara yükseltgenmesi (Katekolaz aktivitesi) (Valero ve ark.1988).

Meyvelerde bulunan fenolik substratların çoğu dihidroksifenoller olduğundan kararma reaksiyonlarının çoğu polifenoloksidaz enziminin katekolaz aktivitesi sonucu meydana gelmektedir (Zemel 1989).

1.5. Fenolik Bileşiklerin Tayin Yöntemleri

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

1. Kromatografik yöntemler (HPLC, GC, CLC)

2. Spektrofotometrik yöntemler

3. Elektroforez

4. Titrasyon

5. Diğer teknikler

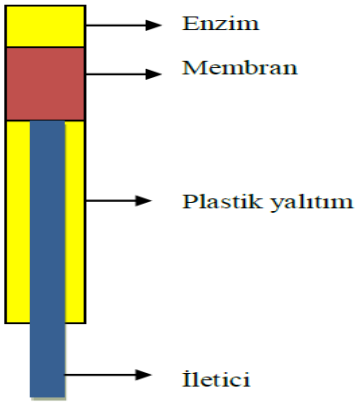
Bu metotlar örneklerdeki fenolik bileşik miktarlarının tespiti pahalı ve uzun zaman alır, ve bazı durumlarda analizin süresini uzatan ön işlemler ya da ekstraksiyon gerektirmektedirler (Mello ve Kubota 2002).

Son zamanlarda geliştirilen ölçüm yöntemlerinden en önemlisi olan biyosensörler diğer geleneksel yöntemlerle kıyaslandığında daha fazla avantaj sağlar. Biyosensörlerde kullanılan biyolojik algılayıcı sistemin seçiciliği, hassasiyeti; örnek ön hazırlığına ve fazla miktarda örneğe bağlı olmaksızın kompleks karışımlarda bile gerçek zamanlı analiz için çok yüksek özgünlükte cihazların gelistirilmesine elverişlidir. Biyosensörler yüksek hassasiyet ve ölçüm hızına sahip

taşınabilir ve çoğaltılabilir analitik cihazlardır. Bundan dolayı son yıllarda örneklerin incelenmesinde biyosensörler tercih edilmeye başlanmıştır.

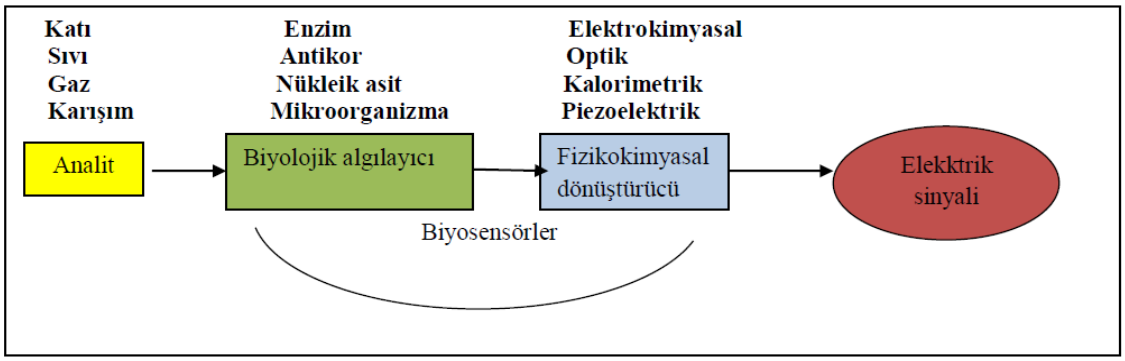
1.6. Biyosensörler

Fiziksel ve kimyasal algılama tekniğinin bir hibridi olan biyosensörler, yakın zamanda açıklanan sensör sınıflarından biridir. IUPAC bugünden sadece on yedi yıl önce bu tür sensörlere tanıma sağlar (Buenger ve ark.2012). Prensip olarak biyosensörler, ortamın biyofiziksel veya biyokimyasal özelliğini yorumlamak için kullanılabilecek reseptör-transdüser bazlı bir araçtır. Ayrıca, bu tip sensörleri diğerlerinden ayıran en ilgi çekici karakter, ortamdaki belirli biyolojik moleküllerin tespit edilmesini sağlayan biyolojik / organik tanıma elementinin varlığıdır (Wang 2016).



Şekil 1.7. Biyosensörlerin şematik gösterimi

Biyosensörler biyolojik bir yanıtı ölçülebilir ve işlenebilir bir sinyale dönüştüren analitik cihazlardır . Genel olarak bir biyosensör 3 kısımdan oluşur. Bu kısımlar, biyoreseptör olarak adlandırılan ve hedef analiti tanıyan bir biyomolekül, bir algılayıcı ve anlamlı sinyal oluşturan elektronik kısımdır (Gonsalves ve ark., 2008). Şekil 1.8'de biyosensörlerde kullanılabilecek bütün bileşenler gösterilmiştir.



Şekil 1.8. Biyosensörlerin bileşenleri

1.6.1. Biyosensörlerin Tarihçesi

Biyosensörlerin tarihi ilk olarak 1950'lerde L.C. Clark'ın Cincinnati Hastanesinde bir ameliyat esnasında kanın O_2 miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlamaktadır (Şekil 1.8). 1962 yılında ise Clark ve Lyons tarafından glukoz oksidaz enzimi oksijen elektrot üzerine bir membran yardımıyla hapsedilerek kandaki glukoz derişimi ölçülmüştür (Telefoncu 1999).

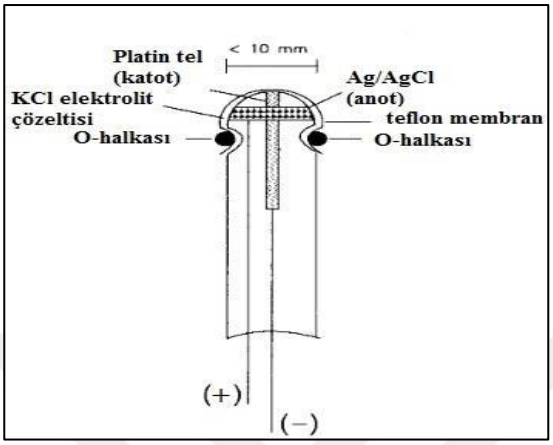
Birçok önemli olay biyosensör araştırmalarının ilerlemesine yardımcı olmuştur. Aşağıda biyosensör keşfi ile ilgili önemli bilimsel olaylar özetlenmektedir.

- 1800'lerde Alessandro Giuseppe Anastasio Volta (1745–1827) modern elektrokimyayla tanışan ilk bilim adamıdır. İki farklı metal arasında meydana gelen temas ile oluşan "metalik elektrik" adını verdiği elektriği bulmuştur. Kimyasal tepkimeden yararlanarak elektrik üreten ilk elektrokimyasal pili geliştirmiştir (Volta 1800).
- 1839'da H_2-O_2 yakıt hücresi sunan Christian Friedrich Schönbein (1799–1868) tarafından yakıt hücresinin prensibi keşfedilmiştir (Schoenbein1839). Yakıt hücrelerinin babası olarak bilinen William Robert Grove (1811–1896) "gaz pili" olarak adlandırdığı ilk yakıt hücresini geliştirmiştir (Grove 1839). Fizikokimya biliminin kurucusu olan Friedrich Wilhelm Ostwald'ın (1853 –1932) yakıt hücrelerine önemli katkıları bulunmuştur (Kunze ve Stimming 2009).
- Walther Nernst (1864 –1941)1889'da Nernst eşitliğini bulmuştur (Nernst 1889).
- Emil Fischer (1852–1919) 1894'te anahtar kilit prensibini ileri sürmüştür (enzim ile substrat arasındaki spesifik bağlanma) (Fischer 1894).
- Leonor Michaelis (1875–1949) ve Maud Leonora Menten (1879–1960) 1913'te enzim kinetiğinin temellerini geliştirmiş ve "Michaelis-Menten kinetiği" olarak bilinen matematiksel bir model önermişlerdir (Michaelis ve Menten 1913).
- Nelson ve Griffin tarafından 1916'da ilk defa proteinlerin immobilizasyonları (aktif kömür üzerine invertaz enziminin adsorpsiyonu) gerçekleştirilmiştir (Nelson ve Griffin 1916).
- Jaroslav Heyrovski (1890–1967) 1922'de elektroanaliz uygulamalarında damlayan civa elektrodunu kullanarak polarografiyi icat etmiştir (Heyrovsỳ 1922, Heyrovsỳ 1923). Jaroslav Heyrovski 1959'da polarografiyi geliştirmesi ile Nobel ödülü almıştır (Heyrovsỳ 1964).
- 1922'de ilk cam pH elektrodu geliştirilmiştir (Telefoncu ve Kılınç 2012).
- 1925'de George E. Briggs ve John B.S. Haldanere Michaelis–Menten eşitliğini değerlendirmişler ve enzim katalizli tepkimeler için durgun-hal davranışı hakkındaki görüşleriyle katkıda bulunmuşlardır (Briggs ve Haldane 1925).

- Otto Warburg (1859–1938) 1926'da sitokrom c oksidazı keşfetmiştir. Bu buluş hücresel solunumun mekanizmasını tanımlamada temel oluşturmuştur (1931'de Nobel Ödülü) (Warburg 2010). Daha sonra Warburg kofaktörleri (NADH) ve dehidrogenaz enzimlerinin mekanizmasını keşfetmiştir. Bu ilerlemeler, Hans-Ulrich Bergmeyer'in (Boehringer Mannheim) 1960 lardaki enzimatik analizlerinin temelini oluşturmuştur (Bergmeyer 1984).
- Erwin Chargaff (1905–2002) 1950'de tüm yaşayan canlılarda timin/adenin, guanin/sitozin oranını bulmuştur ve Chargaff'ın kuralları olarak literatüre geçmiştir (Chargaff ve ark. 1950) .
- James Dewey Watson (1928-) ve Francis Harry Compton Crick (1916–2002) DNA'nın çift helix yapısı için bir model geliştirmişlerdir (Watson ve Crick 1953).
- Frederick Sanger (1918-) 1955'te insülinin iki polipeptit zincirinin amino asit sıralamasını belirlemiştir ve 1958'de proteinlerin yapısı üzerindeki çalışmaları (özellikle insülin) ile Nobel ödülü almıştır (Sanger 1955).
- 1956'da Rudolph A. Marcus, (1923-) Marcus teorisi olarak adlandırılan elektron transfer teorisini ileri sürmüştür ve bu çalışma ile 1992'de Nobel ödülü kazanmıştır (Marcus 1956, Marcus 1993).
- Leland C. Clark Jr. (1918–2005) 1956'da sonradan "Clark elektrodu" adını alan oksijen elektrodu ilgili ilk makalesini yayınlamıştır (Clark 1956). 1962'de Clark ve Ann Lyons Cincinnati Çocuk Hastanesinde ilk glukoz enzim elektrodunu geliştirmişlerdir. Oksijen elektrodu ve üzerinde ince bir glukoz oksidaz katmanı içeren bu biyosensörle, glukoz oksidaz enzimi ile glukoz arasında gerçekleşen tepkime esnasında tüketilen O2 miktarı ölçülmüştür (Clark ve Lyons 1962) . Çalışmaları bilim dünyasında büyük ilgi toplamış ve "biyosensörün babası"olarak anılmasını sağlamıştır.
- 1957' de proteinlerin ilk kristal yapıları aydınlatılmıştır (Kendrew ve Perutz 1957).
- 1959'da R. Sussman Yalow (1921-) ve S. Aaron Berson (1918–1972) radyoimmunolojik tayin yöntemini (RIA) geliştirmişler ve bu yöntem ile insülin gibi hormonların, antijen-antikor tepkimesine dayanan tayinlerinin yapılmasına olanak sağlanmıştır (Berson ve Yalow 2006; Yalow ve Berson 1960). 1997'de Yalow RIA'yı geliştirmesinden dolayı Nobel ödülü almıştır.
- 1964'te Yahiro ve arkadaşları tarafından yapılan glukoz/ O_2 biyoyakıt hücresinde, enzimler ilk defa yakıt hücrelerinde katalizör olarak kullanılmıştır (Yahiro ve ark.1964).
- 1967'de G.P. Hicks ve S.J. Updike tarafından enzim jele immobilize edilerek ilk pratik enzim elektrodu hazırlanmıştır (Updike ve Hicks 1967).

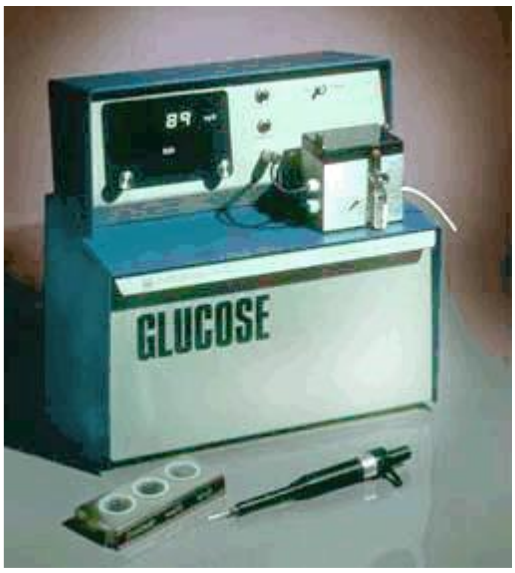
- 1969'da George Guilbault potansiyometrik üre elektrodu geliştirmiştir (Guilbault ve Montalvo 1969).
- 1970'lerde ELISA (Enzimle işaretli immuno reaktiflere dayalı tayin), Stratis Avrameas, G. Barry Peiers ve diğer bilim adamları tarafından ilk defa tanıtılmıştır (Guilien ve ark. 1970; Ternynck ve Avrameas 1976).
- 1973'te G.G. Guiltbault ve G.J.Lubrano, enzimatik tepkime sonucu açığa çıkan hidrojen peroksite duyarlı amperometrik glikoz biyosensörünü tanıtmışlardır (Guilbault ve Lubrano 1973).
- 1975'te ilk ticari biyosensör (YSI Analizörü) piyasaya sunulmuştur (Wang 2008; Wang 2001).
- 1976'da ilk mikrobiyal biyosensörler geliştirilmiştir (Hikuma ve ark. 1980; Riedel ve ark. 1992).
- 1976'da ilk yapay pankreas elde edilmiştir. Glukoz analizörü insülin infüzyon sisteminin kontrolüne olanak sağlamıştır (Nishida ve ark. 2009; Pfeiffer ve ark. 1975) .
- 1977'de Karl Cammann "biyosensor" kavramını ileri sürmüştür (Cammann 1977).
- 1979'da biyoyakıt hücrelerinin ilk adımları atılmıştı (Tarasevich ve ark. 1979) .
- 1979'da J. Kulys redoks medyatörle çalışan biyosensörlere öncülük etmiştir (Kulys ve Svirmickas 1979).
- 1980'ler biyosensör araştırmalarında kendiliğinden düzenlenen tekli katmanlar (SAMs) ilgi çekmeye başlamıştır (Sabatini ve ark. 1987).
- 1981'de ilk defa NADH'ın grafit elektrot yüzeyinde yükseltgenmesi incelenmiştir (Jaegfeldt ve ark. 1981).
- 1982'de ilk deri altına implant edilen iğne tipli enzim elektrot Shichiri tarafından geliştirilmiştir (Shichiri ve ark. 1982).
- 1984'de Cass ve arkadaşları tarafından ilk defa ferrosen medyatörü kullanılarak amperometrik glukoz biyosensörü hazırlanmıştır (Cass ve ark. 1984).
- 1980-1990 yılları arasında C60 ve nanotüpler gibi nanoyapılı karbon materyaller keşfedilmiştir (Monthioux ve Kuznetsov 2006, Kroto ve ark. 1985).
- 1997'de IUPAC ilk defa kemosensörler sınıfında biyosensörlerin tanımını yapmıştır (Thévenot ve ark. 2001).
- 1999'da ilk ticari in vivo glukoz biyosensörü piyasaya sunulmuştur (Gross ve ark. 2000).
- 2000'de giyilebilir noninvazif glukoz ölçüm sistemleri ile tanışılmıştır (Yoo ve Lee 2010).

- 2001'de Arwin tarafından elipsometri temelli biyosensörler geliştirilmiştir (Arwin 2001).
- 2007'de beş gün boyunca ölçüm yapabilen implante glukoz biyosensörleri hazırlanmıştır (Weinstein ve ark. 2007).



Şekil 1.9. Clark'ın oksijen elektrodu (Armstrong 1994)

İlk ticari biyosensör 1975 yılında piyasaya sunulmuştur (Yellow Springs Instruments-Glukoz biyosensörü, (Şekil 1.9). Bu cihaz, ilk biyosensör temelli laboratuvar analizörüdür (Wang 2001) ve ölçüm prensibi, glukoz oksidazın katalizlediği tepkime sonucu oluşan hidrojen peroksitin amperometrik olarak ölçümüne dayanmaktadır.



Şekil 1.10. YSI 23A Glukoz Biyosensorü (Newman ve Turner 2005)

Sonraki yıllarda glikoz tespit cihazlarının taşınır hale getirilmesi ile bireylerin kendi kendilerine glukoz miktarını ölçebilecekleri glukozimetre cihazları piyasaya sunulmuştur ve günümüzde de bu cihazlar sıkça kullanılmaktadır (Şekil 1.10).



Şekil 1.11. Kişişel glukoz ölçüm cihazı, (Newman ve Turner 2005)

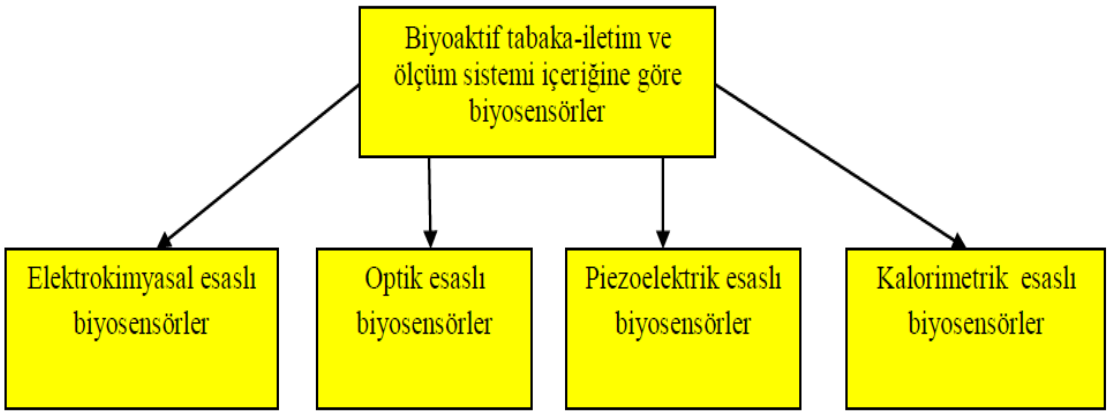
1.6.2. Biyosensörlerin Yapı ve Fonksiyonu

Biyosensörler; biyobileşenler ile fiziksel bileşenlerden meydana getirilirler. Bir biyosensörün hedefi bir veya bir grup analitin (analiz edilecek madde) miktarıyla orantılı olacak şekilde sürekli sayısal elektrik sinyali üretmektir. Biyosensör sistemleri üç temel bileşenden oluşmaktadır. Bunlar; seçici tanıma mekanizmasına sahip "biyoaktif tabaka" / "biyoajan", biyoaktif tabakanın incelenen madde ile etkileşimi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürebilen "sinyal iletici sistem" ve bu sinyalleri ölçebilen bir ölçüm cihazından meydana gelmektedir (Meral ve ark. 2006).

1.6.3. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

1.6.3.1. Biyoaktif Tabaka-İletim ve Ölçüm Sistemi İçeriğine Göre Biyosensörin Sınıflandırılması

Biyoaktif tabaka-iletim ve ölçüm sistemi içeriğine göre biyosensörler Şekil 1.12'de sınıflandırılmıştır.



Şekil 1.12. Biyoaktif tabaka-iletim ve ölçüm sistemi içeriğine göre biyosensörler

- Elektrokimyasal Esaslı Biyosensörler:

Elektron üreten veya tüketen enzimatik katalizin reaksiyonununu temel alan biyosensörlere elektrokimyasal esaslı biyosensörler denir. Bu biyosensörün substratı genel olarak sayaç, referans ve çalışma tipi gibi üç elektrot barındırır.

Elektrokimyasal biyosensörler dört tipte sınıflandırılır

1. Amperometrik Biyosensörler

2. Potansiyometrik Biyosensörler

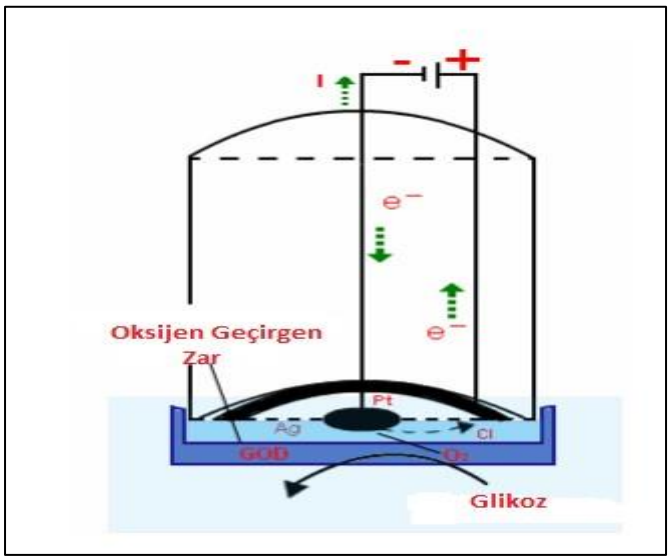
3. Optik Biyosensörler

4. Piezoelektrik Esaslı Biyosensörler

5. Kalorimetrik Biyosensörler

1) Amperometrik Biyosensörler

Belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alan enzim esaslı sensörlerdir.



Şekil 1.13. Amperometrik biyosensörlerin genel yapısı

2) Potansiyometrik Biyosensörler

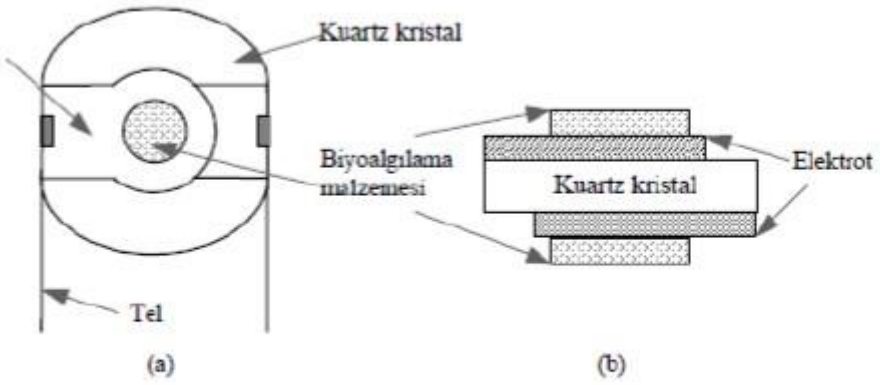
Potansiyometrik biyosensörlerde, analit konsantrasyonuna bağlı olarak referans elektroduna karşı çalışma elektrodundaki gerilim değerini ölçülür (Kuralay ve ark. 2005).

3) Optik Esaslı Biyosensörler:

Optik biyosensör, optik ölçüm prensibi kullanan bir cihazdır. Enzimatik reaksiyon ile oluşan kimyasal veya fizikokimyasal bir etkileşimin ölçülmesine dayanır. Sinyal ise ışık yansıması, saçılımı veya yayımı sonucunda oluşur. (Dindar 2010).

4) Piezoelektrik Esaslı Biyosensörler:

Piezoelektrik enzim sensörlerinde, enzim moleküllerine substratların etkileşmesi nedeniyle kütle artışının piezoelektrik kuartz diskin titreşiminde meydana gelen farklaşmadan hareket edilerek madde miktarı elde edilir (Dindar 2010).



(a) üstten görünüm ve (b) en-kesit görünümü.

Şekil 1.14. Piezoeletrik esaslı biyosensörlerin görünümü (a, b)

5) Kalorimetrik Esaslı Biyosensörler:

Kalorimetri esaslı enzim sensörlerinin (=termal enzim sensörleri) temel prensibi egzoterik reaksiyonlardan yararlanarak reaksiyondaki entalpi değişimi üzerinden substrat yoğunluğunu belirlemektir (Uyar ve ark. 2019).

1.6.3.2. Biyoaktif Tabakada Kullanılan Biyobileşen Türüne Göre Biyosensörlerin Sınıflandırılması

- Biyoajanlar (Biyoaktif tabaka)

Biyoajan biyosensörün biyolojik duyarlılığa sahip kısmıdır. Biyoajanlar yalnızca bir substratı bağlayıp diğerlerine bağlanmayacak yapıda olmalıdır (Mehrvar ve ark. 2000). Biyosensörlerin yapısında biyolojik bileşen olarak enzim, doku ve DNA bulunabilir. Ayrıca bu biyobileşenlerin kullanıldığı biyosensörler dışında mikrobiyal sensörler ve immuno sensörler de bulunmaktadır. Yüksek spesifikliklerinden dolayı enzimler en çok kullanılan biyolojik bileşenlerdir (Lei ve ark. 2005). Doku kesitlerinin ekonomik olması ve rahat elde edilebilmesi, enzimin doğal ortamında bulunması gibi nedenlerden dolayı kullanımı giderek artmaktadır.

a) Enzim Biyosensörleri

Bir enzim biyosensörü, bir hedef enzim konsantrasyonuyla orantılı bir sinyal üretmek için bir enzimi dönüştürücüyle birleştiren analitik bir cihazdır. Bu sinyal, proton konsantrasyonundaki bir değişiklik, amonyak veya oksijen gibi gazların serbest bırakılması veya alımında, ışık emisyonu, absorpsiyon veya yansıma, ısı emisyonu ve benzeri, enzim

tarafından katalizlenen reaksiyonun neden olduğu bir sonucu verebilir. Dönüştürücü bu sinyali akım, potansiyel, sıcaklık değişimi veya ışığın elektrokimyasal, termal veya optik araçlardan emmesi gibi ölçülebilir bir tepkiye dönüştürür. Bu sinyal daha sonra analiz için daha fazla büyütülebilir, işlenebilir veya saklanabilir (Mulchandani 1998).

Pek çok amaç için kullanılan enzim sensörleri araştırmacılar tarafından fenolik bileşik incelenmesi için de kullanılmıştır (Wciso ve ark. 2006, Karakuş ve ark. 2005, Portaccio ve ark. 2006, Zhou ve Zhi 2006).

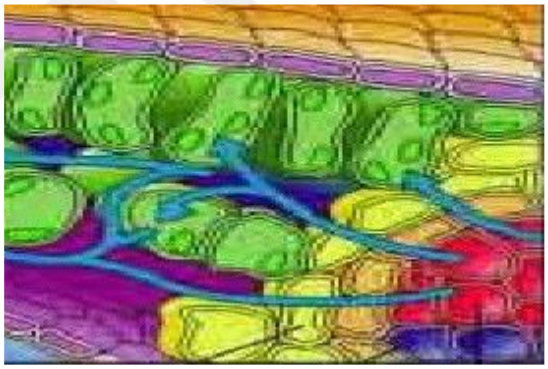
b) Doku Biyosensörleri

Doku bazlı biyosensörler, fizyoloji, farmakoloji ve biyo-savunma gibi alanlarda kullanılmaktadır. Hayvan ve bitkilerden alınan dokular biyosensörlerde biyoalgılama materyalleri olarak kullanılmaktadır. İlk doku temelli sensör ise Rechnitz tarafından arginin tespitinde kullanılmıştır (Rechnitz 1978). Fenolik bileşiklerin tespiti için dokuların kullanıldığı biyosensörler mevcuttur (Portaccio ve ark. 2006, Odacı ve ark. 2004).



(A)

Şekil 1.15. Bitki dokuları (A)



(B)

Şekil 1.16. Bitki dokusu kesiti (B)

c) Mikrobiyal Biyosensörler

Bir mikrobiyal biyosensör, immobilize edilmiş canlı veya canlı olmayan mikrobiyal hücrelerden oluşur. İlk mikrobiyal biyosensör, etanolün tespiti için *Acetobacter xylynum* hücrelerininin kullanıldığı biyosensördür (Davis 1975).Mikroorganizmalar genelde potansiyometrik, amperometrik veya impedans transdüser ile hücre esaslı biyosensör oluşturmak için kullanılır. Hücre esaslı biyosensörler genelde gıda güvenliğinde patojenlerin ve toksinlerin çevresel izleme ve tespitinde BOD ölçümü için geliştirilmişlerdir (Chang ve ark. 2004).

d)İmmunosensörler

İmmünosensörler, afinite bazlı analitik cihazlardır. Bu sensör, bir transdüser yüzeyinde immobilize edilmiş biyolojik tanıma elemanı olarak antijen veya antikor içeren bir immünokimyasal reaksiyona dayanır. İmmünosensörler, yüksek özgüllükleri nedeniyle kanserli moleküllerin, proteinlerin , LDL'lerin, gıda patojenlerinin, bakterilerin ve virüslerin tespitinde önemli bir rol oynamaktadır (Aizawa 2006).

e) DNA Biyosensörleri

Genetik ve bulaşıcı hastalıkların hızlı, basit ve ekonomik olarak test edilmesine yönelik olarak nükleik asit tanıma yöntemlerine dayanan DNA biyosensörleri geliştirilmektedir. Ayrıca, spesifik DNA dizisinin tespiti, klinik, çevresel ve gıda analizi de dahil olmak üzere sayısız alanda önemlidir. Enzim veya antikorların aksine, nükleik asit tanıma katmanları çoklu kullanımlar için kolayca sentezlenebilir ve yeniden üretilebilir. DNA biyosensörleri ve gen çipleri, geleneksel hibridizasyona kıyasla daha hızlı, daha basit ve daha ucuz bir şekilde sekansa özgü bilgi elde etme potansiyelleri nedeniyle büyük ilgi çekmektedir. Ayrıca, yakın gelecekte bu cihazların ticari üretimi ve kapsamlı kullanımı ile birlikte DNA tabanlı sensörlere olan ilginin artması beklenebilir (Kavita 2017).

1.6.4. Biyolojik Bileşenlerin İmmobilizasyonu

Enzimler, dokular, mikroorganizmalar, hücre reseptörleri, antibadiler, nükleik asitler ya da bütün hücre (bakteri, fungus, hayvan ya da bitki); analitlerin belirlenmesinde kullanılan biyoajanlardır. Genel olarak biyoajanlar uygun bir şekilde immobilizasyonla transdusere bağlanır. İmmobilizasyon yöntemi immobilize edilecek biyoajanın yapısına göre tespit edilir. Enzim temelli biyosensör geliştirmede en önemli aşamalardan biri enzimlerin kararlığının korunmasıdır. Bunu sağlamak için enzimler immobilizasyon olarak adlandırılan işlemle katı desteklere sabitlenmelidir. Enzimin elektrot yüzeyine kuvvetli bir şekilde bağlanması ve çalışma süresince aktifliğini koruması biyosensörün başarısını gösterir. İmmobilizasyon tekniğinin yanlış seçimi, biyomoleküllerin konformasyonundaki değişmeye bağlı olarak enzim aktivitesinin bozulmasına yol açar. Bu sebepten, uygun immobilizasyon tekniğinin seçimi pratik olarak kullanılabilen biyosensörlerin yapımı için oldukça önemlidir. İmmobilize biyomoleküller, immobilizasyon işlemi sonrasında biyolojik aktivitelerini korumalı, yüzeye sıkı bir şekilde bağlanmalı, biyosensörün kullanımı sırasında çözeltiye sızmamalı, yapısını ve fonksiyonunu korumalı ve uzun süreli kullanım için kararlılık göstermelidir. Enzim elektrot hazırlanırken sıklıkla kullanılan immobilizasyon yöntemleri, fiziksel adsorpsiyon, tutuklama ve

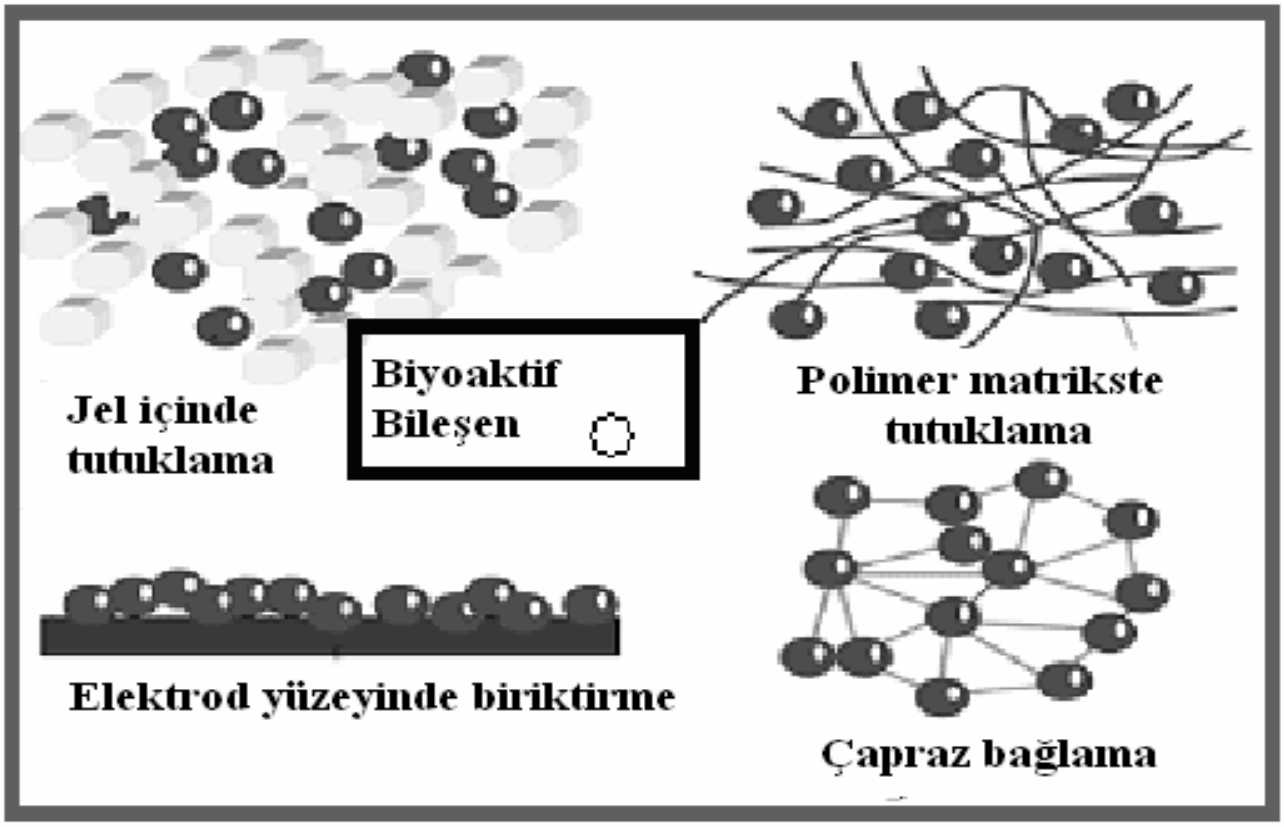
aktivatörler ya da çapraz bağlayıcılar kullanarak kovalent bağlama gibi teknikleri içerir (Arya ve ark. 2008).

1-Adsorbsiyon: Fiziksel adsorpsiyon yöntemi, enzimin immobilizasyonu için en kolay yöntemdir ve matriks yüzeyine enzimlerin doğrudan adsorpsiyonu üzerine temellenmektedir. Bu yöntem iyonik, Van der Waals kuvvetleri ile ve hidrofobik kuvvetler ile bağlamayı içerir. Bu yöntem ilk olarak beta-D-frukto-furanosidaz enziminin alüminyum hidroksit üzerine immobilizasyonunda kullanılmıştır. Doğrudan adsopsiyonun başlıca avantajı basit olması ve ılımlı koşullar altında kullanılabilmesidir. Bu yöntem enzimin konformasyonunda veya aktif merkezinde çok az değişikliğe neden olur veya hiç bir değişikliğe yol açmaz. Bununla beraber, yöntem, adsorbe olmuş enzimin, sıcaklık, pH ve iyonik şiddetdeki değişikliğe bağlı olarak matriksten uzaklaşması gibi dezavantajlara sahiptir (Arya ve ark. 2008).

2-Tutuklama: Biyosensör yapımında, tutuklama yöntemi sıklıkla kullanılmakta ve bir polimer veya membran matriks içine enzim yerleştirilmesi üzerine temellenmektedir. Bu yöntem, substratın yüzeye tutunmasını sağlarken, enzimin tutuklandığı yerde kalmasını da sağlamalıdır. Biyomoleküllerin tutuklanması, polimerin ve biyomoleküllerin tabaka üzeri tabaka biriktirilmesi ile ya da enzim içeren monomer çözeltisinden polimerin elektrokimyasal polimerizasyonu ile de elde edilebilir (Arya ve ark. 2008).

3-Çapraz bağlama: Bu yöntemde, biyomateryal kimyasal olarak katı desteklere veya bir jel gibi başka bir destekleyici maddeye bağlanır. Glutaraldehit gibi çok fonksiyonlu reaktifler kullanılır. Yine bazı difüzyon sınırlamaları vardır ve biyomateryale zararı olabilir. Ayrıca mekanik dayanım zayıftır. Adsorbe edilmiş biyomateryali stabilize etmek için yararlı bir yöntemdir (Eggins 1996).

4-Kovalent bağlama: Biyomoleküllerin yüzeye kovalent bağlanması, enzimin fonksiyonel grubunun ve matriksin bağlanması üzerine temellenmektedir. Bu yöntem, tekrarlanabilirliği geliştirmek kadar bağlı enzimlerin miktarını da ayarlamak için kullanılmaktadır. Kovalent bağlanma ile immobilizasyon koşulları daha karışıktır ve enzimin konformasyonel yapısını ve aktif bölgesini değiştirdiğinden, fiziksel adsorpsiyona ve tutuklamaya göre daha az ılımlıdır. Bununla beraber bu yöntem, tutuklama ya da adsopsiyon tekniklerinde görülen enzimlerin kararsızlığı ve difüzyonu gibi sorunları ortadan kaldırabilir. Katalitik aktivite için gerekli olmayan fonksiyonel gruplar enzim destek matrisine kovalent olarak bağlanabilir (dönüştürücü veya membran). Bu yöntem, birleşme için NH_2 COOH, OH, C_6H_5OH, SH (tiyol grubu) ve imidazol gibi nükleofilik gruplar kullanır.



Şekil 1.17. İmmobilizasyonunda kullanılan teknikler
(sci.ege.edu.tr/~eubio/yaz_okulu/biosensor.htm)

Çizelge 1.1. İmmobilizasyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları

YÖNTEM	AVANTAJLARI	DEZAVANTAJLARI
Adsorpsiyon	Enzim modifikasyona uğramaz. Düşük maliyetlidir. Basit bir yöntemdir. Tersinirdir Çeşitli yüklü taşıyıcıları seçebilir.	pH, sıcaklık ve iyonik şiddetteki değişikliklere hassastır. Enzim ile destek maddeleri arasındaki zayıf bağlardan dolayı adsorblanan enzim kullanım esnasında taşıyıcan uzaklaşabilir
Tutuklama	Enzim transdusere yakındır. Düşük maliyetlidir. Kararlılığı yüksektir.	Yüksek difüzyon barıyeri görülür. Enzim aktifliği düşüktür.
Çapraz Bağlama	Tek bir işlemde enzimleri immobilize etmek için iki ya da çok fonksiyonlu maddeler kullanılabilir. Yüksek kararlılıktadır.	Genel uygulanabilirliği düşüktür.
Kovalent Bağlama	Düşük difüzyon direncine sahiptir Olumsuz şartlar altında bile kararlıdır. Enzim aktifliği yüksektir.	Toksik kimyasallar ile enzimin muamelesi söz konusudur. Matriks yenilenmez. İmmobilizasyon maliyeti yüksektir

1.6.5. Jelatin

Jelatin , doğal kolajenin kısmi hidrolizi ile üretilen bir protein türüdür . Kullanılan işleme bağlı olarak, genellikle A tipi (asit hidrolizi) ve B tipi (alkalin hidrolizi) olmak üzere iki tip jelatin elde edilir. Jelatin, kendine özgü kimyasal ve fiziksel doğası nedeniyle, bir ilaç

taşıyıcı madde olarak kullanılmıştır. Ek olarak, jelatin matris metaloproteinazlarının (MMP'ler) biyolojik olarak uyumlu ve immünojenik olmayan bir substratıdır. Kitosan konjüge jelatin, poli (DL-laktid) -traftlanmış jelatin, PEG-modifiye jelatin ve tiolu jelatinin türevleri, geniş farmasötik uygulamalarla bildirilen jelatin türevlerinden bazılarıdır. Jelatin-DNa nanosferleri ayrıca güçlü bir gen dağıtım aracı olarak rapor edilmiştir. Desolvasyon, koaservasyon ve yağda su (W / O) emülsiyonu jelatin nanoparçacıkların hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan tekniklerden birkaçıdır (Narayanaswamy ve ark. 2016). İmmobilizasyonda çoğunlukla çapraz bağlayıcı ajan, bir reaktif olan glutaraldehid ile beraber kullanılır (Scardi 1987, Esposito ve ark. 1995).

1.6.6. Glutaraldehit

Glutaraldehit (GA), amino asitlerin serbest primer amin grupları için yüksek afiniteye sahip bir dialdehit olan, yaygın olarak bilinen bir çapraz bağlayıcıdır (Cheung ve ark. 1985)



Şekil 1.18. Glutaraldehit'in yapısı

1.6.7. İdeal Bir Biyosensörde İstenilen Özellikler

Elektrokimyasal, optik ve diğer biyosensör türlerini en uygun bir biçimde dizayn edebilmek için, ölçüm sisteminin bir takım temel fiziksel özelliklere sahip olması gerekmektedir. İdeal bir biyosensörün bulundurması gereken bu özellikler ve tipik davranışlar aşağıda sıralanmaktadır (Buerk 1993).

Seçicilik:

İdeal bir biyosensörde aranan özelliklerden biri de seçiciliktir. Geliştirilen biyosensör sadece hedef analite özgünlük göstermelidir. Tayin aralığının da seçimlilik üzerinde bir etkisi söz konusudur.

Kullanım Ömrü:

Bir biyosensörde kullanılan biyolojik materyaller genellikle sistemlerin kararlılığı en az olan bileşenleridir. Biyosensörlerin önemli bir özelliği normal operasyonel şartlar altında hassas kaldıkları süredir. Kullanım ömrü, yapılan toplam ölçüm sayısına bağlı olabilir veya ölçülen analit konsantrasyonlarının büyüklüğüne bağlı olabilir. Yüksek konsantrasyonlar hassasiyette daha hızlı kayıplara sebep olabilmektedir.

Kalibrasyon Gereksinmesi:

Kalibrasyon grafiği, bir denge akımına göre düzeltilmiş kararlı hal cevaplarının ölçülmesi ve analit derişimine veya logaritmasına karşı grafiğe geçirilmesi ile çizilir. Kalibrasyon grafiğinde substrat derişimi ile biyosensör cevabı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu derişim aralığına doğrusal çalışma aralığı adı verilir. İdeal bir biyosensörün kalibrasyona ihtiyacının olmaması ya da en az miktarda ihtiyaç duyması istenir. Ama bu istek uygulamada gerçekleştirilememiştir. Biyosensör yanıtını etkileyen parametrelerin sensör kalibrasyonunu etkileyeceği unutulmamalıdır. Kullanım ömürleri süresince biyosensörler, çoğunlukla kalibre edilmelidirler (Kılınç 1996).

Tekrarlanabilirlik:

Tekrarlanabilirlik, biyosensörün kopyalanmış bir deneysel kurulum için özdeş cevaplar üretme kabiliyetidir. Tekrarlanabilirlik, bir biyosensördeki dönüştürücünün ve elektronik aksamın hassaslığı ve doğruluğu ile karakterize edilir. Kesinlik, bir numunenin her ölçülüşünde sensörün aynı sonuçları verebilme kabiliyetidir ve doğruluk, bir numunenin bir kereden fazla ölçülmesi durumunda, sensörün gerçek değere yakın bir ortalama değer sağlama kapasitesini gösterir. Tekrarlanabilir sinyaller, bir biyosensörün tepkisi üzerine yapılan çıkarımlara yüksek güvenilirlik ve sağlamlık sağlar (Estrela ve ark.2016).

Stabilite:

Stabilite, biyosensensör sisteminin içindeki ve çevresindeki ortam bozulmalarına karşı duyarlılık derecesidir. Bu bozukluklar, ölçülen bir biyosensörün çıkış sinyallerinde kaymaya neden olabilir. Bu, ölçülen konsantrasyonda bir hataya neden olabilir ve biyosensörün kesinliğini ve hassasiyetini etkileyebilir. Stabilite, bir biyosensörün uzun inkübasyon adımları veya sürekli izleme gerektirdiği uygulamalarda en önemli özelliktir. Transdüserlerin ve elektroniklerin tepkisi, bir biyosensörün dengesini etkileyebilecek sıcaklığa duyarlı olabilir. Bu nedenle, sensörün sabit bir yanıt vermesini sağlamak için uygun elektronik ayarlama gereklidir. Stabiliteyi etkileyebilecek bir diğer faktör, analjenin biyoreseptöre bağlanma derecesi olan biyorekeptörün afinitesidir. Yüksek afiniteye sahip biyoreseptörler, güçlü elektrostatik bağlanmayı veya bir biyosensörün dengesini güçlendiren analitin kovalent bağlanmasını teşvik eder. Bir ölçümün stabilitesini etkileyen bir diğer faktör, biyoreseptörün bir süre boyunca bozulmasıdır (Estrela ve ark. 2016).

Yüksek duyarlılık:

Duyarlılık, genellikle analit derişimindeki değişime (ΔD) bağlı olarak biyosensör cevabında meydana gelen değişimin (ΔC) ölçüsü olarak (ΔC/ΔD) tanımlanmaktadır . Başka bir ifade ile duyarlılık, biyosensörün ne kadar küçük bir değişimi ölçebildiğinin ölçüsüdür. Aynı analit derişimine karşılık ne kadar büyük yanıt elde edilirse duyarlılığın o kadar iyi olduğu bilinmektedir. Duyarlılık akım-derişim eğrisinin eğimi ile orantılıdır yani eğim değeri büyüdükçe duyarlılık da artmaktadır (Buerk 1993, Dursun 2009, Telefoncu ve Kılınç 2012).

Hedef analite yönelik olarak hazırlanan bir biyosensörün etkin duyarlılığını belirleyen pek çok etken vardır. Bunlar; sensörün fiziksel boyutu, membran kalınlığı, örnekten algılayıcı bölgeye kimyasal türlerin kütle transferi ve biyosensörün aktivitesini düşüren çeşitli işlemlerdir. İdeal olarak, bir biyosensörün duyarlılığı kullanım ömrü boyunca değişmemeli ve dönüştürücünün çıkış sinyalinin belirlenebilmesine yetecek kadar yüksek olmalıdır (Coulet 1991).

Geniş ölçüm aralığı:

Belli bir derişimde standart çözelti ilavesinden sonra ortam kararlılığının bozulması, enzim aktivitesinin azalması, elektrot yüzeyinin oluşan bazı radikallerle dolması gibi nedenlerle biyosensör cevabı azalır ve ileriki derişimlerde eklemelerden sonra biyosensör cevabı gözlenmez. Kalibrasyon grafiğinde analit derişimiyle sensör yanıtı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu bölgeye "doğrusal aralık" adı verilir. Doğru ölçümün yapılabilmesi için biyosensör cevabının doğrusal eğilim gösterdiği doğrusal bölgeyi tanımlamak gereklidir. Biyosensör için ölçüm aralığı tanımlanan bu doğrusal aralıktır. Doğrusal aralığın geniş olması biyosensör için avantajdır (Dursun 2009, Telefoncu ve Kılınç 2012).

Hızlı cevap zamanı:

Bir biyosensör ile pratik bir işlem sonucunda kısa sürede sonuç alınabilmesi biyosensörlerin hızla yaygınlaşmasını sağlamıştır. Fazla sayıda örneğin söz konusu olduğu sıradan incelemelerde olası en az ön işlemle en kısa zamanda alınan sonuç büyük önem arz etmektedir (Telefoncu ve Kılınç 2012).

Basitlik ve ucuzluk:

Kullanımı, tasarımı basit ve ucuz biyosensörler tasarlamak biyosensör yapımında oldukça önemlidir. Biyosensörün hazırlanması aşamasında oluşan giderlerle biyosensörle yapılan ölçümün giderinin toplamına genelde maliyet denir. Hazırlanma giderlerinin az olması halinde genel olarak her incelemede gider miktarı azalacaktır (Telefoncu ve Kılınç 2012). Bu sebeple ilk biyosensörlerdeki kompleks ve maliyetli kısımlar daha sonra basitleştirilmiş ve

olabildiğince maliyeti düşürülmüştür. Buna, ikinci kuşak biyosensörlerin yapılarında bulunan medyatörlerin daha gelişmiş modeller olan üçüncü kuşak biyosensörlerde ortadan kaldırılması örnek olarak verilebilir (Kılınç 1996).

Sterilize edilebilirlik ve küçültülebilirlik :

Elektrotlarının sterilize edilebilmesi ve boyutlarının küçültülmesi biyosensör tasarımında büyük önem taşımaktadır. Bununla beraber, biyosensör elektrotlarının yapısına giren biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, sterilizasyonu kısıtlayan en önemli kriterdir (Hall 1990, Yardım 2009). Enzim tabakasının koruyucu bir membran tabakasıyla kaplanmasıyla sterilizasyon yapılabilmektedir (Ammon ve ark.1995).

Biyouyumluluk

Biyouyumluluk, akut izleme ve uzun süreli implantasyon gibi tıbbi uygulamalarda kullanılan biyosensörlerde aranan en önemli özelliktir. Bu cihazlar, çeşitli organların dokularına uygulandığında istenmeyen inflamatuar yanıtlar ve fibröz dokular oluşturabilir. Bu anlamda daha iyi biyouyumluluk gösterebilen biyomateryallerin geliştirilmesi araştırmaların büyük bir kısmını oluşturmaktadır (Buerk 1993). Ayrıca biyolojik sıvılarla direkt temas halinde olan biyosensörlerin yüzeyinde oluşabilecek matriks etkisinden kaynaklanan kirlilik, immobilize biyotabakaya substratın difüzyonu zorlaştıracağından cevabın yanlış olmasına neden olabilmektedir (Telefoncu 1999).

1.6.8. Biyosensör Teknolojisinin Avantaj ve Dezavantajları

Biyosensörün avantajları aşağıdaki gibi sıralanabilir (Koyun ve ark. 2012,Telefoncu ve Kılınç 2012):

- ✓ Pratik,
- ✓ Cevap zamanı kısa,
- ✓ Hızlı,
- ✓ Sürekli ölçüm olanağı,
- ✓ Biyoalgılayıcı bileşenlerinden dolayı yüksek seçicilik özelliği,
- ✓ Diğer cihazlarda ölçülemeyen nonpolar molekülleri ölçme,
- ✓ Ucuz,
- ✓ Basit,

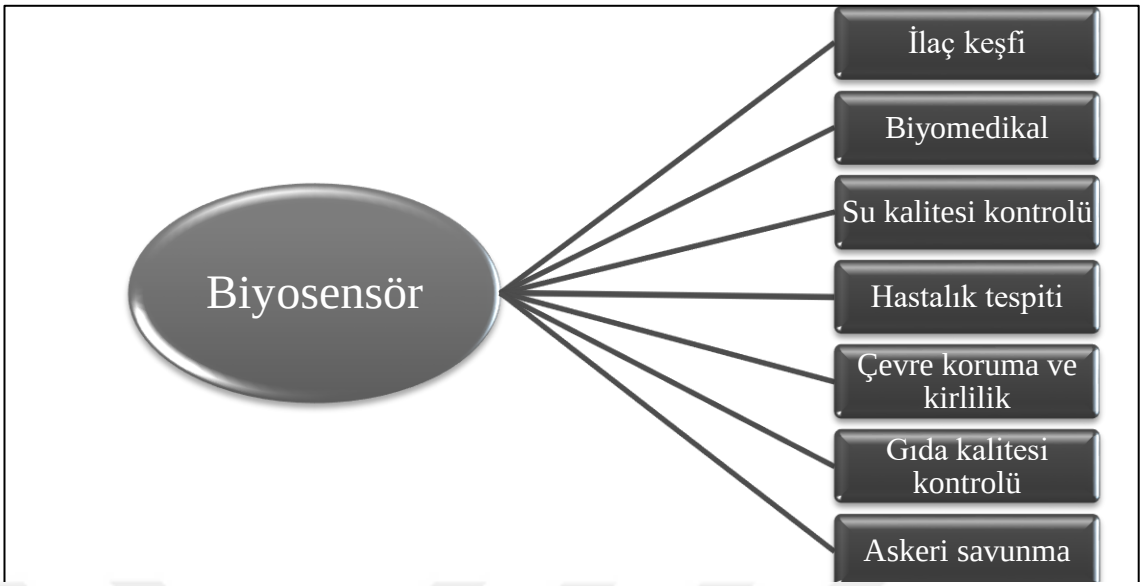
- ✓ Analiz öncesi numunelere ön işlem gerektirmeme,
- ✓ Düşük analit derişimlerini tayin etme,
- ✓ Minyatürizasyona uygun,
- ✓ Renkli ve bulanık çözeltilerde geniş bir derişim aralığında direkt ölçüm,
- ✓ Rutin analizlerde kişinin kendi kendine ölçüm yapabilme olanağı,
- ✓ Türüne göre kullanıp atılabilir olması,
- ✓ Aynı anda birden fazla analit derişimini ölçme,
- ✓ Düşük numune hacmi,
- ✓ Üretiminin kolay olmasıdır.

Biyosensörlerin dezavantajları aşağıdaki gibi sıralanabilir (Telefoncu 1999, Koyun ve ark. 2012, Telefoncu ve Kılınç 2012):

- ✓ Biyolojik materyalin denatürasyonundan dolayı ısı ile sterilizasyonun mümkün olmaması,
- ✓ Biyolojik materyalin (enzim, hücre, antikor, doku, vb.) kararlılığının ortam şartlarından (pH, sıcaklık, iyonlar, vb.) etkilenmesi,
- ✓ Biyosensördeki hücrelerin, membran yüzeyine difüzlenebilen diğer moleküller tarafından zehirlenebilmeleri,
- ✓ Biyouyumluluk sorunlarıdır.

1.6.9. Biyosensör Türleri ve Uygulama Alanları

Biyosensörler canlıyı ilgilendiren birçok alanda kullanılmaktadır. Örneğin; tarım, tıp (temel ve klinik tıpta biyoaktif maddelerin tanı, tayin ve izlenmesi) gıda (üretimin kontrolü ve ürün analizi), hayvancılık, kalite kontrol, endüstri, çevre koruma (çevre kirliliği analizi ve kontrolünde), atık kontrolü ve askeri uygulamalar gibi alanlarda kullanılmaktadır (Şekil 8).



Şekil 1.19. Biyosensörlerin genel kullanım alanları

Gelişmiş teknolojiler biyosensörlere uygulandıkça biyosensörlerin gıda, tarım ve çevre alanlarında, biyolojik ve kimyasal etken maddelerin hızlı, duyarlı, ucuz, sahada, çevrim içi ve gerçek zamanlı belirlenmesi sağlanacaktır.

a) Gıda Alanındaki Uygulamaları

Besin maddelerinin biyolojik ve kimyasal kirleticiler açısından hızlı taranması, gıda kalitesi ve güvenliği büyük önem taşımaktadır. Gıda kalitesinin ve güvenliğinin sağlanması ve bunun sonucunda insan sağlığının kontrol sistemlerinin geliştirilmesi için çaba sarf edilmektedir.

Biyosensörler gıda alanında; gıdaların üretimi, paketlenmesiyle satışa çıkarılmasında kalite ve kontaminasyon kontrolleri amacıyla kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde başta glikoz olmak üzere, monosakkaritler, amino asitler, organik asitler (laktik asit), üre ve alkol tespiti için enzim sensörleri tercih edilmektedir. Aynı zamanda gıdalarda bulunan yabancı maddelerin tayini için de biyosensörlerden yararlanılmaktadır. Günümüzde yaygın olarak kullanılan gıda katkı maddelerinden tatlandırıcılar, diş çürüğü, kardiyovasküler hastalıklar, obezite ve Tip-2 diyabet gibi istenmeyen hastalıklara neden olurlar. Bu nedenle tatlandırıcıların tespit edilmesi için biyosensörler kullanılmaktadır. Antioksidanlar, besin maddelerinde işleme sırasında ortaya çıkan oksidasyon olayını önleyerek besini koruyan ana bileşenlerdendir. Bunun için gıdalara farklı antioksidanlar eklenir. Amperometrik biyosensörler gıda ürünlerindeki bu antioksidanların belirlenmesi için kullanılırlar. Ayrıca gıdalardaki patojenlerin saptanması için kullanılan biyosensörler de vardır. Bazı ticari biyosensörlerden, et ve balık ürünlerinin tazeliğini tespit için yararlanılmıştır. Tespit için biyosensörlerin kullanılması avantaj sağlar. Biyosensörler sayesinde tespit kısa sürede, hassas ölçümlerle ve daha ucuz bir şekilde yapılır.

Karbonhidrat, alkol ve asit ölçümü için biyosensörler piyasada bulunmaktadır. Bu aletler çoğunlukla kalite güvence laboratuvarlarında veya enjeksiyon analiz sistemi yoluyla bir akış üzerinden işlem hattına bağlı çevrimiçi olarak kullanılırlar. Uygulama sıraları sterilite ihtiyacı, analit seyreltme, sık kalibrasyon ihtiyacı vb. ile sınırlıdır. Gıda kalitesi kontrolünde enzim bazlı biyosensörlerin potansiyel uygulamaları amino asitlerin, aminlerin, amitlerin, heterosiklik bileşiklerin, karbonhidratların, karboksilik asitlerin,gazların, kofaktörlerin, inorganik iyonlar, alkoller ve fenollerin ölçümünü içerir (Despande ve Rocco 1994). Biyosensörler, şarap birası, yoğurt ve yumuşak içecek üretimi gibi endüstrilerde kullanılabilir. İmmünosensörler taze et, kümes hayvanları veya balıktaki patojenik organizmaları tespit ederek gıda güvenliğini sağlamada önemli potansiyele sahiptir (Kress-Rogers 1998).

b) Tarım Alanındaki Uygulamalar

Tarımda, biyosensörler, ürün ve toprakta kirleticilerin analizlerinde, bitkisel ürün ve canlı hayvanlarda hastalık tespitinde kullanılmaktadırlar. Bu alanda değişik özellikler barındıran biyosensörler, tarımda kullanılan haşere mücadele ilaçları, yabancı bitki mücadele ilaçları ve mantarla mücadele ilaçlarının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Enzim biyosensörleri, pestisitlerden gelen karbamatlar ve organofosfatların izlerini saptamak için kullanılır. Seçici ve hassas mikrobiyal sensörler metan çalışılmıştır. Bununla birlikte, yalnızca ticari olarak temin edilebilen kolajen veya poliakrilamid içerisinde immobilize biyosensörler atık sudaki biyolojik oksijen ihtiyacı (BOD) kontrol eder (Wittman ve ark. 1997).

c) Çevre Alanındaki Uygulamalar

Sulardaki çevresel atıklar, pestisitler, antibiyotik kalıntıları, mikroorganizmalar ve toksinleri çevrede belirgin bir şekilde bulunmalarından dolayı, en önemli çevresel kirleticiler arasındadır. Biyosensörler, bu çevresel kirleticileri tespit amacıyla kullanılmaktadır. Örneğin, nitrit ve nitrat sensörleri kullanarak denizcilikte ötrofikasyonun tespiti ve ribozomal RNA probları kullanılarak zehirli alglerin tespiti yapılmaktadır. Çevre kirliliğinin kontrolünde en çok mikrobiyal sensörler ve enzim sensörleri kullanılmaktadır.

d) Tıptaki Uygulamalar

Tıp alanında biyosensörler oldukça fazla kullanılmaktadır. Şeker hastalığıi kanser, tüberküloz, hepatit gibi birçok hastalığın teşhisinde biyosensör teknolojisi kullanılır. Örneğin, diyabet hastalığının teşhisi ve takibi için kanda ve idrarda glikoz tespitine yönelik enzim temelli biyosensörler kullanılmaktadır. Bulaşıcı hastalıkları teşhis etmede, vücutta bulunan zehirli, uyuşturucu maddelerin veya yüksek dozajdaki ilaçların teşhis edilmesinde, yoğun bakım ünitelerinde veya ameliyatlarda ilaçların miktarını düzenlemek amacıyla ilacın kandaki

konstrasyonunun anlık olarak takip edilmesinde de biyosensörlerden yararlanılmaktadır. Sensörler ile vücuttaki glikoz dışında üre gibi biyolojik ürünlerin, kanserlerin takibi ve mikrobiyal ajanların belirlenmesi için de çoğunlukla kullanılmaktadır (D'Souza 1999, Polat 2010).



Şekil 1.20. Gebelik testi

e) Askeri savunmada biyosensörler

Biyosensörler biyolojik saldırı zamanlarında askeri amaçlar için kullanılabilir. Bu tür biyosensörlerin temel amacı, gerçek zamanlı olarak biyolojik savaş ajanları (BWA'lar), yani bakteriler (vejetatif ve sporlar), toksinler ve virüsler olarak adlandırılan ve gerçek zamanlı olarak tehdit teşkil eden organizmaları hassas ve seçici bir şekilde belirlemek. Bu tür biyosensörleri cihazlamak için BWA'ların kimyasal markörlerini tanıyabilen moleküler teknikler kullanılarak birkaç girişimde bulunuldu.

Nükleik asit bazlı algılama sistemleri, gerekli seviyelerde tespit hassasiyetine ulaşmak için amplifikasyon adımlarını kullanmadan gen bazlı spesifiklik sağladıklarından, antikor bazlı tespit yöntemlerinden daha hassastır.

İnsan papilloma virüsü HPV (çift sarmallı DNA virüsü) iki türe ayrılmıştır: HPV 16 ve 18; ve invaziv rahim ağzı kanseri ile ilgilidir. HPV'ler, çift iki portlu rezonatörlere sahip yeni bir sızdıran yüzey akustik dalga peptidi nükleik asit biyosensörü kullanılarak hızlı bir şekilde tespit edilebilir. Bu prob, HPV genomik DNA'sını polimeraz zincir reaksiyonu amplifikasyonu olmadan doğrudan algılar ve ayrıca hedef DNA sekanslarına çok etkinlik ve hassasiyetle bağlanabilir (Mehrotra 2016).

1.7. Çalışmada Kullanılan Biyoaktif Bileşenler

1.7.1. Mısır Bitkisi (*Zea mays)*

Alem : Plantae (Bitkiler)

Bölüm: Magnoliophyta (Kapalı Tohumlular)

Sınıf: Liliopsida (Bir Çenekliler)

Takım: Poales

Familya: Poaceae (Buğdaygiller)

Cins: *Zea*

Tür: *Zea mays*

Alt türler

Mısır (*Zea mays)* dünyada önemli bir tahıl ürünüdür. Mısır taneleri hasat edilmiş bir ürün ve iyi bir besin ve biyoaktif bileşik kaynağıdır. Yiyecek, hayvan yemi ve biyo-yakıt için bir hammadde olarak kullanılır. Mısır üretiminden yan ürünlerin kullanımı mısır üretim verimliliğini artırabilecek zorlu bir araştırma alanıdır. Dahası, mısır üretiminden elde edilen atıklar mısır ipliğinde flavonoidler ve antosiyaninler (Sarepoua ve ark. 2015), mısır kabuğundaki antosiyaninler (Li ve ark. 2008), mısır kabuğu, koçanı ve ipekindeki fenolik bileşikleri ve flavonoidleri (Dong ve ark. 2014), mısır kabuğu, koçanı, ipek ve polende fenolik bileşikler ve antosiyaninler (Thapphasaphong ve ark. 2016) gibi iyi bir fitokimyasallar kaynağıdır. Bu fitokimyasallar doğal pigmentlerdir. Bitki kısımlarında ve sağlığa faydalı antioksidanlar olarak işlev görürler. Onların sağlığa yararları, anti-apoptoz, anti-aging, anti-kanserojen, anti-inflamasyon, anti-ateroskleroz ve kardiyovasküler korumayı içerir (Han ve ark. 2007).

1.7.2. Mısır Püskülü

Mısır bitkisinin dişi çiçekler (koçan püskülü) kısmıdır. Yaklaşık 2 metre uzunluğunda, kökü kalın ve sacaklı yaprakları şerit gibi uzun, sert ve sivri bir bitki olan mısırın meyvelerinin ucundaki saçaklardır. Mısır püskülünün doğrudan toplanması, endüstriyel kullanım için uygun bir yöntemdir ve mısır üretiminden elde edilen atıklar değerli ürünlere dönüştürüldüğü için mısır üretim verimliliğini arttırıyor çünkü mısır püskülü, yüksek toplam fenolik içeriğe ve antioksidan aktiviteye sahiptir (Mohsen ve Ammar 2009). Mısır püskülünde glume, anter ve polen tanelerindeki pigmentasyonlar fitokimyasalların önemli kaynaklarıdır. Ancak, püskül mimarisi ve gelişme aşaması üretim alanı başına fitokimyasal verimi etkiler.



Şekil 1.21. Mısır püskülü

1.7.3. Biber (*Capsicum annuum* L.)

Biber, beslenmede önemli yeri bulunan yazlık sebzelerdendir. Özellikle C vitamini açısından hayli zengin olup, kalori değeri düşüktür. İçeriğinde bulunan capcaicin maddesinin oranına göre meydana gelen acılığın iştah artırıcı özelliği vardır. Turşu, salça, közleme ve biber suyu için sanayiye yönelik tüketiminden başka taze ve kuru tüketimi, yemek olarak değerlendirilmesi ve acı pul biber şeklinde tüketimi söz konusudur. Biberin dünyada, 1.5 milyon hektar alanda, 24 milyon ton üretiminin yapıldığı belirtilmektedir (Anonim 2005a).



Şekil 1.22. Biber Tohumu

1.7.4. *Pseudomonas putida*

1.7.4.1. Sınıflandırılması

Alem: Bacteria

Bölüm: Proteobacteria

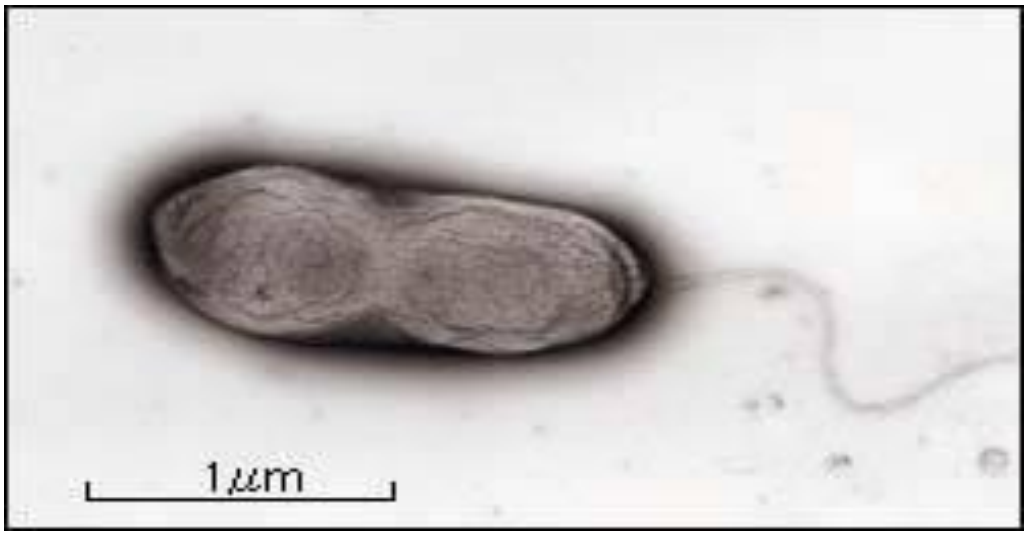
Sınıf: Gamma proteobacteria

Takım: Pseudomonadales

Family: Pseudomonadaceae

Cins: *Pseudomonas*

Tür: *Pseudomonas putida*



Şekil 1.23. *Pseudomonas putida* (wishartlab 2019)

1.7.4.2. Tanımı ve önemi

Pseudomonas putida, oksijen bulunan çoğu toprak ve su habitatında bulunan, çubuk şeklinde, kıvrımlı, gram negatif bir bakteridir. 25-30 ° C de optimal büyür ve kolayca izole edilebilir. *Pseudomonas putida*, bitki ve bakteri arasında karşılıklı bir ilişki bulunan bitki köklerini kolonize eden bir soy olan KT2440 dahil çeşitli türlere sahiptir. Kökün yüzeyi, rizosfer, bakterilerin kök besinlerinden gelişmesini sağlar. Buna karşılık, *Pseudomonas putida* bitki büyümesini indükler ve bitkileri patojenlerden korur (Espinosa-Urgel ve ark. 2000).

Pseudomonas putida, toluen gibi organik çözücüleri parçalayabilen ve ayrıca stiren yağını biyobozunur plastik Polihidroksialkanatlara (PHA) dönüştürebilen çok çeşitli bir aerobik metabolizmaya sahiptir. Bu, biyobozunur olmadığı düşünülen polistiren köpüğün bozulmasına yardımcı olur. Bakterilerin organik kirleticilere karşı güçlü iştahları nedeniyle araştırmacılar,

Pseudomonas putida'yı "bakteri ile ıslah edilmiş toprak süreçleri araştırmaları için laboratuvar" olarak adlandırılan bir "laboratuvar" olarak kullanmaya başlamıştır (Kowalski 2002). Bu bakteri eşsizdir, çünkü yakıt, kömür, tütün ve diğer organik maddelerin yanmasından kaynaklanan tehlikeli kimyasallar olan aromatik veya alifatik hidrokarbonların parçalanmasında en fazla gen vardır. Biyoremediasyondaki güçlü etkisi vardır (Marcus 2003).

Biyoremediasyona yardım etmenin yanı sıra, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas* cinsinde, özellikle insanlarda önde gelen ölümcül hastalıklara sebep olan patojenik bir bakteri olan *Pseudomonas aeruginosa* türündeki farklı türlerin araştırılmasında çok yardımcıdır. Araştırmacılar, *Pseudomonas putida'*nın saprofitik olmasına rağmen, *Pseudomonas aeruginosa'*nın tekrarlayan fırsatçı enfeksiyonlara yol açan kusurlu bir CFTR klorür taşıyıcısının neden olduğu kalıtsal bir hastalık olan kistik fibroz araştırmasına yardımcı olabileceğini keşfetti. İki bakteri çok yakından ilişkilidir ve *Pseudomonas putida*'nın virülansı belirleyen genlerden yoksun olması haricinde benzer sekanslı genomları paylaşır (yaklaşık% 85'i paylaşılır). Patojenik olmayan doğası nedeniyle, birçok araştırmacı *Pseudomonas putida'*nın çok yönlülüğü ve kullanım kolaylığı nedeniyle araştırmaya çok yararlı olduğunu düşünüyor (Kowalski 2002, Marcus 2003).

1.7.4.3. Genomik Yapısı

1995 yılında, Almanya'daki Genomik Araştırma Enstitüsü'ndeki bilim adamları, *Pseudomonas putida'*nın ilk tam genom dizisini çözdüler. Otuz mikrobiyal suş tamamlandı ve tamamen dizildi, oysa yetmiş beş mikrobik suş dizilim sürecindedir (Kowalski 2002). Genom analizi sayesinde, *Pseudomonas putida'*nın yaklaşık 6.2 milyon DNA baz çiftine sahip olduğu bulundu. *Pseudomonas putida* arasında F1 suşu 5,959,964 nükleotid uzunluğundadır ve % 61 guanin ve sitozin içeriği ve % 39 adenin ve timin içeriği içerir. Bir başka önemli suş da, KT2440 6,181,863 nükleotid uzunluğundadır (NCBI 2012). *Pseudomonas putida,* bir enzim ailesi olan oksidatif redüktazlardaki en az seksen genin, çevrede bulunan maddelerin ayrışmasında rol oynadığı dairesel bir genoma sahiptir. Üstelik, genlerin çoğunluğu, çevredeki kimyasal sinyalleri tespit etmek içindir, böylece toksinlere hızlı bir şekilde yanıt verebilir (Marcus 2003). Bu bakteri ayrıca, kirleticilerin ayrışmasında önemli rol oynayan sıralı TOL ve OCT plazmidi gibi birçok önemli plazmaya da sahiptir (Vandenbergh ve Wright 1983, Muller 1992). Bununla birlikte, bütün plazmitler, biyoremediasyonda yardımcı değildir. Bazıları, *Pseudomonas putida* için bir dezavantaj yaratır, çünkü büyüme hızını azaltır ve plazmid R68-45 gibi fonksiyonlarda işe yaramaz (Reanney ve ark. 1983).

1.7.4.4. Hücre Yapısı ve Metabolizması

Pseudomonas putida, aerobik metabolizmayı kullanan, çubuk şekilli, şekilsiz, gram negatif bir bakteridir. Bu bakteri aynı zamanda hareketlilik için çoklu polar flagellalara sahiptir. Flagella, genellikle 2 ila 3 dalga boyu uzunluğunda bir dalga biçimine sahiptir. *Pseudomonas putida* çevreye duyarlıdır ve kemoatraktanları algıladıktan sonra flagella dönüşü yönündeki değişiklikleri bastırır. Bu, *Pseudomonas putida'*nın bakteriyel hücrelere besin sağlayan bitki tohumlarına doğru itilmesinde rehberlik etmede çok yararlıdır (Harwood ve ark.1989).

Pseudomonas putida, protein ve peptit salgılama ve değiş tokuş etme, protein modifikasyonu ve onarımı, protein katlanması ve stabilizasyonu ve proteinlerin, peptidlerin ve glikopeptitlerin ayrışması dahil olmak üzere proteinlerin farklı kontrolü nedeniyle çevresel stresleri tolere edebilmektedir (TIGR Comprehensive microbial resource 2019).

Pseudomonas putida ayrıca bakterilerin demir seviyelerini arttırmalarına ve aktif taşıma zincirini desteklemelerine izin veren demir şelatlama bileşiği olan sideosporlara sahiptir (Boopathi ve Rao 1999). *Pseudomonas putida* suşları, demir kompleksini, özellikle bakteri hücresinde bulunan pyoveridinler olarak bilinen sideosporlara taşımaya yardımcı olan dış zar reseptör proteinlerine sahiptir. Oradan demir, oksijenin elektron alıcısı olduğu metabolik işlemlerde kullanılır (Lopez ve Henkels 1999). Oksijen iyi bir elektron alıcısı olarak hizmet eder. Bununla birlikte, oksijen yan ürünleri süperoksit ve hidrojen peroksit içeren bakteriler için toksiktir. Yanıt olarak, *Pseudomonas putida,* hücreyi yan ürünlerin reaktif özelliklerinden korumak için katalaz üretir (Miller ve ark.1997).

Pseudomonas putida, fiziksel ve kimyasal streslere cevap vermek için bir adaptasyon mekanizması olarak geliştirilen önemli lipitlere sahiptir. Bakteriler yağ asidi doyma derecesini, siklopropan yağ asitlerinin oluşumunu ve cis-trans izomerizasyonunu değiştirebilir. Farklı aşamalarda, hücre çevreye daha iyi yanıt vermek için özelliklerini değiştirir. Büyümeden sabit faza geçişte, yağ asidinin daha yüksek bir doygunluk derecesi ve substrat alımını artıran, böylece hücreyi düzenleyen daha yüksek bir membran akışkanlığı vardır (Härtig ve ark. 2005).Tüm bu özellikler, *Pseudomonas putida'*nın topraktaki ölümcül toksinler üzerinde hayatta kalmasına ve kirlenmiş alanlarda gelişmesine izin verir. Metabolizması, bu bakterilerin zararlı organik çözücüleri, biyolojik arıtma için çok gerekli olan toksik olmayan kompozitlere dönüştürmelerini sağlar.

1.7.4.5. Ekolojileri

Pseudomonas putida, karmaşık metabolizması ve kirliliği kontrol etme kabiliyeti nedeniyle çevre için önemlidir. Hücrede TOL plazmitlerinde bazı katabolik sekanslarla daha da artan kontaminasyonlara karşı bakteri topluluklarının çok yönlülüğü vardır (Reanney ve ark. 1983). Plazmidler bile çevresel stresi algılamakta önemlidir. Çevresel streslerin bir kısmı, benzinin ana bileşenleri olan benzen, ksilen ve toluen'den kaynaklanır ve başlıca su kirliliği kaynaklarıdır. *Pseudomonas putida*, bu organik çözücülerin hidrokarbonlarını oksidatif reaksiyonlarla bozabilir, bu nedenle *Pseudomonas putida*'yı bioremediasyonda en önemli mikroplardan biri olarak yerleştirir (Otenio ve ark. 2005).

Pseudomonas putida ayrıca topraktaki diğer organizmalar ile etkileşime girer. Rizosferdeki *Saccharomyces cerevisiae* ile bu tür bir etkileşim, *Pseudomonas putida'*nın durumu üzerinde faydalı etkilere yol açmıştır. Fungi *Saccharomyces cerevisiae* gerekli glikozu üretiri ve aynı zamanda *Pseudomonas putida*'ya elverişli olan pH'ı korur (Romano ve Kolter 2005). *Pseudomonas putida* ve *Saccaromyces cerevisiae*'nin karmaşık etkileşimi birlikte bitki sağlığını düzenler. Dahası, bakterilerin kendisi bol miktarda bitki ömrünün büyük bir koruyucusudur. Pyoverdin ve pyoelin gibi yan fresklerin üretimi, bitkileri mantar patojenlerinden korur. Karşılıklı ilişki her iki ortağa da yarar sağlar. *Pseudomonas putida,* bitki tohumunda ve rizosferde kalabilirken, bitki sırayla bitki patojenlerinden korunur ve bakterilerden hayati bensinleri elde eder (Espinosa-Urgel ve ark. 2000).

1.7.4.6. Patoloji

Bazı *Pseudomonas putida* suşları, insan ve bitkilerin hücre zarlarını ve duvarlarını sindiren enzimler için olanlar da dahil olmak üzere bazı genlerin bulunmamasından dolayı patojenik değildir.

Bununla birlikte *Pseudomonas putida'*nın patojenik olarak adlandırıldığı bazı durumlar bulunmuştur. Bakteriler kulak, burun ve boğazda bulundu. Daha ileri araştırmalar, *Pseudomonas putida'*yı ticari bir buğu önleyici üründe buldu. Bu ürünler doğru şekilde sterilize edilmediğinden bakteri ile enfekte edidi (CCDR 2000).

Bir başka durumda *Pseudomonas putida* balığın dorsalında ülserasyona neden olduğu gökkuşağı alabalıklarındaki hastalık salgınının nedeni idi (Altinok ve ark. 2006). Her ne kadar *Pseudomonas putida* saprofitik olsa da güvenli bir bakteri olarak görülse de, cins içindeki diğer türler *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas syringae* gibi fırsatçı patojenlerdir. *Pseudomonas aeruginosa* insan vücudundan birçok farklı yerden izole edildi; ayrıca idrar ve solunum yollarını da enfekte eder. Bu bakteri pnömoni, enterit, vajinit ve mastit ile ilişkilidir.

Her iki fırsatçı patojen de, *Pseudomonas putida'*nın sahip olmadığı toksinleri serbest bırakma ve hücre zarlarını bozma yeteneğine ve enzimlerine sahiptir.

1.7.4.7. Biyoteknolojiye Uygulama

Pseudomonas putida, aromatik hidrokarbon stirenden Poly-3-hidroksialkanoatlar (PHA) üretme kabiliyetine sahiptir. Önemli bir çevre toksik kirletici olan stiren, endüstriyel bölgelerden yılda milyonlarca kilogram salınır ve insanlarda ve diğer memelilerde spinal kanal tahrişine, kas zayıflığına ve narkoza neden olduğu bilinmektedir. PHA'ya dönüşüm, stiren kirliliğinin iyileştirilmesini sağlar.

PHA topluma faydalı olduğu için doku mühendisliği gibi tıbbi uygulamalarda ve ayrıca antibiyotik ve vitamin olarak da hizmet vermektedir. PHA ayrıca çevre dostu, yağa ve grese dayanıklıdır ve uzun bir raf ömrüne sahiptir, bu nedenle plastik kaplar ve diğer tek kullanımlık ürünler gibi günlük öğelerde de kullanılır. Stirenden farklı olarak, PHA toprakta veya suda kolayca parçalanabilir. Yaygın olarak kullanılan strafor, yani polistiren köpük, *Pseudomonas putida'*nın karmaşık metabolizması yoluyla biyobozunur plastik haline dönüştürülür.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Pedano ve Rivas (2000), polifenol oksidaz enzimiyle modifiye edilmiş karbon pasta kullanılarak gentisik aside duyarlı amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Biyosensörün tayin sınırı 5,0×10-5M, enzimin Km ve Imaks'ları sırasıyla 6,7×10-4 mM olarak belirlenmiştir.

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

Candida tropicalis maya hücrelerini kullanarak etanol tayini için hazırlanmış bir biyosensör çalışması (Akyılmaz ve Dinçkaya 2004) ve *Pseudomunas putida* kullanarak fenolik bileşiklerin tayini için hazırlanmış bir biyosensör çalışması (Timur ve ark. 2003) yapılmıştır.

Kıralp ve Küçükyavuz (2003), politiyofen ve polipiropolifenole oksidaz enziminin immobilize ederek şaraptaki fenolik bileşiklerin tayinini yapmışlardır. Elektrotun Km değeri, optimum sıcaklığı ve pH'sı, raf ömrü ve kararlılığı tespit etmişlerdir. Ayrıca hazırlanan elektrot ile kırmızı şaraptaki fenolik bileşiklerin miktarı belirlenmiştir.

Odacı ve ark. (2004), fenolik bileşiklerin tayini için geliştirdikleri biyosensörde şeftali dokusu için en uygun substratın tespiti amacıyla bazı fenolik bileşiklerin verdiği biyosensör cevaplarını karşılaştırmış ve en iyi biyosensör cevabını pirogallolde aldığını bildirmiştir. Portaccio ve ark.'nın (2006) fenolik bileşiklerin tayini için geliştirdikleri biyosensörde ise en uygun substratın kateşol olduğunu rapor etmişlerdir.

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

Gomes ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada kırmızı şarapta fenolleri (kateşin ve kafeik asit) tespit etmek amacıyla Polietersülfon membran üzerine Coriolus Versicolor Lakkazı immobilize edilerek bir biyosensör geliştirilmiştir. Geliştirilen sensörün lineer aralığı 2.0 to 14.0 × 10−6 M ve hassasiyetin0.0566 mAM olduğu tespit edilmiştir (Gomes ve ark. 2004).

Njagi ve Andreescu kimyasal olarak sentezlenmiş bir Au-Ppy nanokompozite tyrosinaz enzimi tutuklayarak glikoz ve fenol ölçümü yapabilen bir amperometrik biyosensör gelştirmişlerdir. Pirol konsantrasyonu, enzim miktarı, pH ve uygulanan potansiyel gibi parametreleri incelemişlerdir. Belirleme limiti glikoz ve fenol için sırasıyla 2.10-6 M ve 3.10-8 M olarak bulunmuştur (Castillo ve ark. 2004). Li ve çalışma arkadaşları (2008) mediatörsüz bir

fenol biyosensörü geliştirmişlerdir. Bu sensör ZnO nanopartiküllerine tyrosinaz enzimi tutuklayarak GCE hazırlanmasıyla elde edilmiştir. pkresol, fenol ve katekol için hassasiyet değeleri sırasıyla 187, 182, 114 µA/ mM olarak bulunmuştur (Li ve ark. 2006).

Boron- doped elmas elektrota tyrosinaz enziminin karbodiimid ile çapraz bağlanmasıyla hazırlanan bir fenol biyosensörü geliştirilmiştir. Sensörün optimum pH değeri 6,5; potasnsiyeli ise -0,15 V olarak bulunmuştur. Fenol için hassasiyet 232,5 mA/ Mcm^2 ; lineer aralık 1-200 µM ve belirleme limit 0,2 µM olarak bulunmuştur (Zhao ve Zhi 2006).

Biyosensör uygulamaları sürekli sistemlerde de çalışılmıştır. Sürekli sistemlerde yapılan denemelerde biyosensörün hızlı cevap süresine, yüksek hassasiyete ve iyi tekrerlanabilirlik özelliklerine sahip olduğu belirtilmiştir (Hansen 1996, Yang ve ark. 2006).

Zejli ve arkadaşları sonojelkarbon dönüştürücülü aluminyum sol-jel ile tyrosinaz enzimi kullanarak bir fenol biyosensörü geliştirmişlerdir. Sol-jel matriksinin yüksek enzim yükleyebilme kapasitesi ve poroz bir yapıya sahip olması nedeniyle hızlı bir cevap süresi elde etmişlerdir. Lineer aralık 0,5-30 µM, belirleme limiti ise 0,3 µM olarak bulunmuştur **(**Zejli ve ark. 2008).

Kochana ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, fenolik bileşiklerin amperometrik tayini için tirosinaz / lakkaz bienzim biyosensörü geliştirilmiş. Enzimler titanya jel matriksine immobilize edilmiş. Katekol için en yüksek duyarlılık ve en geniş doğrusal aralık sırasıyla 234 mA L mol− 1 ve 2.0 × 10− 7–3.2 × 10−5 mol / L olarak tespit edilmiş. 40 günlük depolamadan sonra, biyosensörün ilk aktivitesini % 52 oranında koruduğu görülmüştür (Kochana ve ark. 2008).

Atıksulardaki organik maddelerin tespiti için çözünmüş oksijen elektrodu ile birleştirilmiş immobilize *Pseudomonas syringae* esaslı Biyolojik Oksijen İhtiyacı (BOİ) sensörü yapılmıştır. Mikroorganizmalar, yağ ve su fazından meydana gelen mikro-gözenekli polimer disk içerisine askıda kültürün reaktörden 1 ml/dak akış hızında 24 saat süreyle geçirilmesi ile immobilize edilmiştir. Sensör ölçümleri çözünmüş oksijen probunun polimer disk üzerine yerleştirilmesi ile sürekli atıksu besleme ve akım enjeksiyonu sistemleri kullanılarak yapılmıştır. İki ölçüm sisteminde meydana gelen sensör performansı 5?100 mg/l BOİ5 aralığında iyi bir doğrusallık göstermiştir (r2>0.98). BOİ sensörünün tipik yanıt süreleri sürekli besleme metodunda 60150 saniye, akım enjeksiyon metodunda ise 25?40 saniye olmuştur. Sürekli substrat besleme tekniğinde optimum akış hızı 1.0 ml/dak. olarak belirlenmiş, akım enjeksiyon tekniğinde ise 0.6 ml/dak en uygun debi olarak bulunmuştur. Her iki ölçüm tekniğinde optimum sensör yanıtları pH 6.8, 22 ^{0}C ve 2.0 mm disk kalınlığında gözlenmiştir (Kara 2009).

Yalvaç (2010), tarafından su kaynakları ve atıksularda fenol ve fenol türevlerinin

güvenli, seçici, hassas ve hızlı ölçümü için farklı şekillerde hazırlanmış kompozit çalışma elektrotlarından oluşmuş fenol biyosensörleri geliştirilmiştir. Çalışmada, tirozinaz enzimi kullanılmıştır. Hazırlanan 8 çalışma elektrotu kullanılarak geliştirilen biyosensörler kesikli ve sürekli sistemlerle fenol tayininde kullanılmıştır. Hazırlanan biyosensörlerde 18 farklı fenol türü analiz edilmiş, ölçüm için gerekli kalibrasyon eğrileri çizilmiş, bu kalibrasyon eğrileri kullanılarak ölçüm analitik parametreleri hesaplanmıştır. Ayrıca biyosensörlerden çıkan sonuçlar ile GC-MS fenol tayininden elde edilen sonuçlar kıyaslanmıştır.

Özcan (2010), tarafından yapılan çalışmada fenolik bileşikleri substrat olarak kullanan bol miktarda polifenoloksidaz enzimi içeren bakla ve Anamur muzu kabuğu bitki dokularıyla fenolik bileşik tespiti amacıyla doku temelli biyosensörler oluşturulmuştur. Her iki biyosensörleri için katekol lineer tayin aralıkları kalibrasyon sırasıyla 10-80 µM ve 5-60 µM olarak bulunmuştur.

Granero ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, şarap ve çay örneklerinde toplam polifenolik içeriği tespit etmek için kullanılan *Brassica napushairy* kökleri peroksidazları bazlı bir amperometrik biyosensör geliştirilmiştir. Çalışmada biyosensörün kinetik parametreleri çalışılmıştır. Sülfürdioksit, askorbik asit ve glikozun girişim etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Granero ve ark. 2010).

Dereotundan (*Anethum graveolens*) amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemleri ile kısmen saflaştırılan polifenol oksidaz enzimi bazı killerle immobilize edilmiştir. Optimum koşullarda (sıcaklık, pH ve iyonik şiddet) KM ve Vmax değerleri belirlenmiştir. Polifenol oksidaz enzim aktivitesi, katekol substratına karşı 420 nm dalga boyunda spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür. IC50 ve Ki değerleri bulunmuştur. Enzimin en iyi kırmızı kile immobilize olduğu gözlemlenmiştir. Substrat olarak katekol kullanılarak askorbik asit, L-sistein klorür, sodyum metabisülfit ve tiyoüre inhibitörleri için I50 ve Ki değerleri belirlenmiştir. En etkili inhibitörün askorbik asit olduğu bulunmuştur (Akbulut 2011).

Chauhan ve Pundir (2011), serum kolesterol tayini için kolesterol esteraz, kolesterol oksidaz ve peroksidaz enzimlerini polivinil klorür üzerine immobilize etmişlerdir. Hazırlanan biyosensörün; optimum pH 7,2 ve optimum sıcaklığı 45 °C, raf ömrü 4 ay, tekrarlanabilirliği 200 ölçüm olarak bulunmuştur.

Fenolün ve fenol, katekol, p-kresol, 2-aminofenol ve pirogallol gibi türevlerinin belirlenmesi için yeni bir tür amperometrik fenol biyosensörü üretilmiştir. Bir trimetoksisilil terminal grubu ile poli (glisidilmetakrilat) (PGMA) 'nın telomeri, glisidilmetakrilatın telomerizasyonuyla sentezlenmiştir. Demir oksit nanoparçacıkları, iyi enzim immobilizasyon platformunu elde etmek için poli (glisidil metakrilat) telomeri ile kaplanmıştır. PGMA kaplı

Fe_3O_4 kovalent olarak Au elektrot yüzeyine tutturulmuş ve yaban turpu peroksidazı (HRP) sırasıyla nanoparçacık kaplı yüzey üzerinde hareketsizleştirilmiştir. Telomer, nanopartiküller ve modifiye elektrotlar, Fourier dönüşümü kızılötesi (FT-IR), X-ışını kırınımı (XRD) ile karakterize edildi. HRP'nin immobilizasyonundan önce ve sonra transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) ve siklik voltammetri (CV), Amperometrik cevap, fosfat tamponlu tuzlu suda (pH 7.5), 500, 50 V ve Ag / AgCl'nin sabit bir potansiyelinde substrat konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak ölçülmüştür. Üretilen fenol biyosensörü için analitik parametreler kalibrasyon eğrilerinden elde edildi. Enzim elektrotunun temel özellikleri (optimum pH, optimum sıcaklık, yeniden kullanılabilirlik ve depolama kararlılığı) belirlenmiştir (Çevik ve ark. 2012).

Fenolün amperometrik tayini için liyofilize edilmiş mantar dokusuna (*Agaricus bisporus*) dayalı basit ve ucuz bir biyosensör geliştirilmiştir. Bu mantar dokusu fenolik substratlarla iki sıralı oksidasyon reaksiyonunu katalize eden tirozinaz (EC 1.14.18.1) enzimini içerir. Her iki reaksiyon da moleküler oksijen içerir; Bu sebeple ticari Clark tipi oksijen elektrot bir dönüştürücü olarak belirlenmiştir. Liyofilize edilmiş biyo-bileşen küpler (biyosensör sisteminde iki konumda) veya toz olmak üzere 2 farklı biçimde test edilmiştir. Biyosensörün karakterizasyon çalışmalarında zaman reaksiyonu, lineer aralık ve tekrarlanabilirlik gibi bazı parametreler incelenmiştir. En iyi biyosensör konfigürasyonu için, 0.1 ila 10.0 mg/L (-1) fenol; varyasyon katsayısı ve standart sapma sırasıyla % 0,02 ve +/- 0,11 mg /L (-1) olarak hesaplanmıştır (Silva ve ark. 2013).

Ticari olarak temin edilebilen tirozinazın karbon karası macunu elektrotu üzerine immobilizasyonuna dayanan yeni bir biyosensör geliştirilmiştir. Bu cihaz, geleneksel grafit macun elektrotlarına dayanan enzimatik sensörlere kıyasla önemli ölçüde azaltılmış ses göstermiştir. Substrat olarak katekol kullanıldığında, yanıt 0.013 ila 150 umol L − 1 aralığında doğrusalmış (6 nmol L − 1 tespit limiti ile (S / N oranının üç katı). Peroksidaz ve lakkaz biyosensörleri de hazırlandı. Bu üç enzimatik biyosensörün yirmi farklı fenolik bileşiğe verdiği tepkiler, moleküler yapıları ve spesifik enzim aktivite ilişkileri dikkate alınarak incelenmiştir. Ek olarak, yarı-saflaştırılmış tirozinaza dayanarak başka bir sensör bildirilmiştir. Zeytinyağlarında fenol tayini için tirosinaz biyosensör ve Folin-Ciocalteu spektrofotometrik yöntemlerle elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır (Haddam ve ark. 2013).

Çil (2014), çalışma kapsamında bütünüyle katı-hal kompozit pH sensörlerin yüzeyine polifenol oksidaz enziminin immobilizasyonuyla fenollere duyarlı mikro biyosensörler hazırlamıştır. Hazırlanan fenol duyar mikro biyosensörlerin yaygın fenolik türlere (kateşol, fenol, m-krezol, p-krezol, o-krezol) karşı geniş bir doğrusal aralıkta (yaklaşık 1.10-2 – 1.10-5

mol/L) oldukça duyarlı olduğunu, cevap zamanlarının kısa (<15 s) ve kullanım ömürleri uzundu olduğunu (3-4 hafta) bulmuştur. Hazırlanan fenol duyar mikro biyosensörler siyah çay numunesinde kateşol analizi için uygulanmıştır.

Yarar (2014), tarafından lizin oksidaz enzimi immobilize edilmiş ve biyosensör geliştirerek lizinin potansiyometrik tayini yapılmıştır. Lizin biyosensörün amonyuma ve lizine cevabı, çalışma aralığı, cevap zamanı, optimum tampon konsantrasyonu, optimum pH, ortam sıcaklığı, raf ömrü ve tekrarlanabilirlik parametreleri belirlenmiştir. Ayrıca amino asitlerin ve askorbik asidin girişim etkisi çalışılmıştır.

Tripsin omurgalılarının çoğunun sindirim sisteminde bulunan proteinleri parçalayıcı yapıda bir sindirim enzimidir. Pankreastan in aktif bir proenzim olan tripsinojen biçiminde üretilir ve ince bağırsağa ulaştığında enteropeptidaz tarafından aktif hale getirmiştir. Yapılan çalışmada tripsin aktivite tespiti amacıyla amperometrik biyosensör geliştirilmiştir. Hazırlanan biyosensörün çalışma ilkesi, tripsinin GOD biyoaktif tabakasını hidrolizleyerek sinyal düşüşünün izlenmesini ilkesini temel alır. GOD ve jelatin, camsı karbon elektrot yüzeyine tutturulup ve glutaraldehit ile çapraz bağlamayla immobilize edilmiştir. Oluşturulan biyosensörün optimizasyonu için jelatin miktarı, enzim inkübasyon süresi, optimum sıcaklık, GOD derişimi, çalışma potansiyeli ve $NaHCO_3$ tamponu pH 'ı gibi parametreler için deneysel çalışmalar yapılmıştır. Biyosensörün karakterizasyon çalışmalarında ise tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, kalibrasyon grafikleri, amperometrik ve EIS yöntemleri kullanılarak gerçek örnek ile de çalışılmıştır (Işık 2014).

Draghi ve Fernandes, *Musa acuminata*'dan ekstrakte edilen ve katı temaslı transdüserlerin bir yüzeyinde kovalent bağla immobilize edilmiş tirosinaz kullanan etiketsiz bir potansiyometrik biyosensör geliştirilmiştir. İki katman içeren dönüştürücü üretilmiştir. İlk katman bir poli (vinil) klorür karboksilatlı (PVC-COOH), grafit ve potasyum permanganat harmanı içeriyordu. Bu tabaka üzerinde, sadece poli (vinil klorür) karboksilat ve grafit karışımı içeren ikinci bir tabaka biriktirilmiştir. Transdüserin son tabakasında, trosinaz enzimini N- (3-dimetilaminopropil) -N′-etilkarbodiimid hidroklorür ile reaksiyona sokarak hareketsiz hale getirilmiştir. Katı temas potansiyometrik biyosensörü 7.3 x 10-7 M düşük saptama sınırında ve 9.3 x 10-7 M ile 8.3 x 10-2 M arasında katekol konsantrasyonuna doğrusal bir aralıkta sunulmuştur. Bu biyosensör bal ve propolis örneklerinde fenollerin toplam miktarını belirlemek için uygulanmıştır. Sonuçlar Folin-Ciocalteu yöntemiyle aynı fikri sunmuştur (Draghi ve Fernantes 2016).

Atık sulardaki fenolik bileşiklerin basit bir şekilde izlenmesi çevresel kontrol için büyük önem taşımaktadır. Burada, in situ, atık sulardaki toplam fenol tahmini ve ilave örnek ön arıtması olmadan su kalitesi izlemesi için lakaz bazlı bir mikro bant dizisi yazdırılan yeni bir

ekran sunulmuştur. Mikro ölçekli grafit elektrotların karakterizasyonu için sonlu elemanlar yöntemi kullanılarak yapılan sayısal simülasyonlar kullanılmıştır. Eloksallaştırma ve ardından kovalent modifikasyon, lakkazla elektrot işlevselliği için kullanılmıştır. Direkt ve katekolün aracılık ettiği oksijen indirgenmesindeki işlevselleştirme etkinliği ve elektrokimyasal performans, mikro bant laklav elektrotlarında incelenmiş ve makro ölçekli elektrot yapılarıyla karşılaştırılmıştır. Enzim biyosensörünün boyutlarının, optimize edilmiş koşullar altında kullanıldığında, analitik özelliklerinde önemli bir iyileşmeye yol açmıştır. Geliştirilmiş mikrosensör, 0.2 ila 10 μM'lik bir lineer aralık, 1.35 ± 0.4 AM (-1) cm (-2) 'lik bir duyarlılık ve 1.35 ± 0.4 AM (-2)' lik bir hassasiyet aralığı ile karakterize edilen, katekol ilavesine musluk suyu ilavesine 43 μM'ye kadar hızlı tepki göstermiştir. Bu gelişmiş lakkaz bazlı mikrosensör, su kalitesinin izlenmesi için kullanılmış ve temizleme işleminin farklı aşamalarından gelen atık su örneklerinin toplam fenol analizi performansı standart bir yöntemle karşılaştırılmıştır (Eriksson ve ark. 2016).

Berber (2016), polivinil alkol (PVA) elektroeğirme lif – karbon nanotüp (CNT) nanokompozit malzemelerin glukoz biyosensor uygulamasını içermektedir. Çalışmada, içerik ve yapı olarak farklı beş sensör elektrodu, glukoz algılama aktivitelerine göre karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Elektrotların glukoz algılama aktiviteleri amperometrik olarak -0.5 V potansiyel fark uygulanarak, 0.1 M fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH 0.7) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Üretilen sensor elektrotlarının glukoz algılama hassasiyetleri ise sırasıyla 19.6, 27.7, 67.5, 44.4, 4.0 μA mM cm olarak tespit edilmiştir.

Kartlaşmış (2017), biyoaktif tabakanın optimizasyonunda BSA miktarı, jelatin miktarı ve glutaraldehit yüzdesi sırasıyla 0.030 gr, 0.45 gr ve % 2.5 olarak tespit edilmiştir. Fosfat tamponunun pH: 7.5 ve 50 mM, tarama hızının 0.05 V/s, sıcaklığın ise 35 °C optimum çalışma koşullarını sağladığı belirlemiştir. Au/BSA-jelatin/glukoz oksidaz-peroksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensör için karakterizasyon çalışmalarında 5-400 mg/dL aralığında glukoz için doğrusal sonuçların alındığı belirlenmiştir. Raf ömrü çalışmalarında 40. günün sonunda yanıtın % 72'ye kadar korunduğu, 80 mg/dL derişimle kullanılarak yapılan tekrarlanabilirlik çalışmalarında (n=13) standart sapma (S.S) = ±0.1320 ve % varyasyon katsayısı (V.K) = 0.165 olarak bulunmuştur.

Polifenol oksidaz enzimi Sepharose 4B-L-tirozin-p-aminobenzoik asit afinite kolonuyla Tortum elmasından ilk defa saflaştırılmıştır. Enzim saflığının kontrolü SDS-PAGE'le yapılmıştır. Enzimin katekol substratı için optimum pH değeri 5.0 ve 4-metil katekol için optimum pH değeri 5.5 olarak belirlenmiştir. Katekol substratı için KM ve Vmax değerleri sırasıyla 6.17 mM, 20.83 μmol/L.dak 4-metil katekol için sırasıyla 4.16 mM, 32.26 μmol/L.dak

olarak bulunmuştur. Ki sabitleri ve IC50 değerleri karşılaştırılarak askorbik asitin en etkili inhibitör olduğu bulunmuştur (Karabulut 2017).

Canbay (2018), kolesterole yönelik mikrobiyal biyosensör sistemi geliştirmiştir. Biyosensör geliştirilmesi aşaması kapsamında biyoalgılayıcı olarak *Pseudomonas* sp. türü bakteriler ve katalaz enzimi kullanılmıştır. *Pseudomonas* sp. ve katalaz enzimi çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT)/iyonik sıvı (IL)/karbon pasta elektrot (CPE) içerisine immobilize edilmiştir. Biyosensörün immobilizasyon aşamaları CV ve impedans spektroskopisi ile karakterize edilmiştir. Ölçümlerde mediyatör sistemi olarak hidrokinon kullanılmıştır. Amperometrik çalışma potansiyeli -0,2 V olarak bulunmuştur. Mikrobiyal biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyonunda optimum sıcaklık 35 °C, optimum pH : 7,0 olarak belirlenmiştir. Biyosensörün doğrusal tayin aralığı 5-600 mM tayin limiti ise 1,52 mM olarak bulunmuştur. Substrat spesifikliği ve girişim etkisi denemelerinde kortizon, kortizol, testosteron, β-sitosterol ve östradiol gibi steroid bileşiklerle glukoz, askorbik asit gibi endojen analitlerin varlığının biyosensör cevabına etkisi incelenmiştir. Optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları tamamlanan mikrobiyal biyosensörün doygun siklohegzandaki kolesterol cevabı incelenmiş ve sulu ortamla karşılaştırılmıştır. Geliştirilen mikrobiyal biyosensörle liyofilize serum örneklerinde hem sulu fazda hem de siklohegzan fazında kolesterol tayini yapılmıştır.

Mehmet (2018), A1AT analizi için impidimetrik bir biyosensör geliştirmiştir. Biyosensör; altın elektrot yüzeyinde 4-merkaptofenilasetik asit ile SAM oluşturulduktan sonra, karboksil gruplarının EDC/NHS ile aktivasyonu ve A1AT spesifik antikorunun (anti-A1AT) immobilizasyonu şeklinde inşa edilmiştir. Her bir immobilizasyon aşaması elektrokimyasal impedans spektroskopisi ve siklik voltametri kullanılarak karakterize edilmiştir. Tekrar üretilebilirliği yüksek olan bu biyosensörle 100-600 ng/µL tayin aralığında A1AT miktar tayini için hassas sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca yapay serumlu A1AT çözeltileri kullanılarak bu biyosensörün kan serumunda da kullanılabilecek bir potansiyele sahip olduğu anlaşılmıştır.

Ebrahimipour ve Kolahchi fenol tayini için hızlı, hassas, minyatür, tüm hücreli bir iletken biyosensör geliştirilmiştir. Biyosensör düzeneği *Pseudomonas sp*. (GSN23) altın rafine mikroelektrotların yüzeyinde petrol rafinerisi kirlenmiş topraklardan immobilize edilerek hazırlanmıştır. İletkenlik ölçümü sonuçları, fenolün 1 ila 300 mg L-1'den (10-3187 uM) duyarlı biçimde belirlenmesine izin verdi, tespit limiti (LOD) 0.2 mg L-1 (2 uM) idi. Ayrıca bakteri biyosensörü, çivili nehir örneklerinde fenol tayinine başarıyla uygulanmıştır. Kapsül özeti: *Pseudomonas sp*. bazlı bir iletken bakteriyel biyosensör (GSN23) bakterileri, petrol rafinerisinden kirlenmiş topraklar geliştirmiştir. Fenol için tespit limiti 2 m'dir (Ebrahimipour ve ark. 2018).

Üretim, karakterizasyon ve analitik performans, tirozinazın (TYR) bir grafen oksit (GO) ile modifiye edilmiş camsı karbon elektrot (GCE) üzerine glutaraldehit (GA) üzerine kovalent bağlanmasına dayanan bir fenol biyosensörü için araştırılmıştır. Modifiye edilmiş elektrotun yüzey morfolojisiatomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve saha emisyon taramalı elektron mikroskobu(FE-SEM) ile incelenmiştir. Üretilen TYR / GA / GO / GCE biyosensörü çok iyi stabilite, tekrarlanabilirlik, hassasiyet ve pratik kullanım göstermiştir. Katekol biyosensör iyi stabilite, tekrarlanabilirlik, hassasiyet ve pratik kullanım göstermiştir. Katekol 5 geniş bir algılama lineer aralığı x 10^{-8} M 5'e × 10^{-5} M, 3 bir alt tespit limiti x 10^{-8} M, bir akım, maksimum (I_{maksimum} 65.8 arasında) uA ve belirgin bir Michaelis sabiti ($K_{m,}^{uygulama}$ 169.9 arasında) uM sergilemiştir (Wang ve ark. 2018).

Mohtar ve arkadaşları (2019), tarafından yapılan bir çalışmada, propolis örneklerinde polifenol tayini için elektrokimyasal bir biyosensörün hazırlanmıştır. Hazırlanan biyosensör, altın üzerine immobilize edilmiş nanokompozit bir lakkaz enzimine dayanmaktadır. Sensörün lineer aralığı 1-8 µM - kafeik asit ve analiz için gereken sürenin spektrofotometrik yöntem (Folin-Ciocalteu) ile karşılaştırıldığında (85 dakika), 15 dakika olduğu ifade edilmiştir (Mohtar ve ark. 2019).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyaller

Bu çalışma için yapılan deneylerde kullanılan materyaller aşağıda sıralanmıştır.

3.1.1. Cihazlar:

Çizelge 3.1. Cihazlar ve markaları

Cihaz Adı	**Marka**
Elektrokimyasal Analiz Cihazı:	Data LineWINLAB oxygen-meter (DO)
Su Banyosu	DAIHAN Scientific Both Circulator
Spektofotometre	Thermo scientific (Genesys 105 UV V15) - Varion
Hassas Terazi	Denver (Instrument)- Gec-Avery
Magnetik Karıştırıcı	Dragon lab. MS - Heidolph MR Hei- Standart
pH metre	Hanna
Ev tipi Blender	Arzum
Santrifüj Nüve	NF-1200R
Buzdolabı	Vestel dondurucu- Arçelik dondurucu
Mikropipet	İsoterm- BİOHit - Eppendorf
Otoklav	OT 40L Nüve Steam ART
İnkübatör	Memmert
Reaksiyon Hücresi	ÇALIŞKAN 100 ml BORO SILIKAT
Liyofilizatör	Christ LCG
Sonikatör	Jencons Scentific LTD

3.1.2. Kimyasallar:

- NaH_2PO_4 (Merck)
- Na_2HPO_4(Merck)
- Glutaraldehit (Sigma)
- Jelatin (Sigma)
- Sodyum asetat trihidrat (Merck)
- NaOH (Sigma)
- HCI (Sigma)
- Nutrien Broth (Sigma)
- 4-metil katekol (Sigma)
- L-Dopa (Sigma)
- Gallik asit (Sigma)
- Etanol (Sigma)
- Sodyum sitrat (Merck)
- Kobalt (Sigma)
- Çinko asetat (Merck)
- EDTA (Sigma)
- Bakır (Sigma)
- Nikel (Sigma)

Çalışmada biyolojik bileşen olarak kullanılan mısır püskülü (*Zea mays)* ve biber tohumu *(Capsicum annuum L.)* Diyarbakır'daki yerel marketlerden, *Pseudomonas putida* ise Prof. Dr. Kemal GÜVEN'e ait araştırma laboratuvarındaki bakteri koleksiyonundan sağlandı.

3.2. Metotlar

3.2.1. Mısır Püskülü Ham Ekstratının Hazırlanışı

Pazardan alınan mısırdan elde edilen 5 g mısır püskülü 0,176 g askorbik asit ve 4 g polietilenglikol içeren 100 mL pH'sı 6,5 olan fosfat tamponunda 2 dakika süreyle blender ile homojenize edildi. Elde edilen homojenat 3 katlı tülbent bezinden süzüldü. Süzüntü, santrifüj tüplerine alındı ve tüplerin ağırlıkları hassas bir terazide eşitlenerek 15000 x g'de 15 dakika

süreyle +4 ^{0}C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant kısmı aktivite tespiti için kullanıldı.

3.2.2. Biber Tohumu Ham Ekstratının Hazırlanışı

Pazardan alınan biberlerden elde edilen 12 g biber tohumu 0,176 g askorbik asit ve 4 g polietilenglikol içeren 100 mL pH'sı 6,5 olan fosfat tamponunda 2 dakika süreyle blender ile homojenize edildi. Elde edilen homojenat 3 katlı tülbent bezinden süzüldü. Süzüntü, santrifüj tüplerine alındı ve tüplerin ağırlıkları hassas bir terazide eşitlenerek 15000 x g'de 15 dakika süreyle +4 ^{0}C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant kısmı aktivite tespiti için kullanıldı.

3.2.3. Bakteri Temelli Biyosensör için Uygun Bakterinin Seçilmesi

Laboratuvarda bulunan koleksiyondaki yaklaşık 15 bakteri izolatı polifenol oksidaz aktivitesi bakımından test edildi. Bunlardan Batman ilinde Güney Raman'da petrolle kirlenmiş topraktan izole edilen *Pseudomonas putida* da aktivite tespit edildi ve biyosensör bu bakteri kullanılarak geliştirildi.

3.2.4. Bakteri Ham Ekstratının Hazırlanışı

Batman ilinde güney Raman'da petrol atıklarıyla kirletilmiş topraktan elde edilen *Pseudomonas putida* spesifik üreme hızının sabit ve maksimum olduğu 20 saatlik inkübasyon süresinden sonra besi ortamındaki (NB:Nutrient Broth) bakteriler 4600 rpm'de + 4°C'de 25 dk santrifüjlendi. Süpernatant kısımı atıldıktan sonra 10'ar ml fosfat tamponu (50 mM, pH:7,5) eklendi ve yeniden santrifüjlendi. Bu işlem iki defa, fosfat tamponuyla yinelendi. Çalışmada bakterinin sonikatör ile muamele edildikten sonraki liyofilize formu kullanıldı.

3.2.5. Aktivite Tespiti:

Reaksiyon 3 mL kuvartz küvet içinde gerçekleştirildi. PFO'nun substrat spesifikligini belirlemek için katekol substratı kullanıldı. Analiz karışımı genel olarak 2,8 mL fosfat tamponu; 0,1 mL substrat ve 0,1 mL enzim karışımından meydana geldi. Enzim aktifliği birimi olarak 420 nm'de bir dakikada absorbansta 0,001 birimlik değişime neden olan enzim miktarı alındı ve bu ünite (I.U) olarak tanımlandı.



Şekil 3.1. Aktivite tespiti

3.2.6. Mısır Püskülünün Sensör için Hazırlanması:

Polifenol oksidaz aktivitesi gösteren 5 gr. mısır püskülü 50 mM pH 7.0 fosfat tamponunda homojenize edildi. Elde edilecek homojenat 3 katlı tülbent bezinden süzüldü. Süzüntü 15000 x g'de 15 dakika süreyle +4 ^{0}C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant kısmı biyosensör için kullanıldı.

3.2.7. Biber Tohumunun Sensör İçin Hazırlanması:

Polifenol oksidaz aktivitesi gösteren 12 gr. biber tohumu 50 mM pH 7.0 fosfat tamponunda homojenize edildi. Elde edilen homojenat 3 katlı tülbent bezinden süzüldü. Süzüntü 15000 x g'de 15 dakika süreyle +4 ^{0}C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant kısmı biyosensör için kullanıldı.

Bitkisel Doku Temelli (Mısır püskülü) Biyosensörün Hazırlanması:

10 mg Jelatin ve 900 µL doku homojenatı 37.5 ºC de 15 dk bekletildi.

↓

Bu karışımdan 150 µL si alınıp çözünmüş oksijen probu üzerine yayıldı.

↓

+ 4 ºC de 30 dk bekletildi.

↓

30 dk'dan sonra %1.25'lik glutaraldehit çözeltisinde 5dk bekletildi.

↓

Biyosensör saf su ile yıkandıktan sonra çalışma tamponunda bekletildi.

Bitkisel Doku Temelli (biber tohumu) Biyosensörün Hazırlanması:

10 mg Jelatin ve 900 µL doku homojenatı 37.5 ºC de 15 dk bekletildi.

↓

Bu karışımdan 150 µL si alınıp çözünmüş oksijen probu üzerine yayıldı.

↓

+ 4 ºC de 30 dk bekletildi.

↓

30 dk'dan sonra %1.25'lik glutaraldehit çözeltisinde 5dk bekletildi.

↓

Biyosensör destile su ile yıkandı ve çalışma tamponunda bekletildi.

Mikrobiyal Esaslı (*Pseudomonas putida*) Biyosensörün Hazırlanması :

100 mg *Pseudomonas putida* 10 mg jelatin 400 µL pH 7 fosfat tamponuyla karıştırılıp 37.5 ºC de 15 dk bekletildi.

↓

Bu karışımdan 150 µL si alınıp çözünmüş oksijen probu üzerine yayıldı.

↓

+ 4 ºC de 30 dk bekletildi.

↓

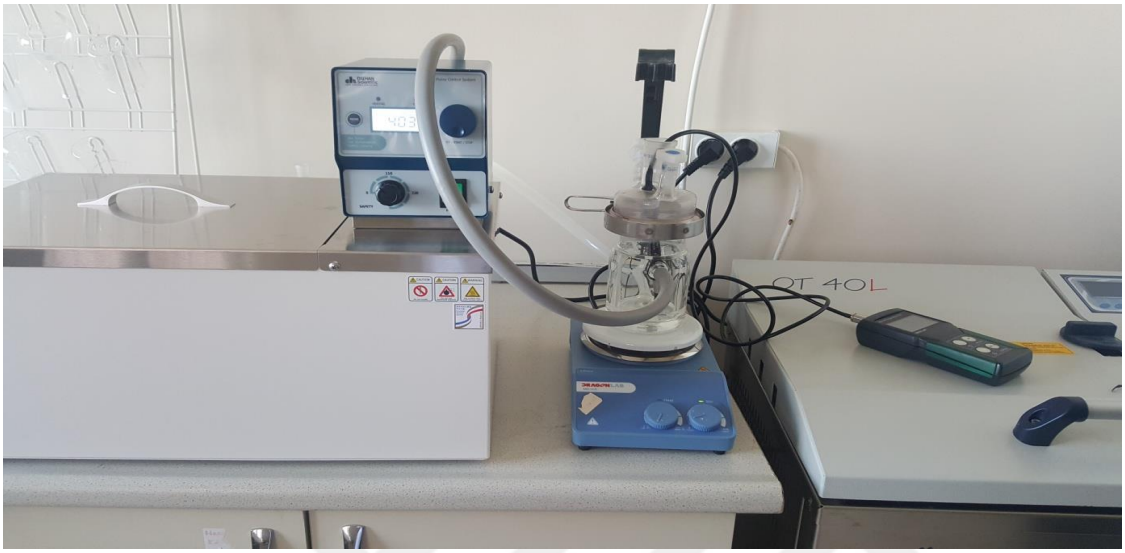
30 dk'dan sonra %1.25'lik glutaraldehit çözeltisinde 5 dk bekletildi.

↓

Saf su ile yıkanan prob çalışma tamponunda bekletildi.

3.2.8. Biyosensörün Ölçüm Prosedürü

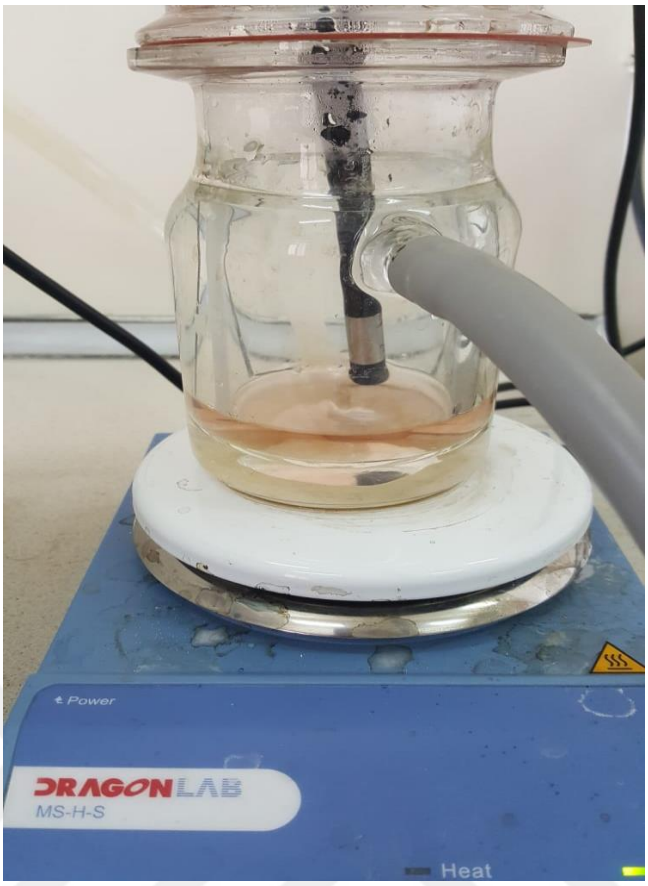
Bitki dokusu temelli ve mikrobiyal esaslı biyosensörler ile yapılan ölçümlerde kullanılan düzenek Şekil 3.1'de Şekil 3.2'de çalışma elektrodu ve elektrot sistemi Şekil 3.3'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Biyosensör ölçüm düzeneği



Şekil 3.2. Çalışma elektrodu



Şekil 3.3. Elektrod sistemi

Oluşturulan biyosensörde oksijen elektrodunun membranına bitki dokusu homojenatı veya bakteri homojenatı immobilize haldedir. Belirlenen çalışma koşullarında tampon çözelti bulunduran reaksiyon hücresine substrat eklenmesinden sonra enzimatik reaksiyon başlar. Bu esnada reaksiyon hücresindeki çözünmüş oksijenin kullanılmasıyla çözünmüş oksijen miktarında azalma gözlenir ve aynı zamanda polifenol oksidaz enziminin katekol subsratıyla etkileşiminden dolayı koyu renk gözlemlenir. Biyosensörün prensibi; çözünmüş oksijen miktarındaki azalmanın ölçülmesi temeline dayanır. Hazırlanan biyosensör ile ölçüm çalışmalarının yapıldığı düzenek şekil 3.1'de verilmiştir.

3.2.9. Uygun Substratın Belirlenmesi

Uygun substratı tespit etmek için mısır püskülü sensörü için için katekol,4-metil katekol, L-dopa; biber tohumu sensörü için katekol, 4-metil katekol, L-dopa ve bakteri için katekol, 4-metil katekol, L-dopa, tirozin gibi fenolik bileşikleri subsrat olarak kullanarak bu eğrilerden en iyi biyosensör cevabı katesol ile elde edildiğinden bundan sonraki çalışmalarda standart substrat olarak katekol kullanıldı.

3.2.10. Biyosensörlerin İmmobilizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu

3.2.10.1. Doku Miktarının Tespiti

Biyoaktif tabaka için sabit bir jelatin miktarı ve glutaraldehit yüzdesinde biyoaktif bileşenler için değişik oranlarda doku miktarları kullanılarak biyosensörler oluşturuldu.

Oluşturulan biyosensörlerde aşağıda belirtilen (çizelge 3.2, 3.3, 3.4) oranlardaki biyoaktif bileşenlerin biyosensör cevabı üzerine etkisi belirlendi. Optimum doku miktarı için çalışmalar 30 mM, pH 7.0 fosfat tamponunda 37.5 ºC' de yapıldı.

Çizelge 3.2. Mısır püskülü biyosensörü için immobilizasyon parametrelerinin optimizasyonu

Doku	Jelatin	Gluteraldehit
50 mg	10 mg	% 1.25
100 mg	10 mg	% 1.25
200 mg	10 mg	% 1.25
400 mg	10 mg	% 1.25

Çizelge 3.3. Biber tohumu biyosensörü için immobilizasyon parametrelerinin optimizasyonu

Doku	Jelatin	Gluteraldehit
50 mg	10 mg	% 1
100 mg	10 mg	% 1
200 mg	10 mg	% 1
400 mg	10 mg	% 1

Çizelge 3.4. Bakteri biyosensörü için immobilizasyon parametrelerinin optimizasyonu

Bakteri özütü	Jelatin	Gluteraldehit
50 mg	10 mg	% 1
100 mg	10 mg	% 1
200 mg	10 mg	% 1

3.2.10.2. Jelatin Miktarının Biyosensörlerin Cevabına Etkisi

Biyoaktif bileşenlerde optimum doku miktarları tespitinden sonra biyoaktif tabakadaki jelatin miktarının biyosensör cevapları üzerine etkisinin tespiti için optimum doku miktarı ve sabit gluteraldehit yüzdeleriyle farklı miktarlarda jelatin kullanılarak ölçümler yapıldı.

Alınan ölçümler sonucunda elde edilen verilerden standart grafikler oluşturuldu. Oluşturulan grafikler aracılığıyla optimum glutaraldehit yüzdesi belirlendi. Optimum koşullar için çalışmalara 30 mM, pH 7.0 fosfat tamponunda 37.5 ºC' de yapıldı.

Çizelge 3.5. Mısır püskülü biyosensörü jelatin miktarı optimizasyonu için hazırlanan sensörler

Doku	Jelatin	Gluteraldehit
100 mg	2.5 mg	% 1.25
100 mg	5 mg	% 1.25
100 mg	10 mg	% 1.25
100 mg	20 mg	% 1.25

Çizelge 3.6. Biber tohumu biyosensörü jelatin miktarı optimizasyonu için hazırlanan sensörler

Doku	Jelatin	Gluteraldehit
100 mg	2.5 mg	% 1
100 mg	5 mg	% 1
100 mg	10 mg	% 1
100 mg	20 mg	% 1

Çizelge 3.7. Bakteri biyosensörü jelatin miktarı optimizasyonu için hazırlanan sensörler

Bakteri özütü	Jelatin	Gluteraldehit
100 mg	2.5 mg	% 1
100 mg	5 mg	% 1
100 mg	10 mg	% 1
100 mg	20 mg	% 1

3.2.10.3. Glutaraldehit Yüzdesinin Biyosensörlerin Cevabına Etkisi

Biyosensör cevabına gluteraldehit yüzdesinin etkisinin tespit edilmesi için optimum doku ve jelatin miktarlarında farklı gluteraldehit yüzdeleri kullanılarak ölçümler alındı.

Alınan ölçümler sonucunda standart grafikler oluşturuldu. Oluşturulan grafikler yardımıyla optimum glutaraldehit yüzdesi belirlendi. Optimum koşullar için çalışmalara 30 mM, pH 7.0 fosfat tamponunda 37.5 ºC' de yapıldı.

Çizelge 3.8. Mısır püskülü biyosensörü için gluteraldehit yüzdesi optimizasyonu için hazırlanan sensörler

Doku	Jelatin	Gluteraldehit
100 mg	10 mg	% 1
100 mg	10 mg	% 1.25
100 mg	10 mg	% 1.5
100 mg	10 mg	% 1.75

Çizelge 3.9. Biber tohumu biyosensörü için gluteraldehit yüzdesi optimizasyonu için hazırlanan sensörler

Doku	Jelatin	Gluteraldehit
100 mg	10 mg	% 0.75
100 mg	10 mg	% 1
100 mg	10 mg	% 1.25
100 mg	10 mg	% 1.5

Çizelge 3.10. Bakteri biyosensörü için gluteraldehit yüzdesi optimizasyonu için hazırlanan sensörler

Bakteri özütü	Jelatin	Gluteraldehit
100 mg	5 mg	% 1
100 mg	5 mg	% 1.25
100 mg	5 mg	% 1.5
100 mg	5 mg	% 1.75

3.2.11. Biyosensörlerin Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

3.2.11.1. Opitimum pH Değerlerinin Belirlenmesi

Biyosensörler için optimum pH'ının belirlenmesi için pH 2.0, 3.0 ve 4.0) için 30 mM sodyum sitrat, pH 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0 için 30 mM sodyum fosfat tamponları kullanıldı. Yapılan ölçümler sonucunda en iyi biyosensör cevabının elde edildiği pH değerleri tespit edildi. Ölçümler yapılmadan önce biyosensörler çalışma tampon içerisinde 10 dk bekletildi.

3.2.11.2. Uygun Tampon Derişiminin Tespiti

Hazırlanan biyosensörlerin optimum pH değeri belirlendikten sonra tampon derişimlerinin biyosensör cevabı üzerine etkisinin tespiti için, biyosensörler için değişik derişimlerdeki tamponlarla ölçümler yapıldı. Bunun için fosfat tamponunun (pH 7.0) 0.05 M, 0.1 M ve 0.2 M derişimlerinde ölçümler yapıldı.

3.2.11.3. Optimum Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi

Biyosensörlerin optimum sıcaklık derecesini tespit etmek için herbir biyosensör için daha önce belirlenmiş olan optimum pH derecesinde 20, 30, 40 ve 50 ºC sıcaklıklarında ölçümler yapıldı. Ölçümlerde mısır püskülü biyosensörü için 0.1 M katekol, biber tohumu biyosensörü için 0.2 M katekol ve bakteri için 0.1 M katekol kullanıldı Farklı sıcaklık değerlerinde ölçüm yapılmadan önce biyosensörler kullanılacak olan tampon içerisinde 10 dk bekletildi. Ölçümlerden elde edilenlerle sıcaklığa karşı % biyosensör cevabı grafikleri oluşturuldu.

3.2.12.1. Doğrusal Ölçüm Aralığının Tespit Edilmesi

Doğrusal ölçüm aralığını tespit etmek için belirlenen optimum koşullara göre hazırlanan biyosensörlerle değişik katekol konstrasyonlarında ölçümler gerçekleştirildi. Ölçüm aralığı elde edilen grafiğin doğrusal eğimi çizilerek tespit edildi.

3.2.12.2. İşlem Kararlılığı

Aynı sensör ile aynı gün içinde kaç defa ölçüm yapılabileceğini tespit etmek amacıyla sensörlerin işlem kararlılığı tespit edildi. Biyosensörlerin işlem kararlılıklarının belirlemek için, 37.5 ºC' de 0.1 M, pH 7.0 fosfat tamponu içinde mısır püskülü biyosensörü ile 0.1 M katekol subsratı kullanılarak art arda aynı sensörle 30 dk ara ile 6 ölçüm, biber tohumu biyosensörü ile 0.2 M katekol kullanılarak art arda aynı sensör ile 30 dk aralıklarla 6 ölçüm ve bakteri

biyosensörü ile 0.1 M katekol kullanılarak art arda aynı sensör ile 30 dk aralıklarla 5 ölçüm yapıldı. Yapılan ölçümler ile sonuçlarla % aktiviteye karşı zaman grafikleri oluşturuldu.

3.2.12.3. Raf Ömrü

Biyosensörlerin raf ömrünü tespit etmek için, 0.1 M katekol içeren 37.5 ºC' de 0.1 M, pH 7.0-fosfat tamponu içinde mısır püskülü biyosensörü ile 5 gün aralıklarla 6 kez ölçüm yapılırken, biber tohumu biyosensörü ile 0.2 M katekol kullanılarak 7 ölçüm ve bakteri biyosensörü için 0.1 M katekol kullanılarak 6 ölçüm yapıldı. Alınan sonuçlardan aynı biyosensör ile kaç gün ölçüm yapılabileceği tespit edildi. İlk gün alınan ölçüm değeri % 100 olarak kabul edildi ve sonraki günlerde alınan ölçümlerin biyosensör cevapları % aktivite cinsinden grafiğe geçirildi.

3.2.12.4. Biyosensörlerin Cevabı Üzerine Girişimlerin Etkisi

Biyosensörlerin cevabı üzerine Bazı kimyasal maddelerin girişim etkisini tespit etmek için 37.5 ºC' de 0.1 M katekol içeren 0.1 M, pH 7.0 - fosfat tamponu kullanılarak EDTA, sodyum azid, SDS, kobalt, nikel, mangan, bakır, çinko ve kadmiyumun girişim etkisi analiz edildi. Kimyasal madde eklenmeden yapılan ölçüm aktivitesi %100 olarak kabul edilip her bir kimyasal için % inhibisyon oranları tespit edildi.

3.2.12.5. Biyosensörlerin Gerçek Örneklere Uygulanabilirliğinin Tespiti

Gerçek numune olarak elma suyu ve Elazığ ili Hazar gölünden alınan su örneği kullanıldı. Bu numuneler kullanılıncaya kadar 4 ºC de muhafaza edildi. İlk olarak numune örneklerinin toplam fenolik madde değerleri Folin Ciocalteu yöntemi ile ölçüldü (Slinkard ve Singleton 1977). Gallik asit kalibrasyon eğrisi hazırlamak için 10 ml stok çözelti hazırlanmış 25 µL numune veya standart alınmış ve üzerine 800 µL seyreltilmiş FC ajanı ilave edilmiştir. Reaksiyon başladıktan 3 dakika sonra 800 µL % 10'lik sodyum karbonat ilave edilmiş ve karışım 45 dakika karanlık bir ortamda bırakılmıştır. Süre sonunda absorbanslar 760 nm dalga boyunda okunmuştur. Deney sonunda ölçülen numune örneklerine ait fenol değerleri hazırladığımız biyosensörler ile elde ettiğimiz sonuçlar ile karşılaştırıldı. Numunelerdeki fenol analizleri standart ekleme yöntemi kullanılarak yapıldı. Numuneden 1 ml alındı ve biyosensörün bulunduğu 30 ml fosfat tamponunun olduğu hücreye ilave edildi. Numune ilavesinden sonra hücre içindeki başlangıç ve sonuçtaki oksijen miktarı ölçüldü. Daha sonra aynı hücre içerisine sırası ile 0.5 mM ve 1 mM Fenol standartları ilave edildi, her biri için yine oksijen değerleri okundu. Aynı işlemler diğer biyosensör için de gerçekleştirildi. Her bir Fenol standardına karşılık gelen oksijen değerleri grafiğe geçirildi. Oluşan denklemden yararlanarak numunelerdeki fenol değerleri tespit edildi.



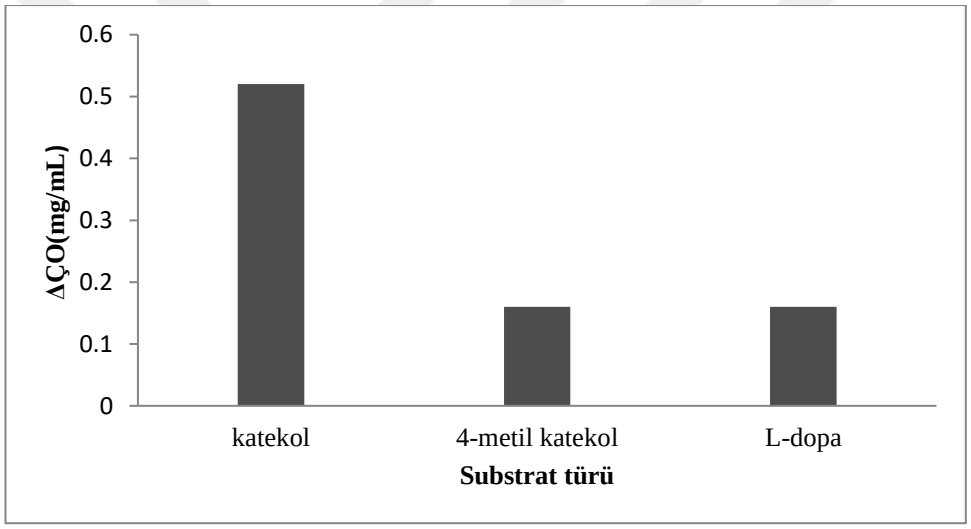
Şekil 3.4. Biyosensörlerin farklı örneklere uygulanabilirliğinin incelenmesi

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

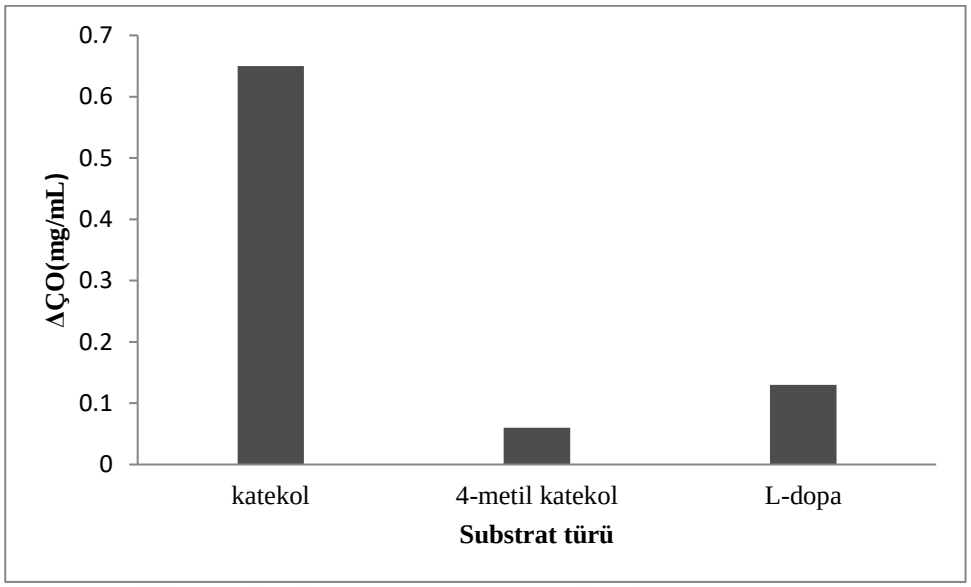
4.1. Substrat Olarak Kullanılan Standart Fenolik Bileşiğin Seçilmesi

Bitki dokusu temelli ve mikrobiyal esaslı biyosensör için uygun substratın seçimi için sırasıyla mısır püskülü için aynı konsantrasyondaki (0.1 M) katekol,4-metil katekol, L-dopa; biber tohumu için aynı konstrasyondaki (0.1 M) katekol,4-metil katekol, L-dopa ve bakteri sensörü için aynı konstrasyondaki (0.1 M) katekol, 4-metil katekol, L-dopa, tirozin gibi fenolik bileşikler hazırlanan biyosensörle ölçüldü ve zamana karşı çözünmüş oksijen konsantrasyonu eğrileri Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te verildi.

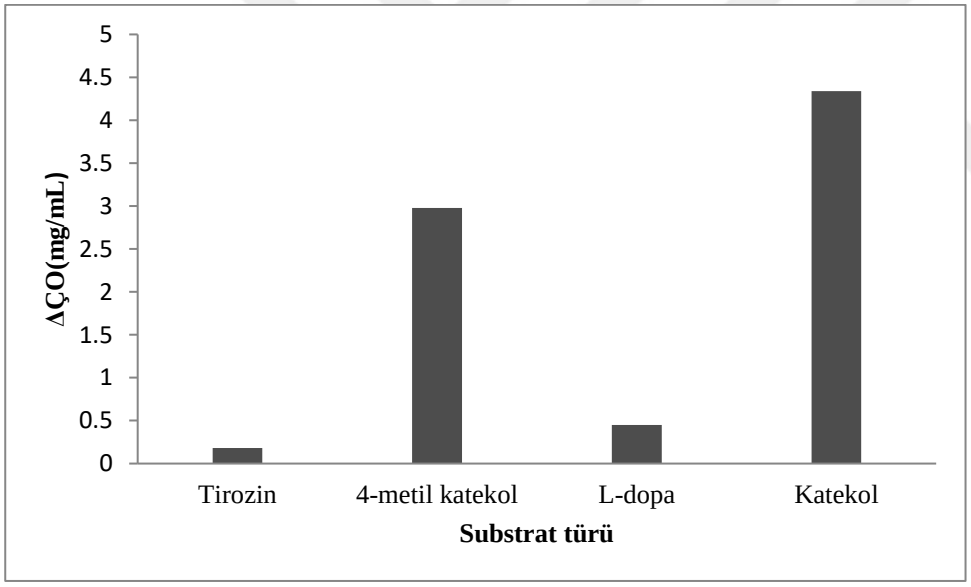
Bir biyosensör elektrodunun cevap zamanı elde edilen çözünmüş oksijen konst.-substrat türü eğrilerinden anlaşılabilir. Bu nedenle optimizasyon çalısmaları uygun görülen katekol ile yapıldı.



Şekil 4.1. Mısır püskülü için uygun substratın seçimi



Şekil 4.2. Biber tohumu için uygun substratın seçimi

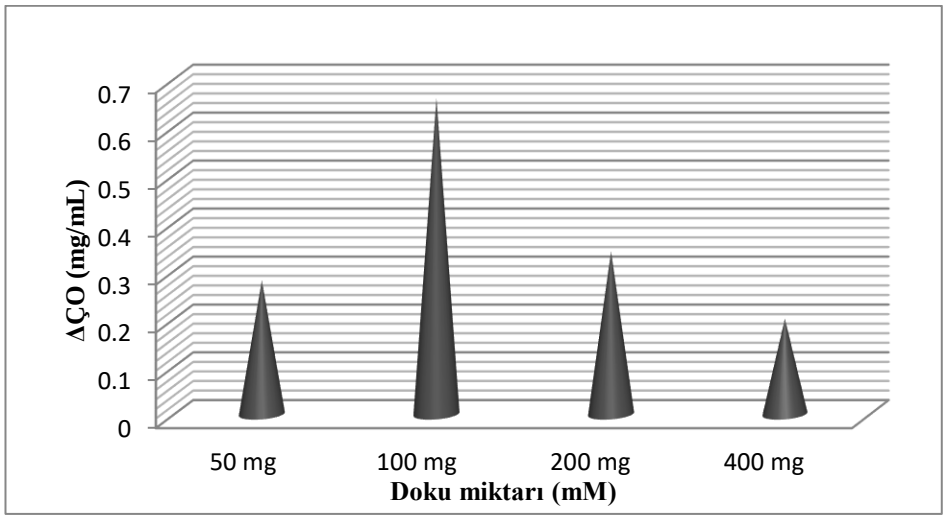


Şekil 4.3. Bakteri için uygun substratın seçimi

4.2. Biyosensörlerin Hazırlanma Koşullarının Optimizasyonuna Ait Bulgular

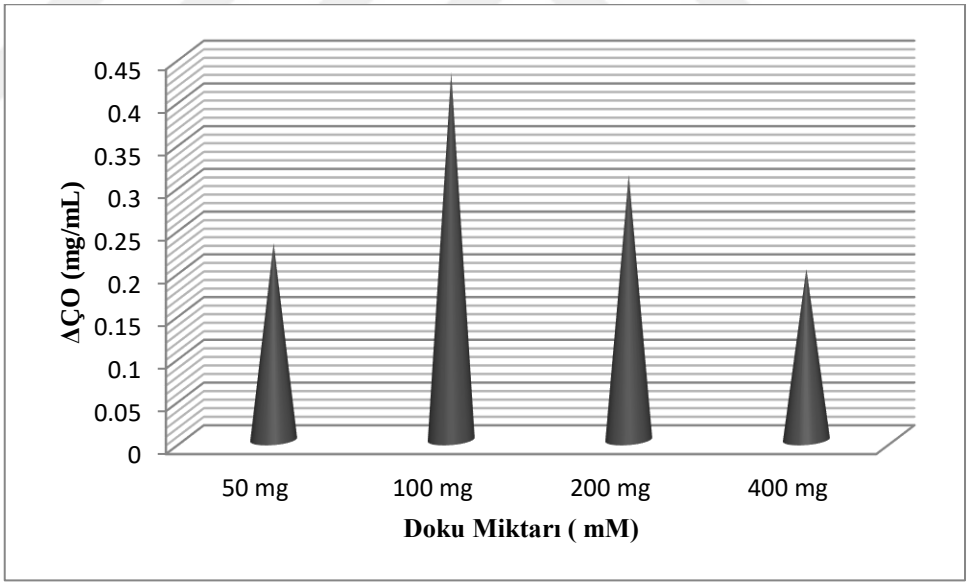
4.2.1. Uygun Doku Miktarının Tespit Edilmesi

Mısır püskülü dokusu homojenatı, biber tohumu dokusu homojenatı ve bakteri homojenatı miktarlarının biyosensör üzerine etkileri tespit edildi. Alınan ölçümler sonucunda elde edilen doku miktarları ile biyosensör cevabı arasındaki ilişki Şekil 4.4 ,Şekil 4.5 ve Şekil 4.6' da verildi.

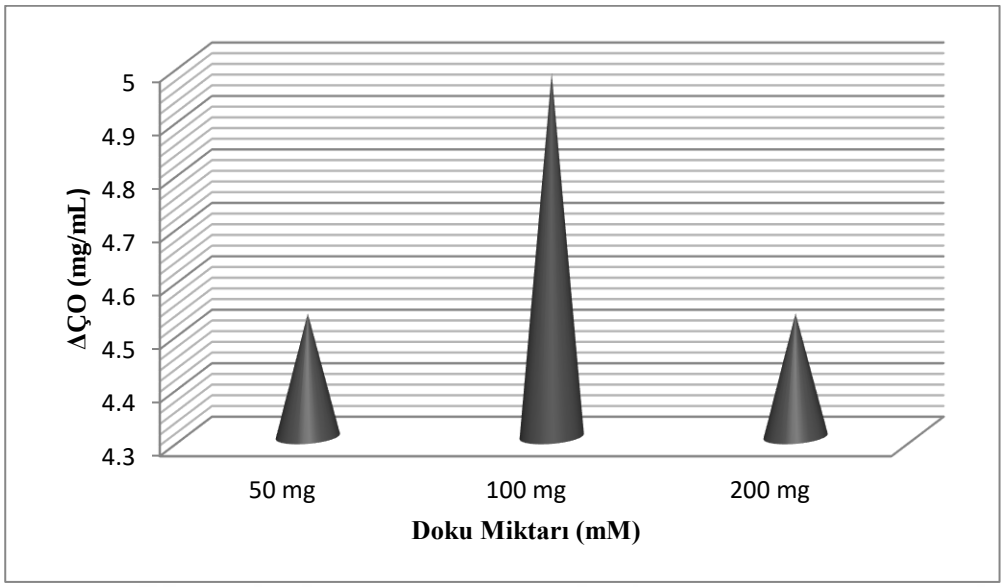


Şekil 4.4. Mısır püskülü biyosensörü için doku miktarının biyosensör cevabına etkisi

Tabakanın kalınlaşması difüzyon sorunlarına yol açabilir. Aynı zamanda doku miktarının artmasıyla protein miktarında ve bunun sonucunda glutaraldehitin meydana getirdiği çapraz bağ sayısında da artış meyydana gelir. Çapraz bağ sayısındaki artış enzimlerin aktif merkezlerinin etrafında sterik bir engel meydana getirir.



Şekil 4.5. Biber tohumu biyosensörü için doku miktarının biyosensör cevabına etkisi

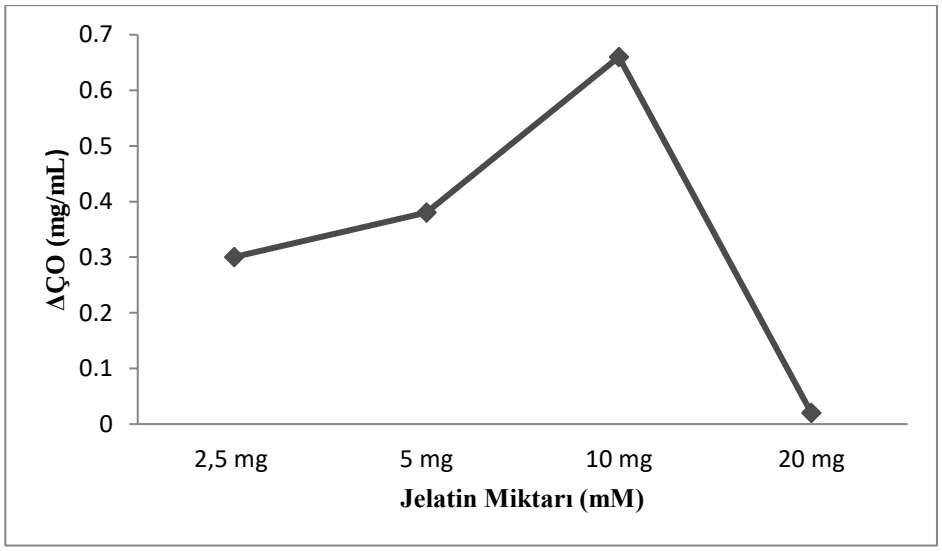


Şekil 4.6. Bakteri biyosensörü için özüt miktarının biyosensör cevabına etkisi

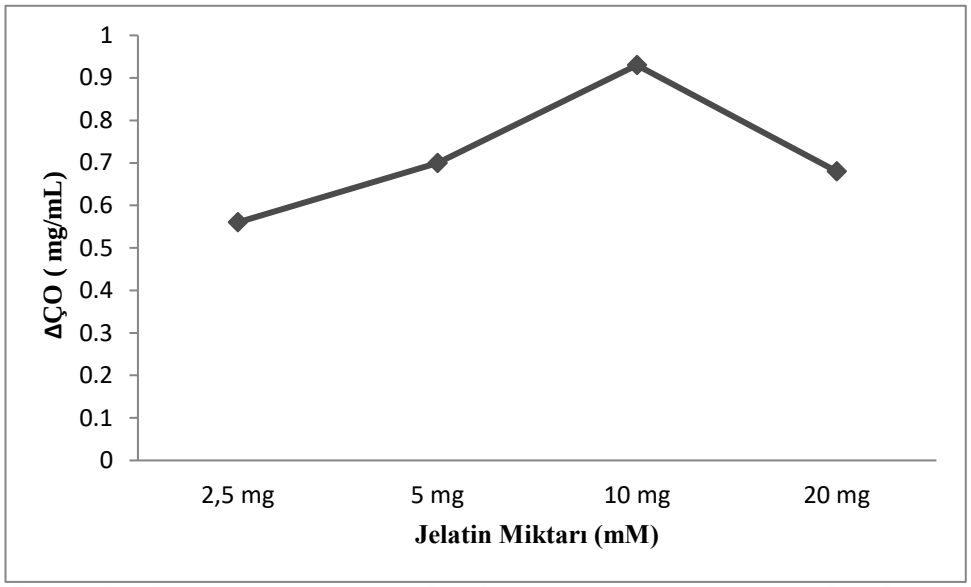
Grafiklere bakıldığında, mısır püskülü, biber tohumu ve bakteri biyosensörü için 100 mg/cm² özüt miktarlarının en uygun değerler olduğu gözlemlenmektedir.

4.2.2. Uygun Jelatin Miktarının Tespit Edilmesi

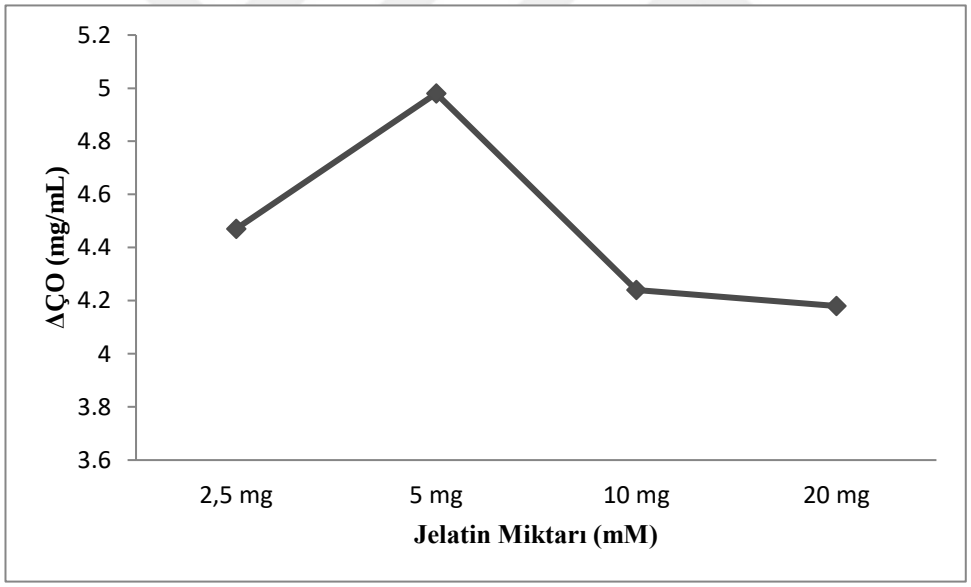
Jelatin miktarlarının biyosensör cevabına etkisi tespit edildi. Biyosensör oluşturulmasında kullanılan jelatin miktarları ile biyosensör cevapları arasındaki ilişki Şekil 4.7 Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.7. Mısır püskülü biyosensörü için jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi



Şekil 4.8. Biber tohumu biyosensörü için jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi

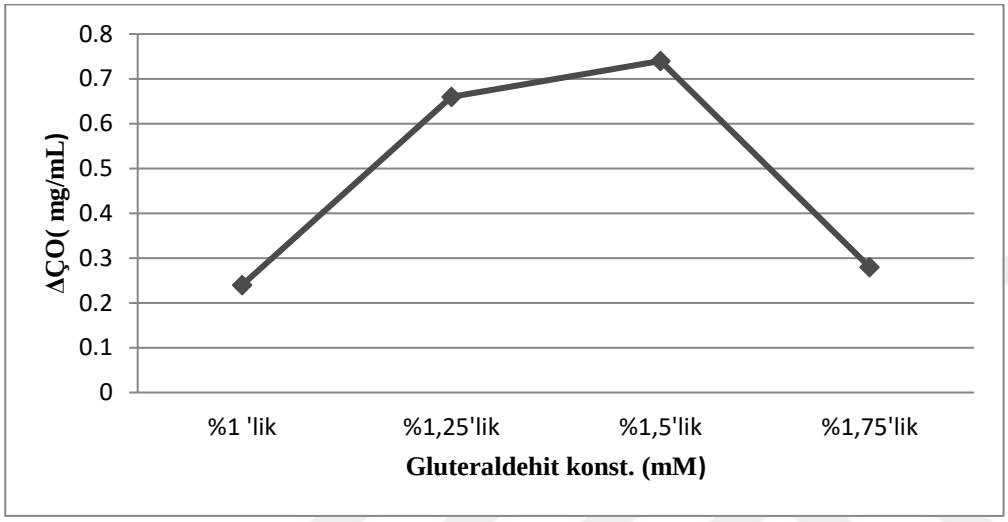


Şekil 4.9. *Pseudomonas putida* biyosensörü için jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi

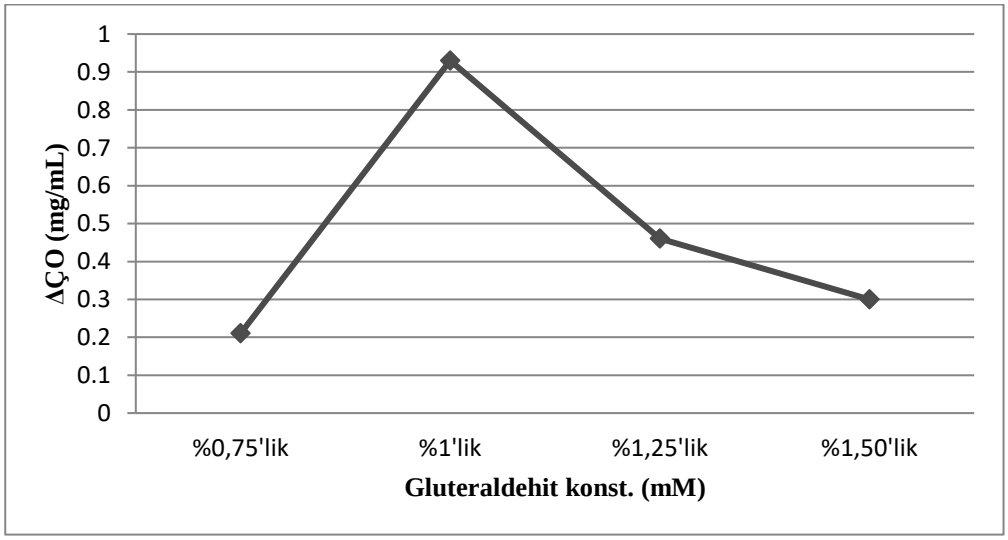
Jelatin miktarının optimizasyonunda mısır püskülü ve biber tohumu için 10 mg jelatin ile hazırlanan biyosensörlerde; bakteri için 5 mg jelatin ile hazırlanan örneklerin difüzyon engeli diğerleriyle kıyaslandığında daha düşük olduğu için yüksek konsantrasyonlar için yüksek biyosensör cevabı verdi ve konsantrasyon düşüşüyle orantılı bir azalış gözlemlendi. Bu nedenle optimum jelatin miktarı mısır püskülü ve biber tohumu için 10 mg; *Pseudomonas putida* için 5 mg olarak tespit edildi ve sonraki çalışmalarda bu jelatin miktarları kullanıldı.

4.2.3. Uygun Glutaraldehit Yüzdesinin Tespit Edilmesi

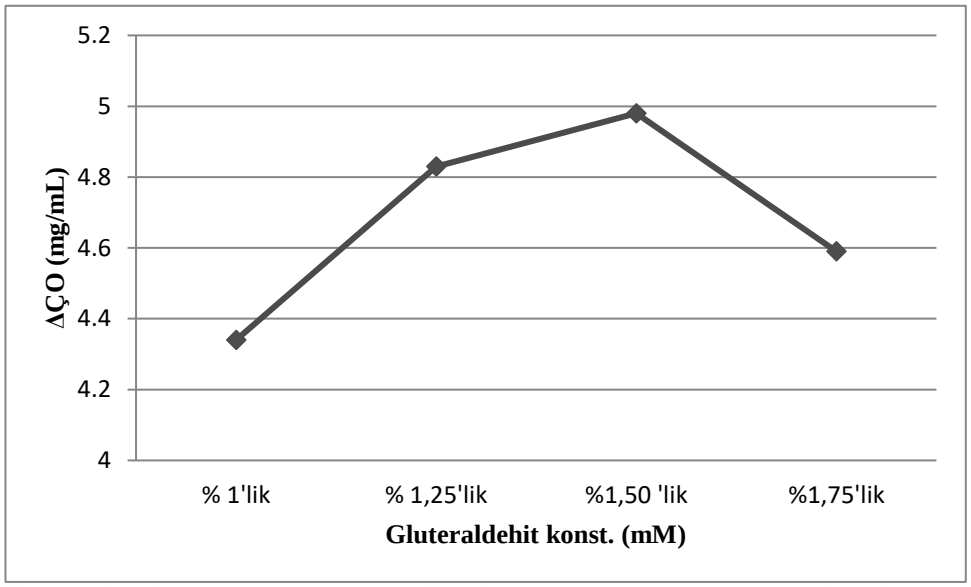
Optimum doku ve jelatin miktarları tespit edildikten sonra, glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevapları üzerine etkisinin tespiti için optimum doku miktarları ve jelatin miktarları değişen glutaraldehit yüzdeleriyle mısır püskülü, biber tohumu ve bakteri biyosensörleri oluşturuldu. Oluşturulan biyosensörler ile glutaraldehitin biyosensör cevabı üzerine etkisi araştırıldı. Sonuçlar Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de verildi.



Şekil 4.10. Mısır püskülü biyosensörü için glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi



Şekil 4.11. Biber tohumu biyosensörü için glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi



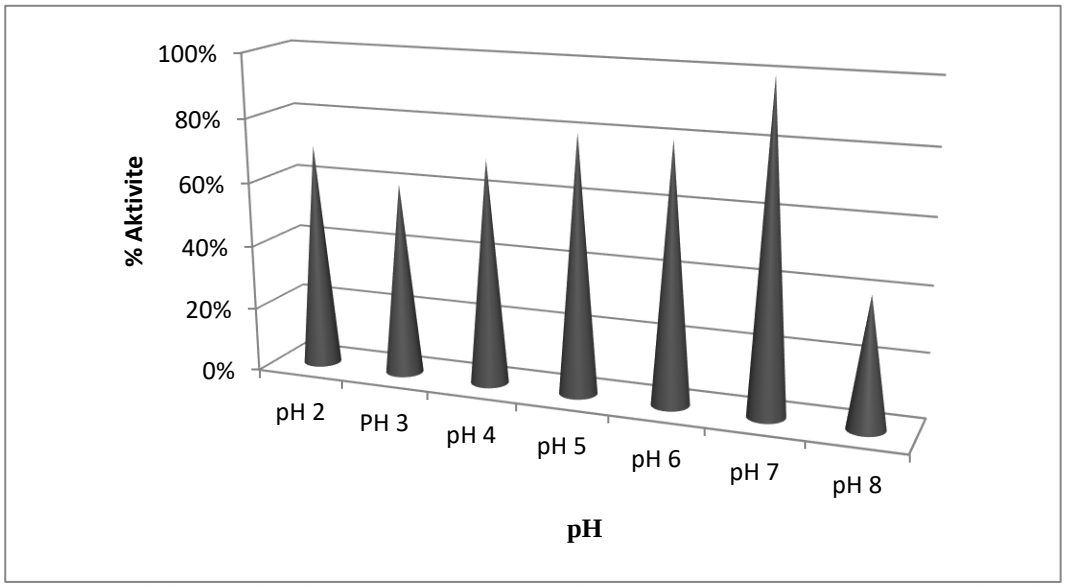
Şekil 4.12. *Pseudomonas putida* biyosensörü için glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi

Glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisini tespit etmek amacıyla yapılan ölçümlerde mısır püskülü ve *Pseudomonas putida* için; % 1'lik ve %1.25'lik glutaraldehitle hazırlanan biyoaktif tabakalar fiziksel olarak dayanıksızdı. Daha doğrusal biyosensör cevapları veren % 1.5'lik glutaraldehit mısır püskülü ve *Pseudomonas putida* için optimum olarak belirlenirken; biber tohumu için %1'lik guteraldehit optimum olarak tespit edidi. Daha sonraki çalışmalarda belirlenen oranlardaki glutaraldehit çözeltisi kullanıldı.

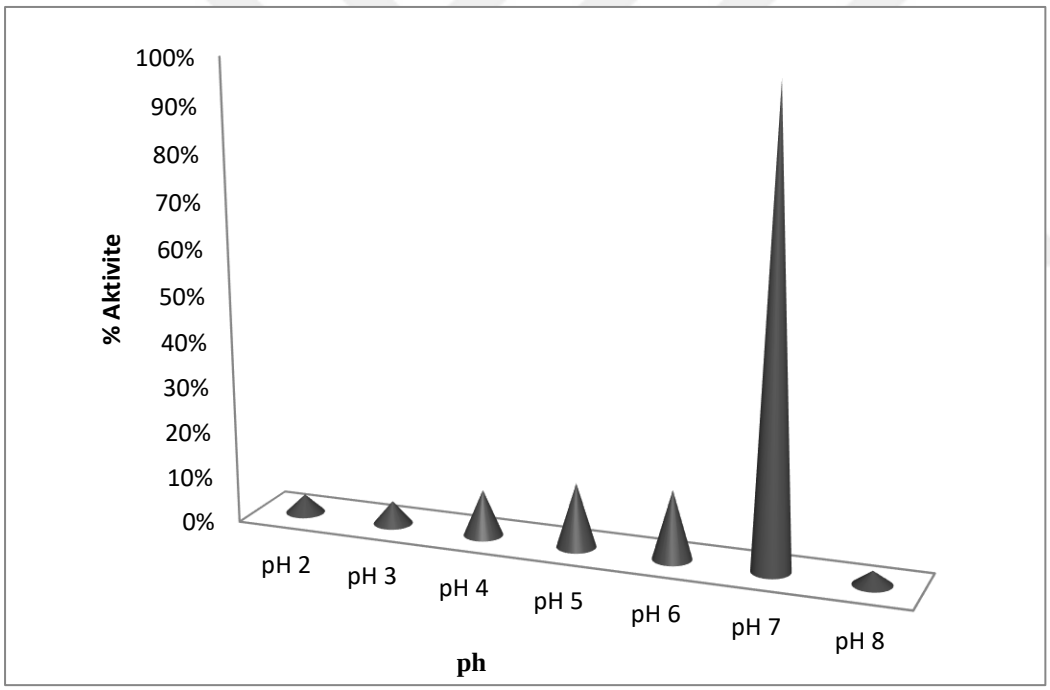
4.3. Biyosensörlerin Çalışma Koşullarının Optimizasyonuna Ait Bulgular

4.3.1. Optimum pH

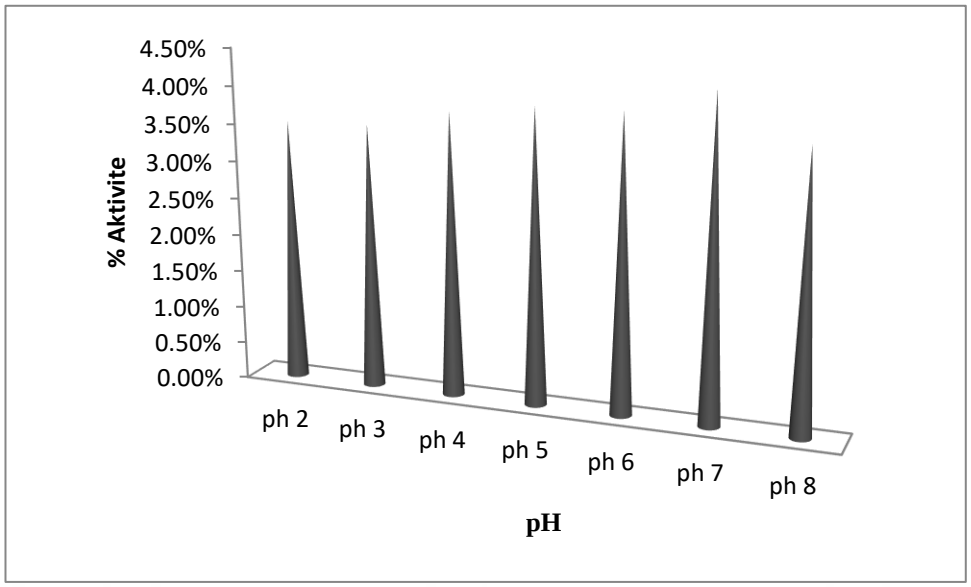
Mısır püskülü, biber tohumu ve *Pseudomonas putida* biyosensörlerinin biyoaktif tabaka ve immobilizasyon bileşenlerinin optimizasyonundan sonra, her biyosensörün optimum koşullarında yeni biyosensörler oluşturularak bu biyosensörlerin optimum pH ölçümleri gerçekleştirildi. Hazırlanan iki farklı bitkisel doku temelli ve bir mikrobiyal esaslı biyosensörlerle gerçekleştirilen ölçümlerde biyosensörlerin en iyi cevabı pH 7.0 değerinde verdikleri gözlendi. Sonuçlar Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15' te verildi.



Şekil 4.13. Mısır püskülü biyosensörü için optimum pH grafiği



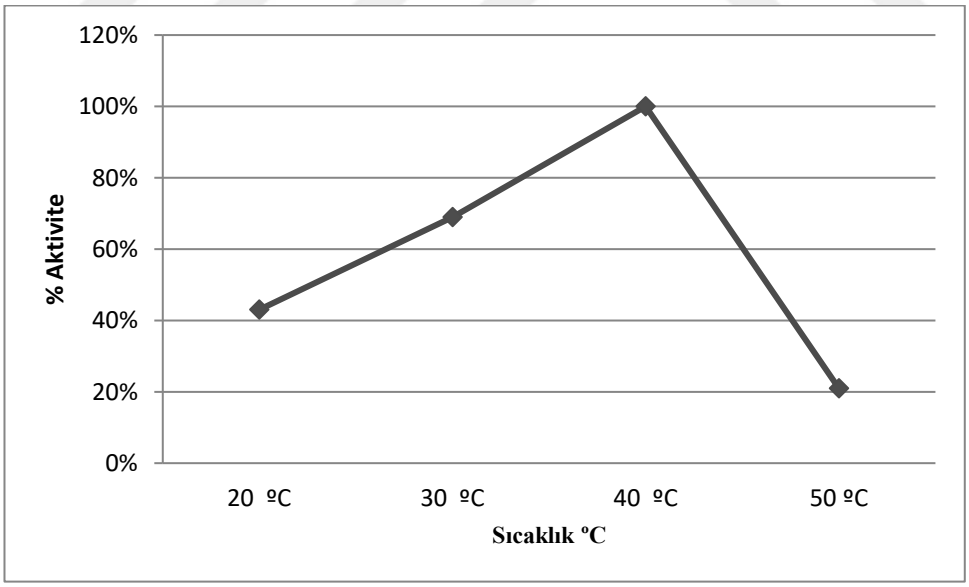
Şekil 4.14. Biber tohumu biyosensörü için optimum pH grafiği



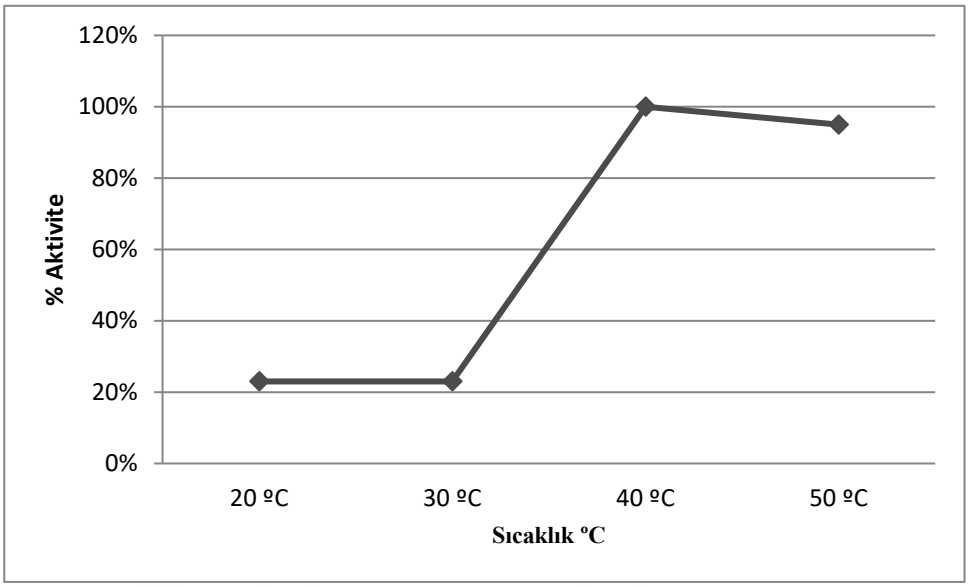
Şekil 4.15. Bakteri biyosensörü için optimum pH grafiği

4.3.2. Optimum Sıcaklık

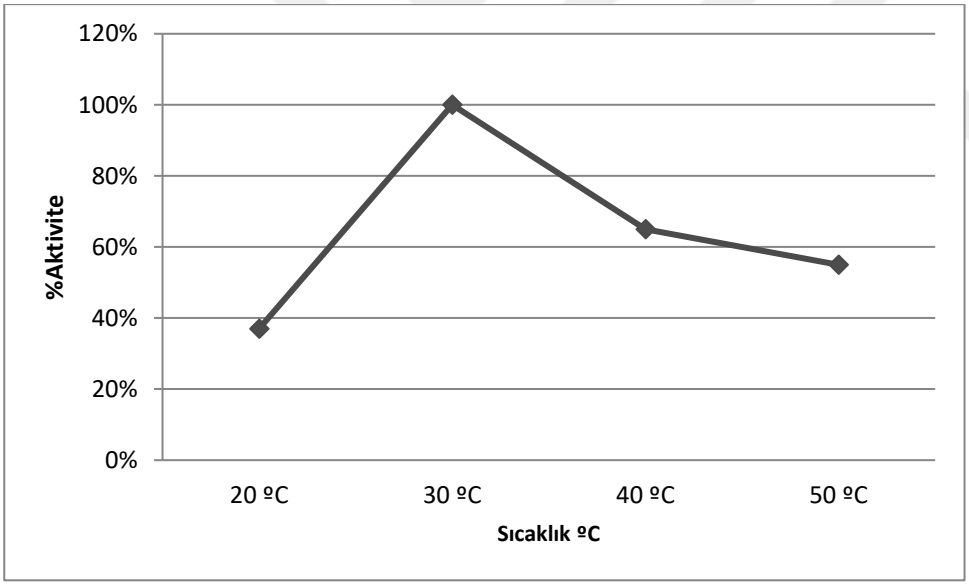
Çalışma koşulları optimizasyonun son basamağı olan bu bölümde biyoaktif bileşenlerle oluşturulan biyosensörlerle 20-30-40 ve 50 ºC'lerde ölçümler yapılarak sıcaklığın biyosensör cevabı üzerine etkisi tespit edidi. Sonuçlar Şekil 4.16, Şekil 4.17 ve Şekil 4.18' de verildi.



Şekil 4.16. Mısır püskülü biyosensörü için optimum sıcaklık grafiği



Şekil 4.17. Biber tohumu biyosensörü için optimum sıcaklık grafiği



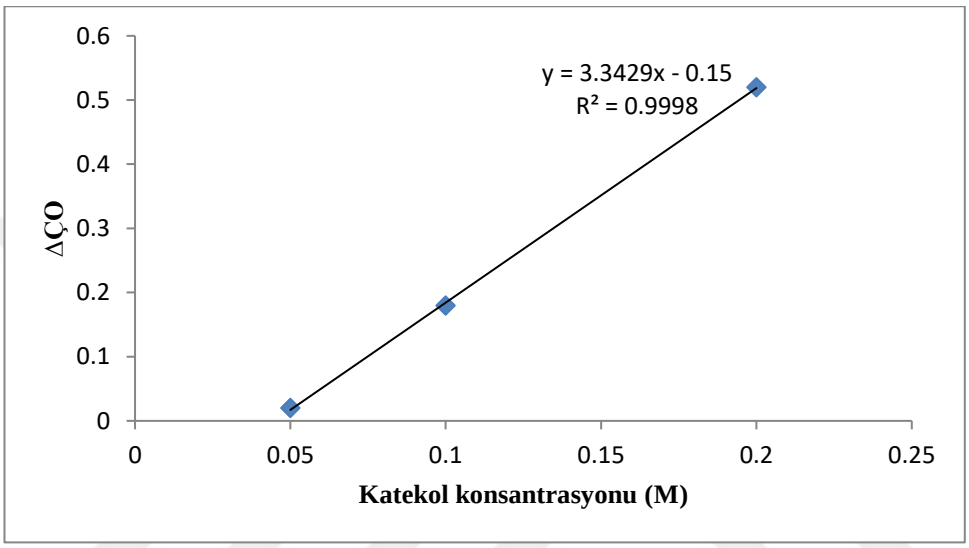
Şekil 4.18. Bakteri biyosensörü için optimum sıcaklık grafiği

Şekil 4.16, Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'den de anlaşılacağı gibi biyosensör cevabında mısır püskülü ve biber tohumu biyosensörlerinde sıcaklık artışı 40 ºC'ye kadar devam ederken bakteri biyosensöründe 30 ºC'ye kadar devam edip devamındaki sıcaklıklarda azalma meydena geldiği tespit edildi. Sıcaklık artışı çözünmüş oksijen konsantrasyonlarında azalmalara neden olmakta ve biyosensör cevaplarında da azalmalar görülmektedir.

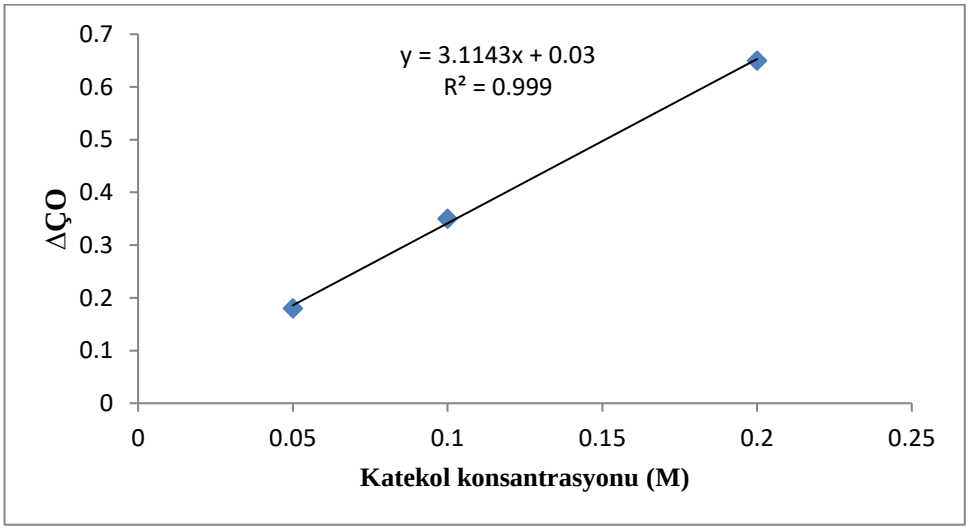
4.4. Biyosensörlerin Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

4.4.1. Doğrusal Ölçüm Aralığının Tespiti

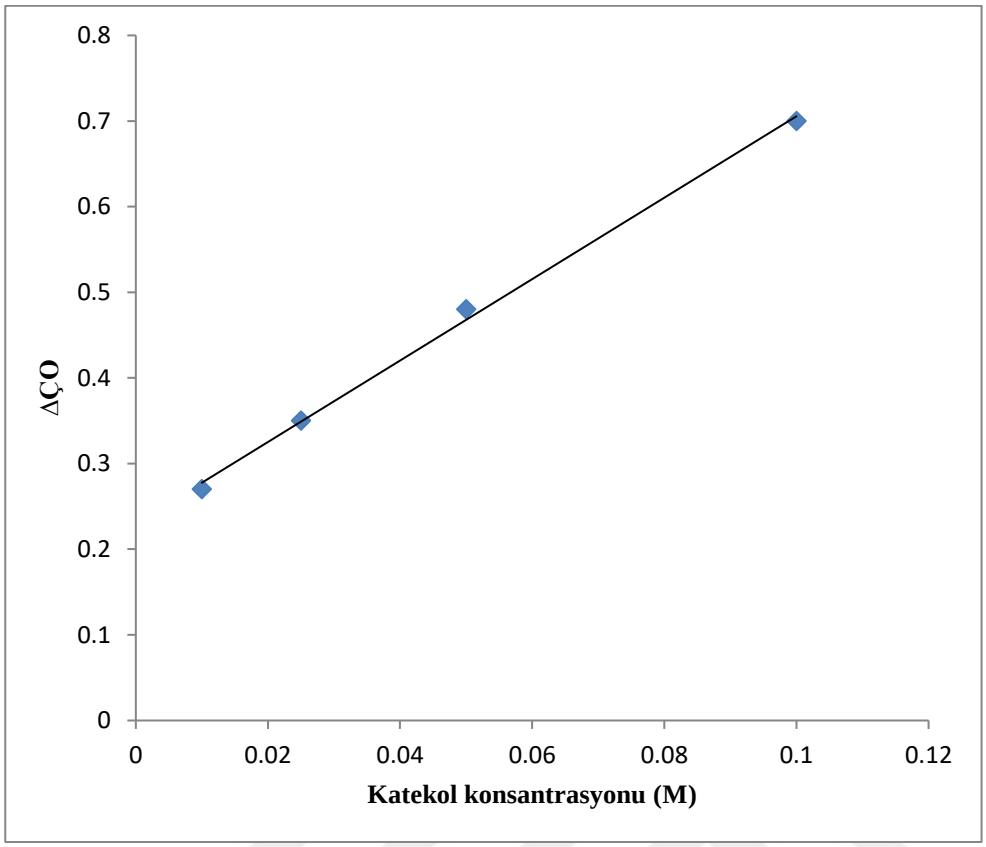
Biyoaktif bileşenlerin farklı substrat miktarlarında biyosensör cevaplarını belirlemek ve katekol standart grafiklerini tespit etmek için, katekolün farklı konsantrasyonları kullanılarak biyosensör cevapları tespit edildi. Optimum çalışma koşullarında yapılan ölçümlerden alınan sonuçlar Şekil 4.19, Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de verildi.



Şekil 4.19. Mısır püskülü biyosensörü için katekol kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.20. Biber tohumu biyosensörü için katekol kalibrasyon eğrisi

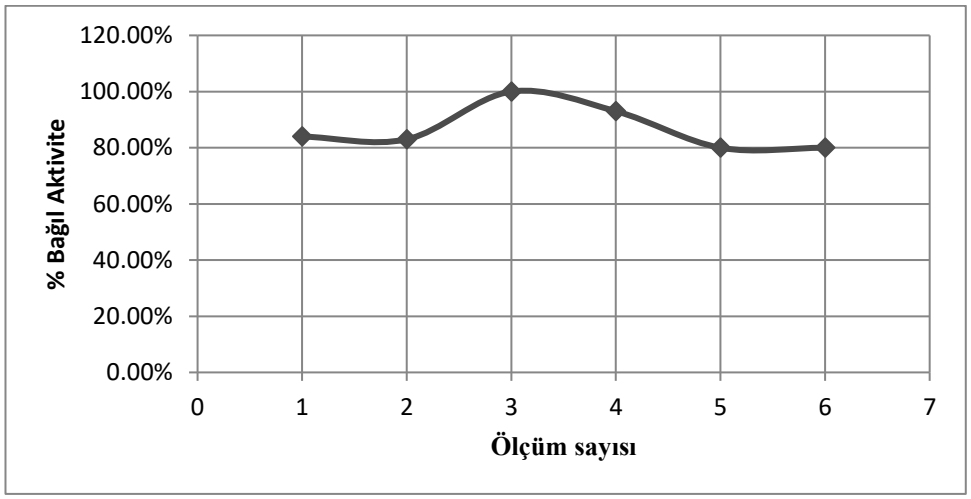


Şekil 4.21. Bakteri biyosensörü için katekol kalibrasyon eğrisi

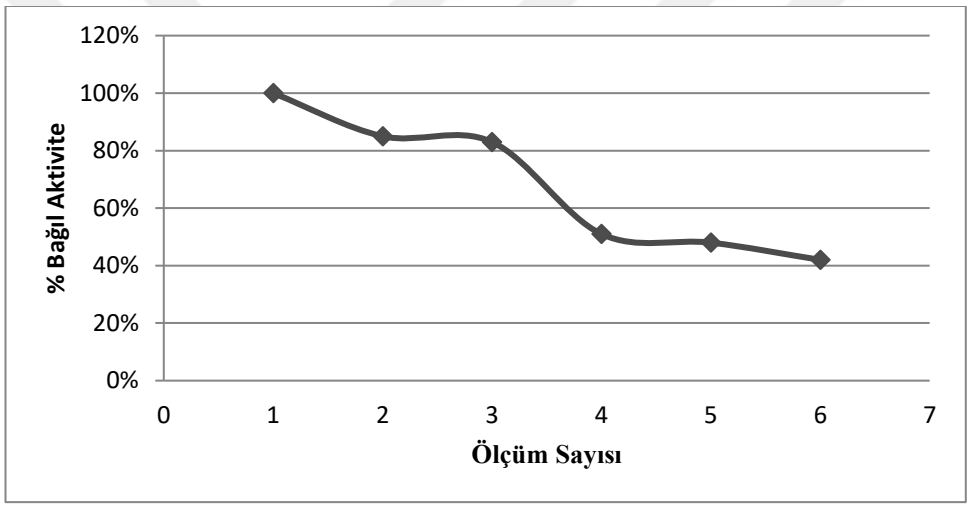
Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'de görüldüğü gibi mısır püskülü ve biber tohumu biyosensörü ile katekol tayin sınırları 0.05-0.2 M, Şekil 4.21'de görüldüğü gibi bakteri biyosensörü için katekol tayin sınırları 0,01- 0,1 M olarak belirlendi. Geliştirilen biyosensörlerden bitkisel doku esaslı olmaların mikrobiya esaslı olana göre daha geniş katekol tayin aralığına sahip olması, mikrobiyal esaslı biyosensörün ise daha düşük katekol konstrasyonları bakımından hassasiyeti bir avantajdır. Literatür incelendiğinde katekole olan duyarlılığın diğer fenolik bileşiklere karşı olan duyarlılıktan daha fazla olduğu görülmüştür (Çil 2014, Tsai ve Chiu 2007).

4.4.2. İşlem Kararlılığı

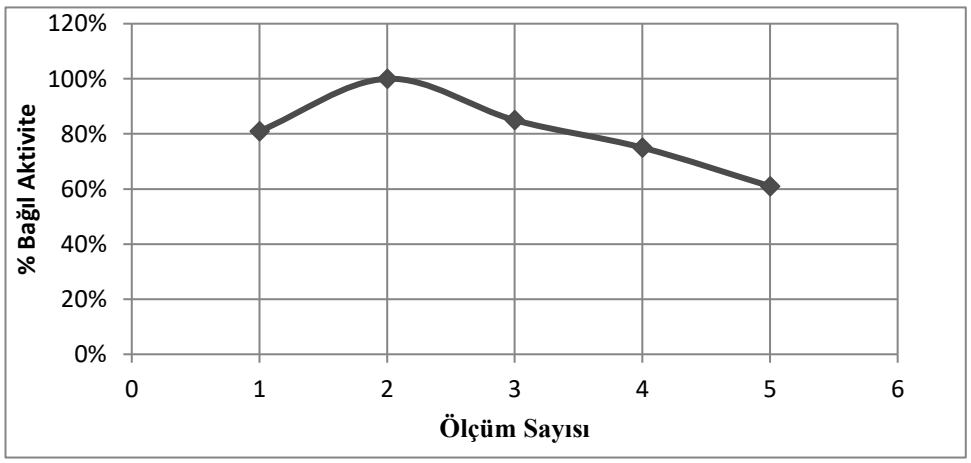
Bitki dokusu temelli ve bakteri esaslı biyosensörlerle yapılan biyosensörlerin tekrarlanabilirliği tespit etmek için, sabit katekol konsantrasyonlarında mısır püskülü ve biber tohumu biyosensörleriyle arka arkaya 6 ölçüm, bakteri için 5 ölçüm yapıldı. Elde edilen biyosensör cevapları Şekil 4.22, Şekil 4.23 ve Şekil 4.24'te verildi.



Şekil 4.22. Mısır püskülü biyosensörü için işlem kararlılığı



Şekil 4.23. Biber tohumu biyosensörü için işlem kararlılığı

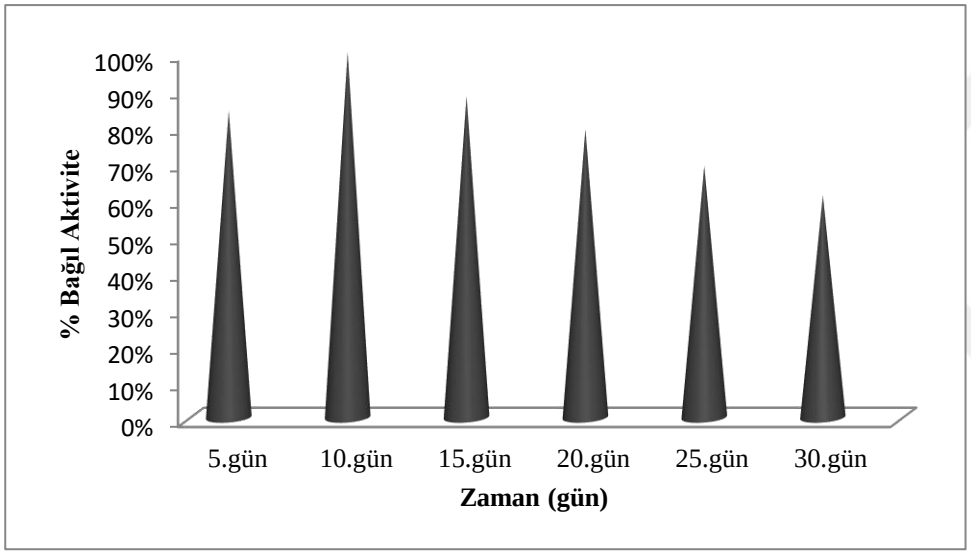


Şekil 4.24. Bakteri biyosensörü için işlem kararlılığı

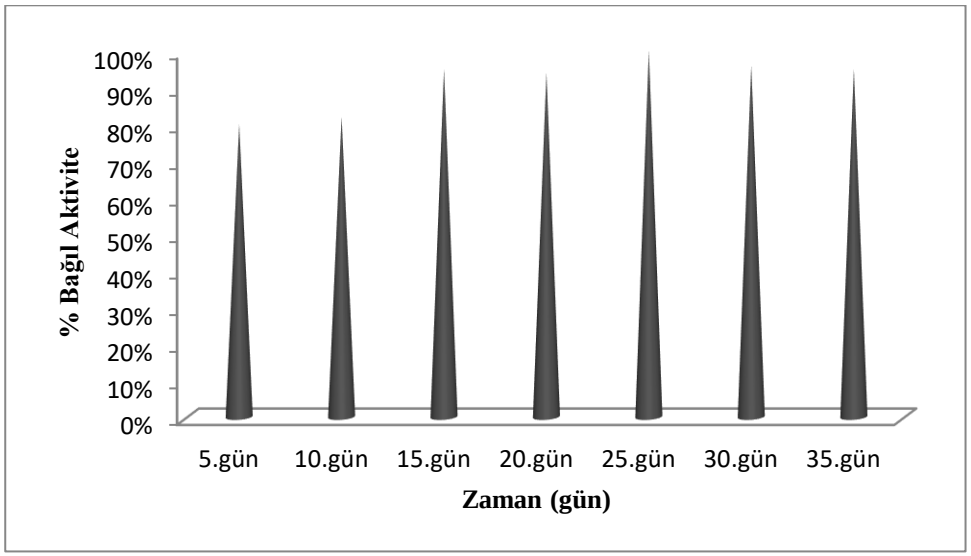
Şekil 4.22'de görüldüğü gibi mısır püskülü biyosensörünün 5 ölçüm sonunda aktivitesini yaklaşık %80 koruduğu ; Şekil 4.23 ve Şekil 4.24'ten anlaşılabileceği gibi biber tohumu ve bakteri biyosensörünün ise 3. ölçüm sonunda aktivitesini yaklaşık %80 oranında koruduğu tespit edildi.

4.4.3. Raf Ömrü

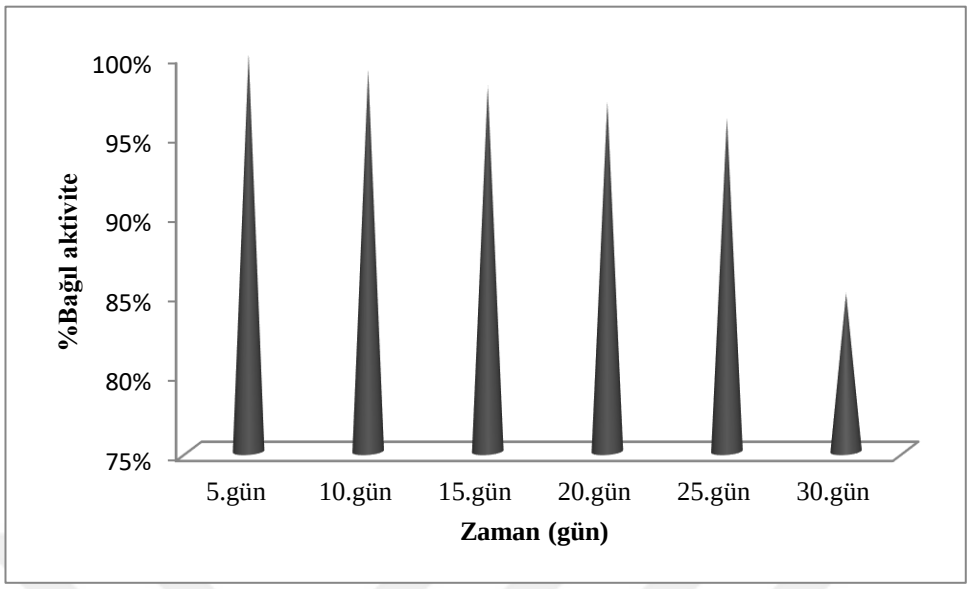
Biyosensörlerle yapılan analizlerin raf ömrünü tespiti için, sabit katekol konsantrasyonlarında mısır püskülü biyosensörü ile 6, biber tohumu biyosensörü ile 7 ve bakteri biyosensörü ile 6 ölçüm gerçekleştirildi. Elde edilen biyosensör cevapları Şekil 4.25, Şekil 4.26 ve Şekil 4.27'de verildi.



Şekil 4.25. Mısır püskülü biyosensörü için depo kararlılığı



Şekil 4.26. Biber tohumu biyosensörü için depo kararlılığı



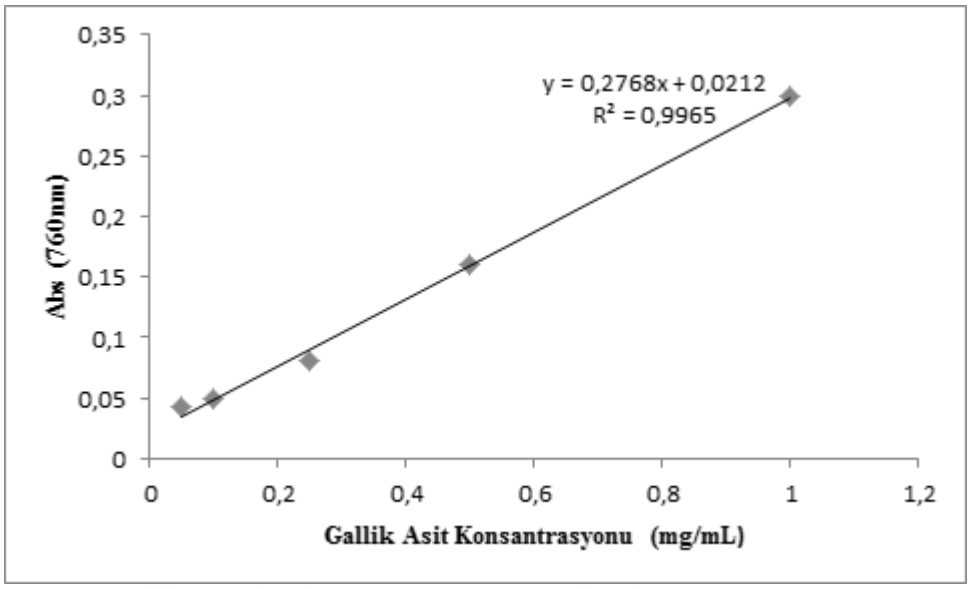
Şekil 4.27. Bakteri biyosensörü için depo kararlılığı

Şekil 4.25'ten anlaşılacağı gibi mısır püskülü biyosensörünün 20 günlük süre sonunda aktivitesini %80 oranında koruduğu, Şekil 4.26'da görüldüğü gibi biber tohumu biyosensörünün 30 günlük süre sonunda aktivitesini %90 oranında koruduğu; bakteri biyosensörünün ise 30 günlük süre sonunda aktivitesini %85 oranında koruduğu tespit edildi.

4.4.4. Gerçek Numune Analizi

Geliştirilen bitki dokusu ve bakteri esaslı biyosensör ile gerçek örneklerde fenol miktarı tespit edilmeye çalışıldı. Ölçüm için Elazığ İli Maden ilçesindeki Bakır işletmesi yakınındaki atık su numunesi ve ticari olarak temin edilen elma suyu kullanıldı.

Bunun için ilk etapta standart fenol çözeltileri için kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Daha sonra sensörle ile elma suyu ve göl suyunun ölçümleri alındı. Elma suyunun ve su numunesinin içerdiği fenol miktarı çizilen kalibrasyon grafiklerinden yararlanılarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1., Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.3.'te verildi.



Şekil 4.28. Gallik asit standart grafiği

Çizelge 4.1. Mısır püskülü biyosensörü ile fenol tayini

Numune	**Total fenol miktarı (mM)**	**Biyosensör ile ölçülen (mM)**	**Doğruluk (%)**
Elma suyu	6	5,4	90
Atık su	12	10,30	86

Çizelge 4.2. Biber tohumu biyosensörü ile fenol tayini

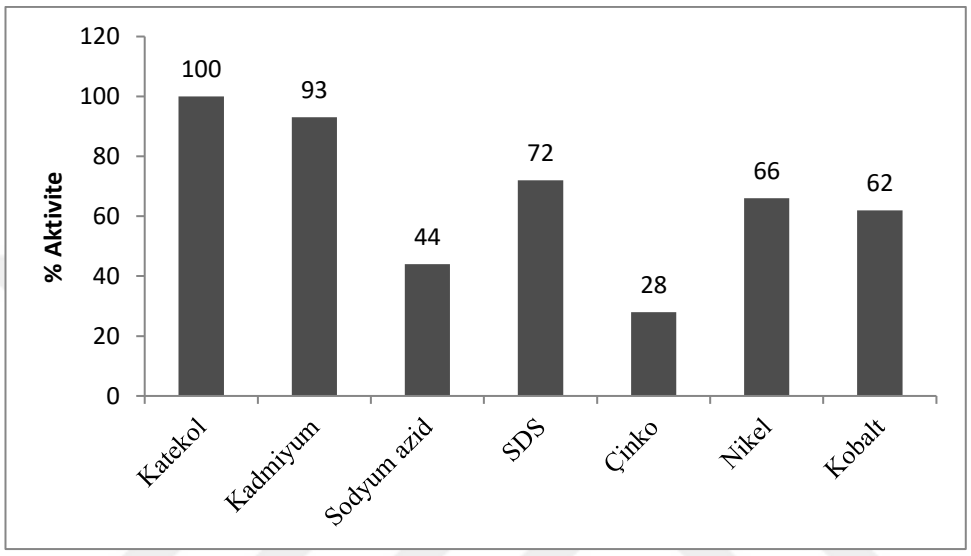
Numune	**Total fenol miktarı (mM)**	**Biyosensör ile ölçülen (mM)**	**Doğruluk (%)**
Elma suyu	6	4,21	70
Atık su	12	11,04	92

Çizelge 4.3. Bakteri biyosensörü ile fenol tayini

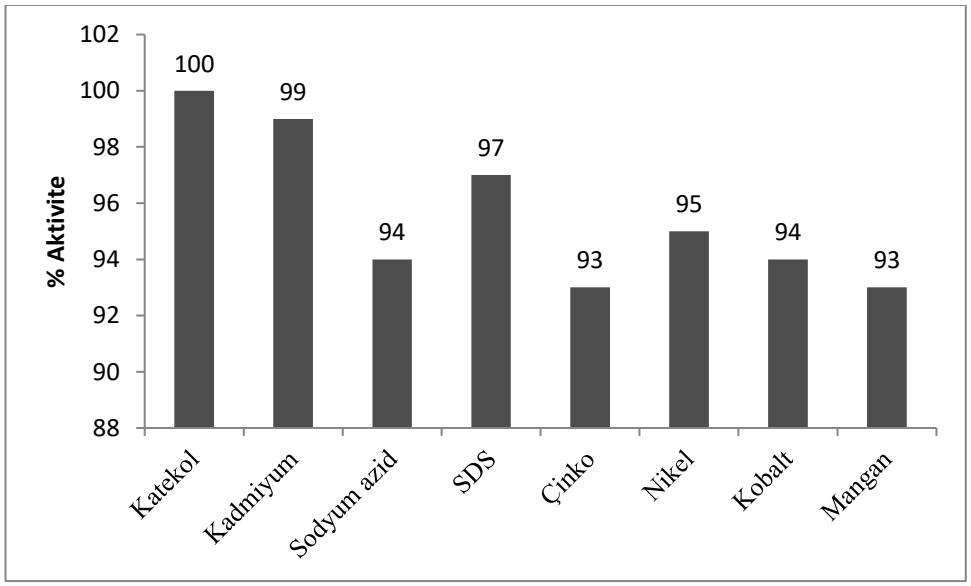
Numune	**Total fenol miktarı (mM)**	**Biyosensör ile ölçülen (mM)**	**Doğruluk (%)**
Elma suyu	6	5,22	87
Atık su	12	10,18	85

4.4.5. Biyosensörlerin Cevabı Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi

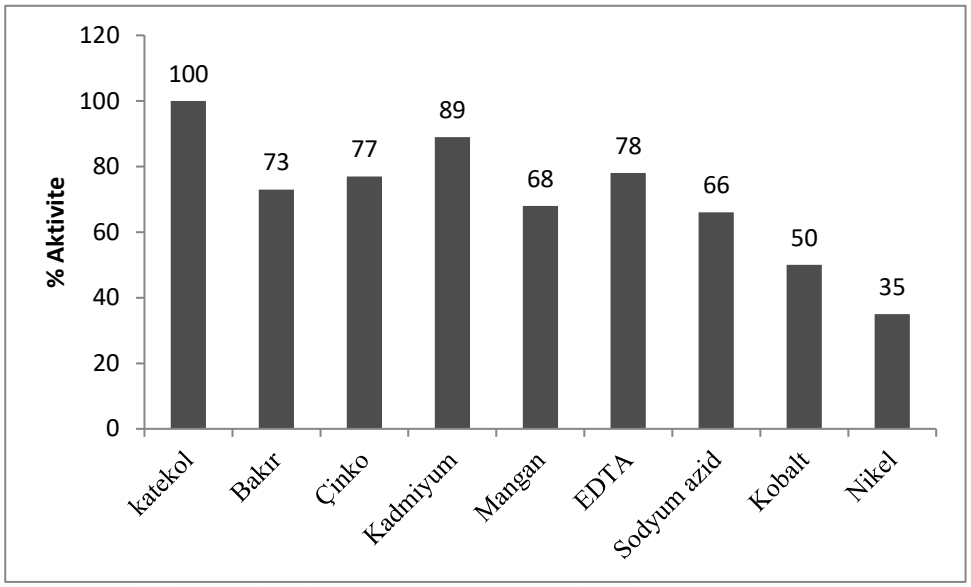
Bitkisel doku temelli ve bakteri temelli biyosensörlerle, polifenol oksidaz enzimi için inhibitör olma ihtimali olan çinko, nikel, bakır, EDTA, mangan, kadmiyum ve sodyum azid etkisinin tespiti için bu maddeler reaksiyon ortamına eklenerek yapılan ölçümlerle inhibisyon yüzdeleri belirlendi. Sonuçlar mısır püskülü biyosensörü için Şekil 4.31'de biber tohumu biyosensörü için Şekil 4.32'de ve bakteri biyosensörü için Şekil 4.33'te verildi.



Şekil 4.29. Mısır Püskülü biyosensörü için inhibitör denemeleri



Şekil 4.30. Biber tohumu biyosensörü için inhibitör denemeleri



Şekil 4.31. Bakteri biyosensörü için inhibitör denemeleri

Şekil 4.31'de görüldüğü gibi mısır püskülü için çinko; Şekil 4.32'de görüldüğü gibi biber tohumu için çinko ve mangan; Şekil 4.33'te görüldüğü gibi bakteri için nikel varlığında en fazla inhibisyon gerçekleştirildi. Sensörlerin kimyasal maddelerden düşük düzeyde etkilenmeleri her üç biyosensör için bir avantaj olarak değerlendirebilir

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Fenolik bileşiklerin tayinleri için gaz kromatografi ve spektrofotometri gibi yöntemler mevcuttur (Bagheri ve ark. 2004, Lupetti ve ark. 2004, Faraji 2005). Bu yöntemler, polifenol oksidazların kullanıldığı fenolik bileşiklerin tespiti için kullanılan metotlardır. Fakat bu yöntemler maliyeti yüksek ekipman, kimyasallara gerek duyan ve zaman alıcı metotlardır. Son zamnlarda bu metodlar yerine fenolik bileşiklerin tespiti için hızlı sonuç veren ve maliyeti az olan biyosensörlerin kullanıldığı görülmektedir.

Tezde substrat olarak fenolik bileşikleri kullanan polifenol oksidaz enzimi aktivitesine sahip mısır püskülü, biber tohumu ve *Pseudomonas putida* bakterisi kullanılarak biyosensörler geliştirildi. Mısır püskülü, biber tohumu ve *Pseudomonas putida* oksijen elektrodu yüzeyine immobilize edilip geliştirilen biyosensörlerin optimizasyon koşulları, karakterizasyon kriterleri, farklı fenolik bileşiklere uygulanabilirliği, bazı kimyasalların etki etme oranları ve gerçek örneklerde fenolik bileşik tespiti için kullanılabilirlikleri incelendi.

Literatür incelendiğinde biyosensör geliştirmede mikroorganizmaların ve bitkilerin kullanıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. C*andida tropicalis* kullanarak etanol tayini için hazırlanmış bir biyosensör çalısması (Akyılmaz ve Dinçkaya, 2004) ve *Pseudomunas putida* kullanarak fenolik bilesiklerin tayini için hazırlanmıs bir biyosensör çalışması (Timur ve ark. 2003), B1 vitaminin tespiti için S*accharomyces cerevisiae* kullanan bir biyosensör çalışması (Akyılmaz ve ark. 2006), fosfat tespiti için L*actobacillus brevis* bakterisi kullanılarak hazırlanan bir biyosensör çalışması (Hüwel ve ark. 1997) mevcuttur.

Özcan (2010) tarafından yapılan çalışmada polifenoloksidaz enzimi bakımından zengin olan taze bakla ve Anamur muzu kabuğu kullanılarak fenolik bileşik tespiti amacıyla doku temelli biyosensörler geliştirilmiştir. Odacı ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmada ise fenolik bileşiklerin tayini için şeftali dokusunun kullanıldığı biyosensör geliştirildiği görülmektedir.

Çalışmada biyosensörlerin geliştirilmesi için optimum doku miktarı, jelatin miktarı ve gluteraldehit yüzdesi bütün biyobileşenlerde belirlendi. Mısır püskülü , biber tohumu ve bakteri biyosensörleri için sırasıyla 100 mg/cm^2 doku veya bakteri özütü, 10, 10, 5 mg/cm^2 jelatin ve glutaraldehit miktarı (g/mL) her biyosensör için % 1.5, %1 ve %1.5 olarak belirlendi. Literatüre bakıldığında immobilizasyon çalışmasında tespit ettiğimiz optimum glutaraldehit ve jelatin değerlerinin uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Örneğin glutationun tespiti için geliştirilmiş salatalık dokusu esaslı biyosensörde optimum glutaraldehit miktarı % 2.5 olarak tespit edilmiştir (Sezgintürk ve Dinçkaya 2004). Fenolik bileşiklerin tespiti için geliştirilmiş olan Muz kabuğu ve taze bakla biyosensörlerinde ise glutaraldehit konsantrasyonu (g/mL) %

1.25 olarak bulunmuştur (Özcan 2010). Biyoaktif tabakanın optimizasyonunda BSA miktarı için hazırlanan biyosensörde, jelatin miktarı ve glutaraldehit yüzdesi sırasıyla 0.030 gr, 0.45 gr ve % 2.5 olarak tespit edilmiştir (Kartlaşmış 2017).

Çalışmada her üç biyosensör için optimum pH 7.0 tespit edildi. Literatürde fenolik bileşik tayinine yönelik, altın- grafen - kitosan ve tirozinaz bağlı biyosensörün ve Tyr-AuNPs/BDD temelli biyosensörünün ve karbon nanotüp katkılı biyosensörün optimum sıcaklığı PH 7.0 olduğu görülmektedir (Fartas ve ark. 2017, Janegitz 2012, Kılıç ve Korkut 2016). Aynı şekilde Polifenol Oksidaz enzimi esaslı biyosensörlerde optimum pH'ın 7.5- 8 arasında bulunduğu bildirilmiştir (Akyılmaz ve Dinçkaya 2004). .

Sıcaklık optimizasyonu çalışmalarında; mısır püskülü biyosensörü için 40 ºC, biber tohumu biyosensörü için 40 ºC, bakteri biyosensörü için 30 ºC optimum olarak belirlendi. Literatürde fenolik bileşik tayinine yönelik çalışmalar incelendiğinde, geliştirilmiş olan katı-hal kompozit pH sensörlerin yüzeyine polifenol oksidaz enziminin immobilizasyonuyla fenollere duyarlı biyosensörün optimum sıcaklığının 20 ºC olduğu, bakla biyosensörünün 37.5 ^{0} C muz kabuğu ve yer elması biyosensörünün 35 º C, laktik asit bakterilerinin kullanıldığı biyosensörün 37,5 ºC olduğu görülmüştür (Çil 2014, Odacı 2004, Özcan 2010, Palüzar 2009).

Optimum çalışma koşullarında, mısır püskülü biyosensörü için 0.05-0.2 M, biber tohumu biyosensörü için 0.05-0.2 M, bakteri biyosensörü için 0.01-0.1 M katekol aralığı, lineer ölçüm aralıkları olarak tespit edildi. Literatürde bakıldığında tirosinaz enzimi kullanarak fenolik bileşik tespitine yönelik gelişrilmiş olan biyosensörün linner aralığı 0.5-30 µM olarak bulunmuştur (Zejli ve ark. 2008). *Musa acuminata'*dan ekstrakte edilen ve kovalent bağla immobilize edilmiş tirosinaz kullanan potansiyometrik biyosensörün lineer aralığı $9.3x10^{-7}$ M ve $8.3x10^{-2}$ M olarak tespit edilmiştir (Draghi ve Fernantes 2016). Sezgintürk ve Dinçkaya (2004) tarafından yapılan çalışmada ise lineer aralık 0.1 and 2 µM arasında tespit edilmiştir. Camsı karbon elektrot üzerine tirozinaz bağlı grafen oksit ile modifiye edilmiş fenol tespiti için gelilştirilmiş biyosensörün katekol için lineer aralığının 5.0×10^{-8} to $5.0 \times \times 10^{-5}$ M olduğu görülmektedir (Wang ve ark. 2018).

Biyosensörlerin kararlılıkları ise substratın sabit miktarlarına karşı kaç defa doğru ölçüm yapılabileceğini belirleyemek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla; mısır püskülü biyosensörü ile arka arkaya 6, biber tohumu biyosensörü 6 ve bakteri biyosensörü ile 5 defa aynı konsantrasyonda ölçüm yapıldı. Biyosensörlerin işlem kararlılığının tespiti amacıyla yapılan çalışmalarda, mısır püskülü biyosensörünün 30 dk. aralıklarla 6 ölçümden sonra % 80 oranında, biber tohumu biyosensörünün 30 dk. aralıklarla 6 ölçümden sonra %40 oranında, *Pseudomonas putida* biyosensörünün 30 dk. aralıklarla 5 ölçümden sonra %60 oranında aktivitelerini devam ettirdikleri görüldü. Yapılan ölçümler her üç biyosensörün de yaklaşık 5 ölçüm için işlemsel

olarak kararlılıklarını sürdürdüklerini ifade edebiliriz. Literatüre bakıldığında muz kabuğu biyosensörünün 30 dk. aralıklarla 6 ölçüm sonunda % 98, bakterilerle geliştirilen biyosensörün 7 ölçüme kadar aktivite kaybının olmadığı, sonraki ölçümlerde ise yaklaşık % 20 aktivite kaybı olduğu görülmektedir (Özcan 2010, Palüzar 2009).

Depo kararlılığı çalışmalarında; mısır püskülü biyosensörü 30 günlük zamanın sonunda aktivitesini %60 oranında korumakta iken biber tohumu biyosensörü yaklaşık 35 günlük zaman dilimi sonunda aktivitesini %90 oranında korumakta; ayrıca bakteri biyosensörü ise 30 günlük zaman dilimi sonuncunda aktivitesini %85 orannında korumaktadır. Literatürde bakıldığında kolesterol tespiti için geliştirilen amperometrik biyosensörün 20 ölçüm sonunda aktivitesini %35 oranında koruduğunu gözlemlemiştir ve 78 gün sonunda başlangıç amperometrik cevabının yaklaşık %73' sini kaybettiğini görülmüştür (Yıldırımoğlu 2009).

Katekolün dışında mısır püskülü ve biber tohumu için 2 farklı fenolik bileşik, bakteri için ise 3 farklı fenolik bileşik incelendi. Her üç sensörün katekole daha duyarlı olduğu tespit edildi.

Her üç sensör için katekol substratına karşı biyosensör cevabı üzerine etkiyebilecek 8 farklı kimyasal madde ile çalışma yapıldı. Sonuçlara göre hazırlanan grafiklere bakıldığında sensörlerin kimyasal maddelerden düşük düzeyde etkilenmeleri her üç biyosensör için bir avantaj olarak değerlendirilebilir.

Yapılan çalışmalarda geliştirilen biyosensörlerin ile elma suyu ve Elazığ İli Maden ilçesindeki Bakır işletmesi yakınındaki atık su numunesindeki fenolik bileşiklerin tespitinde kullanılabilirlikleri araştırıldı. Geliştirilen her üç biyosensörün özellikleri çizelge 5.1.de özet halde gösterildi.

Çizelge 5.1. Biyosensörlerin bazı özelliklerinin karşılaştırılması

	Mısır püskülü PPO biyosensörü	Biber tohumu PPObiyosensörü	*Pseudomonas putida* PPO biyosensörü
Uygun Substrat	Katekol	Katekol	Katekol
Doku Miktarı/ (Bakteri özütü miktarı)	100 mg/cm^2	100 mg/cm^2	100 mg/cm^2
Jelatin Miktarı	10 mg	10 mg	5 mg
Gluteraldehit yüzdesi	%1.5	%1	%1.5
Optimum pH	7	7	7
Optimum Sıcaklık	40 ºC	40 ºC	30 ºC
Lineer Aralık	0.05-0.2 M	0.05-0.2 M	0.01-0.1 M
İnhibitör Etkisi	Çinko	Çinko ve Mangan	Nikel

6. KAYNAKLAR

Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S.,Tattini, M. 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. ***Plant Sci.*** 196 : 67-76.

Aizawa, H., Kurosawa, S., Park, J.W.,Wakido, S.I. 2006. Quartz Crystal Microbalance Immunosensors for Environmental Monitoring. **Biosensors and Bioelectronics**, 22 (4): 473-481.

Akbulut, N. 2011. Dereotundan (*Anethum graveolens*) İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Bazı Killerle Immobilizasyonu ve Seçilmiş Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans tezi Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum. 85.

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

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

Altinok, I., Kayis, S., Capkin, E. 2006. *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout. ***Aquaculture***, 261: 850-855.

Ammon, H.P.T., Ege, W., Oppermann, M., Göpel, W., Eisele, S. 1995. Improvement in the Long-Term Stability of an Amperometric Glucose Sensor System by Introducing a Cellulose Membrane of Bacterial Origin**.** ***Analytical Chemistry***, 67(2): 466-471.

Anonim, 2005a, Statistical Databases, www. fao.org.

Armstrong, W. 1994. Polarographic Oxygen Electrodes and Their Use in Plant Aeration Studies. ***Proceedings of the Royal Society of Edinburg***,102B : 511-527.

Arwin, H. 2001. Is Ellipsometry Suitable for Sensor Applications. ***Sensors and Actuators A***, 92: 43-51.

Arya, S.K., Datta, M., Malhotra, B.D. 2008. Recent advances in cholesterol biosensor. ***Biosensors and Bioelectronics***, 23: 1083-1100.

Aydemir, T. 2004. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke(*C ynara scolymus L.*) heads. ***Food Chemistry***, 87(1) : 67-9. DOI :10.1016/j.foodchem.2003.10.017.

Bagheri, H., Mohammadi, A., Salemi, A. 2004. On-line trace enrichment of phenolic compounds from water using a pyrrole-based polymer as the solid-phase extraction sorbent coupled with high-performance liquid chromatography. ***Analytica Chimica Acta***, 513: 445-449.

Berber, E. 2016. Polivinil alkol (PVA) elektroeğirme liflerin glukoz biyosensörü uygulaması. Yüksek Lisans tezi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, İzmir. 97.

Bergmeyer, H.U. 1984. Enzymatic Analysis of the New Generation. ***Fresenius Journal of Analytical Chemistry***, 319 (8): 883-889.

Berson, S. A., Yalow, R. S. 2006. General Principles of Radioimmunoassay. ***Clinica Chimica Acta***, 369 (2): 125-143.

Briggs, G.E., Haldane, J.B.S. 1925. A Note on the Kinetics of Enzyme Action. ***Biochemical Journal,*** 19: 338-339.

Boopathi, E., Rao, K.S. 1999. A sideophore from *Pseudomonas putida* type A1: structural and biological characterization, 1435: p.30-40.

Buenger, D., Topuz, F., Groll, J. 2012. Hydrogels in sensing applications. Progress in Polymer Science 37: 1678-1719.

Buerk, D.G. 1993. *Biosensors: Theory and Applications,* ABD: CRC Press, 6-16.

Cammann, K. 1977. Biosensors Based on Ion-Selective Electrodes. ***Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie,*** 287 (1): 1-9.

Canbay, E., 2018. Organik çözgene dayanıklı bakteri temelli mikrobiyal biyosensör ve moleküler damgalanmış polimer tabanlı biyosensör sistemleri geliştirilmesi, karakterizasyonu ve bazı steroidlerin tayininde kullanılması. Doktora tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir. 140.

Cass, A. G., Davis, G., Francis, G. D., Hill, H A O., Aston, W.J., Higgins, I.J., Plotkin, E.V., Scott, L.D.L., Turner, A.P.F. 1984. Ferrocene-Mediated Enzyme Electrode for Amperometric Determination of Glucose. ***Analytical Chemistry***, 56 (4): 667–671.

Castillo, J., Gaspar, S., Leth, S., Niculescu, M., Mortari, A., Bontidean, I., Sooukharev, V., Dorneanu, S.A., Ryabov, A.D., Csöregi, E. 2004. Biosensors for life quality design, development and applications. ***Sensors and Act.*** B., 102:179-194.

Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A., Özkan, M. 2001. Meyve ve Sebzelerin Bileşimi Soğukta Depolanmaları. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No:24, Ankara.

Chandrasekara, A. 2019. Phenolic Acids. Reference Module in Food Science Encyclopedia of Food Chemistry, Pages 535-545.

Chang, I.S., Jang, J.K., Gil, G.C., Kim, M., Kim, H. J., Cho, B.W., Kim,B. H. 2004. Continuous determination of biochemical oxygen demand using microbial fuel cell based biosensor. ***Biosens. Bioelectron.*** 19: 607-613.

Chargaff, E., Zamenhof, S., Green, C. 1950. Composition of Human Desoxypentose Nucleic Acid. ***Nature,*** 165 (4202): 756–757.

Chauhan, N., Pundir, C.S. 2011. Co-Immobilization Of Cholesterol Esterase, Cholesterol Oxidase And Peroxidase On Pvc Strip For Serum Cholesterol Determination. ***Analytical Methods***, 3 :1360-1365.

Cheung , D.T., Perelman, N., Ko, E.C., Nimni, M.E. 1985. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde III. Reaction with collagen in tissues.

Clark, L.C. 1956. Monitor and Control of Blood and Tissue Oxygen Tensions. ***Transactions of the American Society for Artificial Internal Organs***, 2: 41-48.

Clark, L.C., Lyons, C. 1962. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery**.** ***Annals of the New York Academy of Sciences,*** 102 (1): 29-45.

Coulet, P.R. 1991. What Is A Biosensor, *Biosensor Principles and Applications*, Ed: Blum, L. J., Coulet, P. R., Marcel Dekker Inc., New York, 1-6.

Çevik, E., Abasıyanık, M.F., Baykal, A., Şenel, M.A. 2012. Novel amperometric phenol biosensor based on immobilized HRP on poly(glycidylmethacrylate)-grafted iron oxide nanoparticles for the determination of phenol derivatives. ***Sensors and Actuators*** B 173, 396-405.

Çil, B., 2014. Fenollere duyarlı potansiyometrik mikro biyosensörler ve uygulamalar. Yüksek Lisans tezi, Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Giresun. 92.

Davis, C. 1975. ***Annals Microbiol***. 126 A: 175-186.

Despande, S.S., Rocco, R.M. 1994. Biosensors and their potential use in food quality control. Food Technology, 48 (6): 146-150.

Dindar, B. 2010. Üre Tayinine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul. 87.

Dixon R.A., Paiva N.L. 1995. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. ***The Plant Cell***, (7): 1085.

Draghi, P.F., Fernandes, J.C.B. 2016. Label-free potentiometric biosensor based on solid-contact for determination of total phenols in honey and propolis.***Talanta,*** 164 : 413-417.

Doğan, S. 2002. *Orignum* L. (*Lamiaceae)* Taksonlarının (*Origanum onites* ***L.*** Ve *Origanum vulgare* **L.** *spp.hirtum* (Link) *letswaar)* Çevre Faktörleriyle Olan ilişkilerinin ve PFO Aktivitesinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir. 251.

Dong, J., Cai, L., Zhu, X., Huang, X., Yin, T., Fang, H., Ding, Z. 2014. Antioxidant activities and phenolic compounds of cornhusk, corncob and stigma maydis. 25: 1956-1964.

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

Dursun, F. 2009. Medyatör Bağlı Matrikslerden Tyrosinase Tabanlı Fenol Biyosensörüne Uygulanması. Yüksek Lisans Tezi, Gebze İleri teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze, 31-34.

D'Souza S.F. 1999. Immobilized enzymes in bioprocess. Curr Sci. 77: 69-79.

Ebrahimipour, G., Kolahchi, N., Braiek, M., Lagarde, F., Jaffrezic-Renault, N., Ranaei-Siadat, S.,O. 2018. Direct detection of phenol using a new bacterial strain-based conductometric biosensor. ***Journal of Environmental Chemical Engineering***, 6 : 478–484.

Eggins B.R. 1996. Biosensors: an Introduction © John Wiley & Sons Ltd and B.G. Teubner.

Eriksson , M., Sekretaryova, A.N., Vagin, M.Y., Volkov, V.A., Zozoulenko, I.V., Turner, A.P.F. 2016. Total phenol analysis of weakly supported water using a laccase-based microband biosensor . ***Analytica Chimica Acta***, 907: 45-53.

Espín, J.C., García-Ruiz, P.A, Tudela, J., Varón, R., García-Cánovas, F. 1998. Monophenolase and diphenolase reaction mechanisms of apple and pear polyphenol oxidases**.** ***J. Agric. Food Chem***., 46 (8): 2968-2975. DOI: 10.1021/ jf971045v.

Espinosa-Urgel, M., Salido, A., Ramos, J. 2000. Genetic Analysis of Functions Involved in Adhesion of *Pseudomonas putida* to Seeds. ***Journal of Bacteriology.***182: 2363-2369.

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

Estrela, P., Bhalla, N., Jolly ,P., Formisano, N., Pedro Estrela 2016. Introduction to biosensors**.** ***Essays Biochem***. 30; 60 (1): 1–8.

Faraji, H. 2005. β-Cyclodextrin-bonded silica particles as the solid-phase extraction medium for the determination of phenol compounds in water samples followed by gas chromatography with flame ionization and mass spectrometry detection. ***Journal of Chromatography A,*** 1087, 283-288.

Fartas, F., Abdullah, J., Yusof, N., Sulaiman, Y., Saiman, M. 2017. Biosensor based on tyrosinase immobilized on graphene-decorated gold nanoparticle/chitosan for phenolic detection in aqueous. ***Sensors,*** 17 (5): 1132.

Fischer, E. 1894. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. ***Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft***, 27: 2985-2993.

Gomes, S.A S.S., Nogueira, J.M.F., Rebelo, M. J. F. 2004. An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine**. *Biosensors and Bioelectronics,*** 20 (6), 1211-1216.

Gonsalves K., Halberstadt C., Laurencin (Eds.) C.T., 2008. Biomedical Nanostructures: Clinical Applications of Micro- and Nanoscale Biosensors.

Granero, A.M., Fernández, H., Agostini, E., Zón, M.A. 2010. An amperometric biosensor based on peroxidases from *Brassica napus* for the determination of the total polyphenolic content in wine and tea samples. ***Talanta,*** 83(1), 249-255.

Gross, T.M., Bode, B.W., Einhorn, D., Kayne, D.M., Reed, J.H., White, N.H., Mastrototaro, J.J. 2000. Performance Evaluation of the MiniMed Continuous Glucose Monitoring System During Patient Home Use. ***Diabetes Technol. Ther.,*** 2: 49- 56.

Grove,W.R.1839. On Voltaic Series and The Combination of Gases by Platinum. ***Philosophical Magazine***, 14: 127-130.

Guilbault, G. G., Montalvo, J.G. 1969. A Urea-Specific Enzyme Electrode. ***Journal of the American Chemical Society,*** 91 (8): 2164-2165.

Guilbault, G. G., Lubrano, G.J. 1973. Enzyme Electrode for Amperometric Determination of Glucose. ***Analytica Chimica Acta,*** 64 (3): 439-455.

Guilien, P., Avrameas, S., Burtin, P. 1970. Specificity of Antibodies in Single Cells After Immunization with Antigens Bearing Several Antigenic Determinants Study With a New Paired Staining Technique. ***Immunology,*** 18 (4): 483-491.

Haddam, M., Mandli, J., Chadel, S., Amine, A., Nadifiyine, S., Blanchard, C.C., Marty, J.L. 2013. Amperometric Biosensor Based on Tyrosinase Immobilized on to A carbon Black Paste Electrode for Phenol Determination in Olive Oil. ***Analytical Letters***, 46:17, 2705-2726.

Hall, E.A.H. 1990. Ch.1: Biosensors in context, *Biosensors,* İngiltere:Open University Press, 1-351.

Han, X., Shen, T., Lou, H. 2007. Dietary polyphenols and their biological significance. ***Int. J. Mol. Sci.***, 8: 950-988.

Harwood, C.S., Fosnaugh K., Dispensa M. 1989. Flagellation of *Pseudomonas putida* and analysis of its motile behavior. ***Journal of Bacteriology***. 4063-4066.

Heimdal, H., Larsen, M.L., Poll, L.1994. Characterization of polyphenol oxidase from photosynthetic and vascular lettuce tissues (*Lectuca sativa*). ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, 42: 1428–1433. DOI: 10.1021/jf00043a008.

Heyrovsỳ, J. 1922. Electrolysis With A Dropping Mercury Cathode. *Chemick é Listy*, 16, 256.

Heyrovsỳ, J. 1923. Electrolysis With A Dropping Mercury Cathode. Part I. Deposition of Alkali and Alkaline Earth Metals. ***Philosophical Magazine***, 45: 303-314.

Heyrovsỳ, J. 1964. The Trends of Polarography, in *Nobel Lectures Chemistry 1942-1962*, Elsevier, Amsterdam, London, New York, 564-584.

Hikuma, M., Obana, H., Yasuda, T., Karube, I., Suzuki, S.1980. A Potentiometric Microbial Sensor Based on Immobilized *escherichia coli* for Glutamic Acid. ***Analytica Chimica Acta***, 116 (1): 61-67.

https://www.elprocus.com/what-is-a-biosensor-types-of-biosensors-and-applications/ 2019.

http://www.saglikbilgisi.gen.tr.

https://www.sciencedirect.com/topics/nursing-and-health-professions/immunosensor

http://tr.wikipedia.org.

http://kisi.deu.edu.tr/bulent.cavas/ders/bok10.pdf

http://wishart.biology.ualberta.ca

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

Härtig, C., Loffhagen, N., Harms, H. 2005. Formation of trans Fatty Acids Is Not Involved in Growth-Linked Membrane Adaptation of *Pseudomonas putida*. ***Applied and Environmental Microbiology.***1915-1922.

Işık, B. 2014. Biyosensörlere Farklı Bir Bakış Açısı: Enzim Aktivitesi Tayinlerine Yönelik Sistemler. Yüksek Lisan tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ. 60.

Jaegfeldt, H., Torstensson, A.B., Gorton, L.G., Johansson, G.1981. Catalytic- Oxidation of Reduced Nicotonamide Adenine-Dinucleotide by Graphite Electrodes Modified with Adsorbed Aromatics Containing Catechol Functionalities. ***Analytical Chemistry***, 53 (13): 1979–1982.

Kara, S. 2009. Mikrobiyal Biyolojik Oksijen İhtiyacı Biyosensörlerinin Geliştirilmesi. Yüksek Lisans tezi. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze. 144.

Karabulut, Ş. 2017. Tortum Elmasından (*Malus sylvestris*) Polifenol Oksidaz Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması. Karakterizasyonu ve Bazı Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum. 71.

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.

Kartlaşmış, K. 2017. Glukoz tayinine yönelik yeni bir biyosensör tasarımı. Yuksek Lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı,Adana. 88.

Kavita, V. 2017. DNA Biosensors-A Review. J Bioengineer & Biomedical Sci. 7: 222. doi:10.4172/2155-9538.1000222.

Kılınç, M. E. 1996. *Enzime* Dayalı Elektrokimyasal Biyosensörlerin Medyatör Kullanarak Tasarımı. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir. 9-23.

Kıralp, S., Küçükyavuz, Z. 2003. Preparation and Characterization of Conducting Polybutadiene/ Polythiophene Composites. ***Turkish Journal of Chemistry***, 27 (4) : 417-422 .

Kress-Rogers, E. 1998. Instrumentation and Sensors for the Food Industry; Woodhead Publishing Lmtd.: Cambridge, England, 1998.

Kochana, J., Nowak, P., Jarosz-Wilkołazka, A., Bieroń, M. 2008. Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds. ***Microchemical Journal***, 89(2): 171-174.

Koyun, A., Ahlatçıoğlu, E., İpek, Y.K.. 2012. Biosensors and Their Principles. In Sadık Kara (Ed.), *A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones*. Hırvatistan: InTech, 115-142.

Kowalski, H., 2002.U.S. – German Research Consortium Sequences Genome of Versatile Soil Microbe. J.Craig Venter Archive.

Kroto, H.W., Heath, J.R., Obrien, S.C., Curl, R.F., Smalley, R.E. 1985.C-60-Buckminsterfullerene. ***Nature,*** 318 (6042): 162-163.

Kulys, J.J., Svirmickas, G.J.S. 1979. Biochemical Cell for the Determination of Lactate. ***Analytica Chimica Acta***, 109 (1): 55-60.

Kunze, J., Stimming, U. 2009 . Electrochemical Versus Heat–Engine Energy Technology: A Tribute to Wilhelm Ostwald 's Visionary Statements. ***Angewandte Chemie International Edition,*** 48 (49): 9230-9237.

Kuralay, F., Özyörük, H., Yıldız, A. 2005. Potentiometric enzyme electrode for urea determination using immobilized urease in poly(vinylferrocenium) film. ***Sensors and Actuators*** B: Chemical, 109: 194-199.

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

Li, YF., Liu, ZM., Liu, YL., Yang, YH., Shen, GL., Yu, RQ. 2006. A mediator-free phenol biosensor based on immobilizing tyrosinase to ZnO nanoparticles. ***Anal. Biochem.,*** 349: 33-40.

Li, C.Y., Kim, H.W., Won, S.R., Min, H.K.., Park, K.J., Park, J.Y., Ahn, M.S., Rhee, H.I. 2008. Corn husk as a potential source of anthocyanins. ***J. Agric. Food Chem***., 56: 11413–11416.

Lopez, J.E., Henkels, M.D. 1999. Utilization of Heterologous Siderophores Enhances Levels of Iron Available to *Pseudomonas putida* in the Rhizosphere. ***Applied and Environmental Microbiology,*** 65:5 357-5363.

Lupetti, K.O., Rocha F.R.P., Fatibello-Filho, O. 2004. An improved flow system for phenols determination exploiting multicommutation and long pathlength spectrophotometry. ***Talanta,*** 62: 463-467.

Marcus, R.A. 1956. On the Theory of Oxidation–Reduction Reactions Involving Electron Transfer. ***Journal of Chemical Physics***, 24 (5): 966-978.

Marcus, R.A. 1993. Electron–Transfer Reactions in Chemistry–Theory and Experiment (Nobel lecture). ***Angewandte Chemie (International Edition in English***, 32 (8): 1111-1121.

Marcus, A. 2003.Versatile soil-dwelling microbe is mapped. Genome News Network. http://www.genomenewsnetwork.org/articles/01_03/soil_microbe.shtml.

Mayer, A M. 1986. Polyphenol oxidases in plants –Recents progress**.** ***Phytochemistry***, 26 (1):11-20. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)81472-7.

Mayer, A.M., Harel, E. 1979. Polyphenol oxidases in plants. ***Phytochemistry***, 18 (2): 193-215.

Mehmet, O. 2018. Alfa-1-Antitripsin Analizine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi. Yüksek Lisans tesi,Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Edirne. 90.

Mehrotra, P. 2016. Biosensors and their applications. ***J Oral Biol Craniofac Res.*** 6 (2): 153-159.

Mehrvar, M., Bis, C., Scharer, M., J., Young, M.M., Luong, H.J. 2000. ***Analytical Sciences*** 16-667.

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

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

Michaelis, L.,Menten, M.L.1913. Die Kinetik der Invertinwir kung. ***Biochemische Zeitschrift,*** 49: 333-369.

Miller, C.D., Kim Y.C., Anderson A.J. 1997. Cloning and mutational analysis of the gene for the stationary-phase inducible catalase (catC) from *Pseudomonas putida*. ***Journal of Bacteriology,*** 179: 5241-5245.

Mohsen, S.M., Ammar, A.S.M. 2009. Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. ***Food Chem.*** 112: 595-598.

Mohtar, L.G., Aranda, P., Messina, G.A., Nazareno, M.A., Pereira, S.V., Raba, J., Bertolino, F.A. 2019. Amperometric biosensor based on laccase immobilized onto a nanostructured screen-printed electrode for determination of polyphenols in propolis. ***Microchemical Journal***, 144: 13-18.

Monthioux, M., Kuznetsov, V.L. 2006. Who Should Be Biven The Credit For The Discovery of Carbon Nanotubes. ***Carbon,*** 44 (9): 1621-1623.

Mulchandani, A. 1998. Principles of Enzyme Biosensors**.** ***Enzyme and Microbial Biosensors***, pp 3-14.

Muller, R. 1992. Bacterial Degradation of Xenobiotics. Microbial Control of Pollution. 48. p.52.

Narayanaswamy, R., Kanagesan, S., Pandurangan, A., Parasuraman, P. 2016. Basics to different imaging techniques, different nanobiomaterials for image enhancement. ***Nanobiomaterials in Medical Imaging*** Applications of Nanobiomaterials 8: 101-129.

NCBI. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=21068.

Nelson, J.M., Griffin, E.G. 1916. Adsorption of Invertase. ***Journal of the American Chemical Society,*** 38 (5): 1109-1115.

Nernst, W.H. 1889. Die elektromotorische Wirksamkeit der Ionen. ***Zeitschrift für Physikalische Chemie, Stöchiometrie und Verwandtschaftslehre,*** IV, 129–181.

Newman, J.D., Turner, A.P. 2005. Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. ***Biosensor and Bioelectron,***. 20 (12): 2435-2453.

Nishida, K., Shimoda, S., Ichinose, K., Araki, E., Shichiri, M. 2009. What is Artificial Endocrine Pancreas Mechanism and History. ***World Journal of Gastroenterology,*** 15 (33): 4105-4110.

Nuñez-Delicado, E., Serrano-Megías, M., Pérez-López, A.J., López-Nicolás, J.M. 2005. Polyphenol oxidase from dominga table grape. ***J. Agric. Food Chem.,*** 53(15): 6087-6093. DOI: 10.1021/jf050346z.

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.

Otenio, M.H., Lopes da Silva, M.T., Marques, M., Roseiro, J., Bidoia, E. 2005. Benzene, Toluene and Xylene Biodegradation by *Pseudomonas putida* CCMI 852. ***Brazilian Journal of Microbiology***. 36,258-261.

Özcan, H.M. 2010. Fenolik Bileşiklerin Tayinine Yönelik Amperometrik Esaslı Biyosensör Hazırlanması. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Edirne. 128.

Palüzar, H. 2009. Bazı Organik Bileşiklerin Tayini İçin Mikrobiyal Esaslı Biyosensör Geliştirilmesi.Yüksek Lisans Tezi, Trakya üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,Edirne. 83.

Patnaik, P., Khoury, J.N. 2004. Reaction of Phenol with Nitrite Ion: Pathways Of Formation Of Nitrophenols In Environmental Waters. ***Water Res.*** 38(1): 206-210.

Pedano, M.L., Rivas, G.A. 2000. Amperometric biosensor for the quantification of gentisic acid using polyphenol oxidase modified carbon paste electrode. ***Talanta*** 53(3): 489-495.

Peñalver, M.J, Fenoll, L.G., Rodríguez-López, J.N., García-Ruiz, P.A., García-Molina, F., Varón, R., García Cánovas, F., Tudela, J. 2005. Reaction mechanism to explain the high kinetic autoactivation of tyrosinase. ***J. Mol. Catal.: B Enzym***. 33(1-2): 35-42.

Pfeiffer, E.F., Thum, C., Beischer, W., Meissner, C., Tamas, G., Clemens, A.H. 1975. Artificial Pancreas–Application to Experimental and Clinical Research. ***Diabetologia,*** 11 (4): 369-370.

Podsedek, A., Wilska-Jeszka, J., Anders, B., Markowiski, J. 2000. Compositional characterisation of some apple varieties. ***Eur. Food Res. Technol.,*** 210 (4): 268-272.

Polat, F. 2010. Biyolojide Özel Konular, Pegem Akademi Yayınları. Yayın No: 4, Sayfa:188. Ankara.

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.

Reanney, D., Gowland, P., Slater, J. 1983. Genetic Interactions Among Communities. ***Microbes in Their Natural Environments,*** 34: 408.

Rechnitz, G.A. 1978. Biochemical electrodes uses tissues slice. ***Chem. Eng. News,*** 56: 16-21.

Riedel, K., Neumann, B., Scheller, F. 1992. Microbial Sensors Based on Respiration Measurements. ***Chemie Ingenieur Technik***, 64: 518-528.

Robertson, S. 2018. What are Flavonoids? https://www.news-medical.net/health/What-are-Flavonoids.aspx. 07.05.2019.

Romano, J., Kolter, R. 2005. *Pseudomonas-Saccharomyces* Interactions: Influence of Fungal Metabolism on Bacterial Physiology and Survival. ***Journal of Bacteriology***. 187: 940-948.

Rosa, L.A., Moreno-Escamilla, J.O., Alvarez-Parrilla, E., Rodrigo-Garcia, J. 2019. Phenolic Compounds. ***Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables***, Pages 253-271.

Ryan, C.A. 2000. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. ***Biochim. Biophys. Acta,*** 1477 (1-2): 112-121. DOI: 10.1016/S0167-4838(99)00269-1.

Sabatini, E., Rubinstein, I., Maoz, R., Sagiv, J. 1987. Organized Self-Assembling Monolayers on Electrodes. 1. Octadecyl Derivatives on Gold. ***Journal of Electroanalytical Chemistry***, 219 (1–2): 365-371.

Sanger, F. 1955. La structure de l'insuline. ***Bulletin de la Societe de Chimie Biologique,*** 37 (1): 23-35.

Sarepoua, E., Tangwongchai, R., Suriharn, B., Lertrat, K. 2015. Influence of variety and harvest maturity on phytochemical content in corn silk. ***Food Chem***., 169: 424-429.

Sezgintürk, M.K., Dinçkaya, E. 2004. Direct determination of sulfite in food sampels by a biosensor based on plant tissue homogenate. ***Talanta*** 6: 998-1002.

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

sci.ege.edu.tr/~eubio/yaz_okulu/biosensor.htm. Erişim tarihi : 17.05.2019.

Schoenbein, C.F. 1839. On the Theory of the Gaseous Voltaic Battery. ***Philosophical Magazine***, 14: 43-45.

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

Silva, L.M.C., Mello de A.C.C., Salgado, M.A. 2014. Phenol determination by an amperométrico biosensor based on lyophilized mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue. ***Environmental Technology***, 35:8, 1012-1017.

Shan, D., Zhu, M., Han, E., Xue, H., Cosnier, S. 2007. Calcium carbonate nanoparticles: A host for the construction of highly sensitive amperometric phenol biosensor. ***Biosensors and Bioelectronics, 23***: 648-654.

Shan, D., Zhang, J., Xue, H.G., Zhang, Y.C., Cosnier, S., Ding, S.N. 2009. Polycyrstalline bismuth oxide films for development of amperometric biosensensor. ***Biosensors and Bioelectronics***, 24: 2671-3676.

Shi, C., Liu, Q., Dai, Y., Xie, Y., Xu, X. 2002. The mechanism of azide activation of polyphenol oxidase II from tobacco. ***Acta Biochimica Polonica***,49 (4) : 1029-1035.

Shichiri, M., Kawamori, R., Yamasaki, Y., Hakui, N., Abe, H. 1982. Wearable Artificial Endocrine Pancreas With Needle-Type Glucose Sensor. ***Lancet,*** 2: 1129-1131.

Slinkard, K., Singleton, V.L. 1977. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison withManual Methods. ***Am J Enol Vitic***, 28 : 49-55.

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

Şakiroğlu, H. 1994. Kusburnu Meyvasından izole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Kinetik ve Elektroforetik Özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum. 121.

Tang, S.T., Azlan, A., Khoo, H.E., Lim, S.M. 2017. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. ***Food Nutr Res.*** 61(1):1361779. doi: 10.1080/16546628.2017.1361779. eCollection 2017.

Tarasevich, M.R., Yaropolov, A.I., Bogdanovskaya, V.A., Varfolomeev, S.D. 1979. Electrocatalysis of A Cathodic Oxygen Reduction by Laccase. ***Bioelectrochemistry and Bioenergetics***, 6 (3): 393-403.

Telefoncu, A. 1999. Biyosensörler. İzmir: Ege Üniversitesi Yayınları, 1-280.

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

Telefoncu, A., Timur, S., Pazarlioğlu, N., Pilliton, R. 2003. Detection of phenolic compounds by thick film sensors based on *Pseudomonas putida.* ***Talanta,*** 61, (2): 87-93.

Telefoncu, A., Kılınç, A. 2012. Biyosensörler: Metodlar, Uygulamalar ve Son Gelişmeler. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 1-189.

Ternynck, T., Avrameas, S. 1976. A New Method Using Parabenzoquinone for Coupling Antigens and Antibodies to Marker Substances. ***Annales de l'Institut Pasteur Immunologie***, 127 (2): 197-208.

Thévenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S. 2001. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. ***Biosens Bioelectron,***.16 (1-2): 121-31.

Timur, S., Pazarlıoglu, N., Pilloton, R., Telefoncu, A. 2003. Detection of phenolic 107 compounds by thick film sensors based on *Pseudomonas putida*. ***Talanta,*** 61: 87-93.

TIGR 2019. Comprehensive microbial resource. http://www.gem.re.kr/tigr scripts/CMR2/gene_table_section.spl?db=gpp&main_role=Protein+fate&main_role_only=1&role_order=&nt_choice=tigr. 14.05.2019.

Thapphasaraphong, S., Rimdusit, T., Priprem, A. 2016. Puthongking, P. Crops of waxy purple corn: A valuable source of antioxidative phytochemicals. ***Int. j. adv. agric. environ. eng.,*** 3: 2349-1531.

Tsai, Y.C., Chiu, C.C. 2007. Amperometric biosensors based on multiwalled carbon nanotube-Nafion-tyrosinase nanobiocomposites for the determination of phenolic compounds. ***Sensors and Actuators B***, 125 : 10-16.

Turna Ö. 2006. Aminoasit Biyosensörlerinin Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun. 71.

Updike, S.J., Hicks, G.P. 1967. Reagentless Substrate Analysis With Immobilized Enzymes. ***Science,*** 158: 270-272.

Updike, S.J., Hicks, G.P. 1967. The Enzyme Electrode. ***Nature***, 214 : 986-988.

Uyar, İ., Güven, Ö., Artıktay, I. 2019. Dokuz Eylül Üniversitesi Buca Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Eğitimi.

Wang, J. 2001. Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges. ResearchGate, 10 (1): 107-119.

Wang, J. 2008. Electrochemical Glucose Biosensors. ***Chemical Reviews***, 108 (2): 814-825.

Wang, Y., Zhang, Z., Zhai, F., Jia, H., Hasebe, Y.A. 2018. Highly sensitive electrochemical biosensor for phenol derivatives usinga graphene oxide-modified tyrosinase electrode. ***Bioelectrochemistry***, 122: 174-182.

Warburg, O.H. 2010. The Classic: The Chemical Constitution of Respiration Ferment. ***Clinical Orthopaedics and Related Research***, 468 (11): 2833-2839.

Watson, J.D., Crick, F.H.C. 1953. Molecular Structure of Nucleic acids-AStructure for Deoxyribose Nucleic Acid. ***Nature***, 171 (4356): 737-738.

Weinstein, R. L., Bugler, J.R., Schwartz, S.L., Peyser, T.A., Brazg, R.L., McGarraugh, G.V. 2007. Accuracy of the 5-day Freestyle Navigator Continuous Glucose Monitoring System–Comparison With Frequent Laboratory Reference Measurements. ***Diabetes Care***, 30 (5): 1125-1130.

Wciso, M., Compagnone, D., Trojanowicz, M. 2006, Enantioselective screen-printed 108 amperometric biosensor for the determination of D-amino acids. ***Biolectrochemistry***, 71: 223-230.

Whitaker, J., Lee, C.,1995. Recent advances in chemistry of enzymatic browning**.** ***American Chemical Society***. ACS Symposium Series, 2–7. DOI: 10.1021/bk 1995-0600.ch001.

Wittman, C., Riedel, K., Schmid, R.D. 1997. Microbial and Enzyme Sensors for Environmental Monitoring. In Handbook of Biosensors and Electronic Noses. ***Medicine, Food and the Environment***; Kress-Rogers, E., Ed.; CRC Press: New York, 1997: 305–306.

Valero, E., Varon, R., Garcia-Carmona, F. 1988. Characterization of Polyphenol Oxidase from Airen Grapes. ***J. Food Sci.,*** 5 3(5): 1482-1485.

Vandenbergh, P.A.,Wright, A.M.1983. Plasmid Involvement in Acyclic Isoprenoid Metabolism by *Pseudomonas putida*. ***Applied and Environmental Microbiology***, 45: 1953-1955.

Volta, A. 1800. On the Electricity Excited by the Mere Contact of Conducting Substances of Different Kinds (in French) . ***Philosophical Transactions of the Royal Society of London***, 90: 403-431.

Yahiro, A.T., Le, S.M., Kimble, D.O. 1964. Biolectrochemistry I. Enzyme Utilizing Bio-Fuel Cell Studies. ***Biochimica et Biophysica Acta,*** 88 (2): 375-383.

Yalvaç, M., 2010. Amperometrik fenol biyosensörlerinin geliştirilmesi. Doktora tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul. 125.

Yalow, R S., Berson, S.A. 1960. Immunoassay of Endogenous Plasma Insulin in Man. ***Journal of Clinical Investigation***, 39 (7): 1157-1175.

Yang, S., Li, Y., Jiang, X., Chen, Z., Lin, X. 2006. Horseradish peroxidase biosensor based on layer-by-layer technique for the determination of phenolic compounds. ***Sensors and Actuators B: Chemical***, 114:774-780.

Yarar, S. 2014. Lizin tayinine yönelik biyosensör geliştirilmesi ve karakterizasyonu. Doktora tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı, İstanbul. 78.

Yardım, Y. 2009. Elektrokimyasal DNA Biyosensörlerin Bazı Kullanım Alanlarının Guanin yada Adenin Sinyali Üzerinden İncelenmesi. Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van. 38.

Yıldırımoğlu, F. 2009. Kolesterol Tayini İçin Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara. 78.

Yoo, E.H., Lee, S.Y. 2010. Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. ***Sensors,*** 10: 4558-4576.

Zejli, H., Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L., Naranjo-Rodriguez, I., Liu, B., Temsamani, K.R., Marty, J.L. 2008. Phenol biosensor based on Sonogel-Carbon transducer with tyrosinase alumina sol–gel immobilization. ***Anal. Chim. Acta***, 612 : 198-203.

Zemel, G.P. 1989. Low pH Inactivation of Polyphenoloxidase. Master Thesis, Food Science and Human Nutrition Department, University of Florida, Gainesville, Fl, USA.

Zhang, X., Rechnitz, A.G. 1994. Simultaneous determination of glucose and sucrose by a dual-working electrode multienzyme sensor flow-injectionsystem. ***Electroanalysis*** 6 : 361-367.

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.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Diyarbakır'ın Dicle ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Diyarbakır'da tamamladım.2010 yılında Fen Bilgisi Öğretmeni ünvanıyla mezun oldum.2015 yılında Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimimi tamamladım. 2015 yılında Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktara öğrenimime başladım.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ İNTİHAL FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	Nurten ASLAN
ÖĞRENCİ NO	15801501
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2019-2020
YARIYIL	X☐ Güz ☐ Bahar
ANABİLİM DALI	
PROGRAM	Doktora
TEZ KONUSU	FENOLİK BİLEŞİKLERİN TAYİNİNDE BAKTERİ VE BİTKİ DOKUSU ESASLI BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	112
BENZERLİK ORANI	%15
RAPORLAMA TARİHİ	16/12/ 2019

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 112 sayfalık kısmına ilişkin,16/12/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *TURNİTİN* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 15'tir.

Uygulanan filtrelemeler:

X☐Kabul/Onay sayfaları hariç,
X☐Kaynakça hariç
☐Alıntılar hariç/dâhil
☐Diğer

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

(Öğrencinin Adı Soyadı)

Nurten ASLAN

(İMZA/TARİH)
16.12.2019

Prof. Dr. Reyhan Gül GÜVEN **Tez Danışmanı** (İMZA/TARİH) 16.12.2019	Prof. Dr.Yüksel ÇOŞKUN **Anabilim Dalı Başkanı** (İMZA/TARİH) 18 Aralık 2019

Formdaki bilgiler bilgisayar ortamında doldurulmalıdır. El yazısı ile doldurulan formlar geçersiz sayılmaktadır.

KGK-FRM-340/00