

**TC**  
**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI POLİFENOLLERİN TAYİNİNE YÖNELİK KAYISI**  
**HOMOJENAT TEMELLİ BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI**

**ALİ ERDOĞAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**KİMYA ANABİLİM DALI**

**MALATYA**  
**HAZİRAN-2008**

Tezin Başlığı: “**Bazı Polifenollerin Tayinine Yönelik Kayısı Homojenat Temelli  
Biyosensör Hazırlanması**”

Tezi Hazırlayan: **Ali ERDOĞAN**

Sınav Tarihi: 24.07.2008

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Sınav Jürisi Üyeleri**

Prof. Dr. Turgay SEÇKİN .....

Doç. Dr. İsmet YILMAZ (Danışman) .....

Yrd. Doç. Dr. Türkan KUTLU .....

Doç. Dr. Erol AKYILMAZ  
(İkinci Danışman)

İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Ali ŞAHİN  
Enstitü Müdürü

## ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Bazı Polifenollerin Tayinine Yönelik Kayısı Homojenat Temelli Biyosensör Hazırlanması**” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Ali ERDOĞAN

# ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

## BAZI POLIFENOLLERİN TAYININE YÖNELİK KAYISI HOMOJENAT TEMELLİ BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI

Ali ERDOĞAN

İnönü Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

77 + xii sayfa

2008

**Danışman:** Doç.Dr. İsmet YILMAZ

**İkinci Danışman:** Doç.Dr. Erol AKYILMAZ

Fenolik bileşikler, organik kirleticilerin büyük bir grubunu oluşturmaktadır. Bu bileşikler pek çok endüstriyel proseste kullanılmakta olup, aynı zamanda bir çok doğal organik bileşiğin yıkım ürünüdür. Düşük konsantrasyon seviyelerinde, polifenollerin parçalanması sonucu oluşan fenolik bileşiklerin belirlenmesi onların toksisitesinin verilmesi açısından çok önemlidir.

Bu tez kapsamında polifenol oksidaz enziminin zengin olan kayısı dokusu kullanılmış ve oksijen elektrodu yüzeyine immobilize edilerek fenolik bileşikler için verdikleri biyosensör cevapları ve tayin aralıkları belirlenmiştir. Çalışmada biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonu yapılmış ve kayısı homojenatı miktarı 0,118 g/cm<sup>2</sup>, jelatin miktarı 6,64 mg/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehit oranı % 2,5 olarak bulunmuştur. Optimizasyon çalışmalarında, optimum koşullar olarak 50 mM, pH:8,5 sodyum-fosfat tamponu ve 37 °C bulunmuştur. Ayrıca biosensörün tayin aralığı, termal kararlılık, operasyonel kararlılık, tekrarlanabilirlik, substrat spesifikliğı, girişim etkileri ve depo kararlılığı karakterize edilmiştir. Bazı fenolik bileşikler ve polifenollerin tayin aralıkları belirlenmiş ve en yüksek biyosensör cevapları kateşol ve pirogallol için alınmıştır.

Bu çalışma ile fenolün belirlenmesinde kayısı doku homojenatı temelli biyosensörden yararlanılabileceğı rapor edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Biyosensör, Homojenat temelli biyosensör, Kayısı, Polifenol oksidaz, Fenol.

## ABSTRACT

Master Thesis

### APRICOT HOMOGENATE-BASED BIOSENSOR PREPARATION FOR DETECTION OF SOME POLYPHENOLS

Ali ERDOGAN

Inonu University  
Graduate School of Natural  
and Applied Sciences  
Department of Chemistry

xii +77 pages

2008

**Advisor:** Ismet YILMAZ, Assoc. Prof.      **Co-Advisor:** Erol AKYILMAZ, Assoc. Prof.

Phenolic compounds constitute a major group of organic contaminant. These compounds are used at a lot of industrial process, and are the degradation products of many natural compounds at the same time. At the low concentration levels, analysis of phenolic compounds produced at the result in fragmentation of polyphenols levels is very important in terms of figuring out their toxicity.

In this thesis, apricot tissue, rich polyphenol oxidase enzyme, was used by immobilizing on oxygen probe and biosensor responds and detection limits to phenolic compounds were determined. In this study, optimization of bioactive layer component was carried out and 0.118 g/cm<sup>2</sup> as apricot homogenate quantity, 6.64 mg/cm<sup>2</sup> as gelatin quantity, and 2.5% as glutaraldehyde ratio were obtained. In the optimization studies, sodium-phosphate buffer (pH 8.5, 50 mM) and 37°C were determined as the optimum conditions. In addition, detection scale, thermal stability, operational stability, repeatability, substrate specify, interference effect and storage stability of biosensor were characterized. Detection limits of some phenolic compounds and polyphenols were measured and the highest biosensor responses were obtained from catechol and pyrogallol.

With this study, it was reported that apricot tissue homogenate-based biosensor is utilizable for detection of various phenolic compounds.

**Key Words:** Biosensor, Homogenate-based biosensor, Apricot, Polyphenol oxidase, Phenol.

## TEŞEKKÜR

Bu çalıőmanın yűrűtűlmesinde bana yűn veren, her konuda destek ve ilgisini esirgemeyen danıőman hocalarım Sayın Doç. Dr. İsmet YILMAZ ve Doç. Dr. Erol AKYILMAZ baőta olmak űzere;

Tez sűresince bilgi ve yardımlarını benden esirgemeyen Kimya Bűlűmű Araőtırma Gűrevlileri Dr. Burhan ATEŐ ve Dr. Selim ERDOĐAN'a, Kayısı Araőtırma ve Uygulama Merkezinden Uzman Tuncay KAN'a;

Kimya Bűlűmű Araőtırma Gűrevlileri Dr. Serap TİTRETİR ve Őznur GŪNGŪR'e, Kimya Bűlűműnden Kadir MALAY'a;

Tezim sűresince manevi desteĐini her zaman yanımda hissettiĐim, biricik sűzlűm Selvihan PEKTAŐ'a;

Ayrıca tűm hayatım boyunca ilgi ve sabırla beni destekleyen, bugűnlere gelmemde bűyűk katkıları olan AİLEM'e

Teőekkűr ederim.

**“ Yűksek lisansım sűresince Yurt İçi Yűksek Lisans Burs Programı kapsamında beni destekleyen TŪBİTAK-BİDEB'e teőekkűr ederim”**

**“2007-38 nolu proje kapsamında bu çalıőmayı destekleyen İnűnű Ŭniversitesi Bilimsel Araőtırma Projeleri birimine teőekkűr ederim.”**

## İÇİNDEKİLER

ONUR SÖZÜ.....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1. Biyosensörlere Genel Bakış.....	1
1.1.1. Biyosensörlerin bileşenleri .....	2
1.1.2. Biyokomponentlerin immobilizasyonu.....	3
1.1.3. Kullanılan biyomalzemeye göre sensör tipleri .....	5
1.1.3.1. Enzim sensörleri .....	5
1.1.3.2. DNA sensörleri .....	5
1.1.3.3. İmmünoensörler .....	6
1.1.3.4. Mikrobiyal biyosensörler.....	6
1.1.3.5. Doku biyosensörleri.....	8
1.1.4. Biyosensörlerin kullanım alanları .....	8
1.2. Fiziksel Tayin Yöntemleri .....	10
1.2.1. Elektrokimyasal esaslı tayinler .....	10
1.2.1.1. Potansiyometrik teknikler .....	10
1.2.1.2. Amperometrik teknikler.....	11
1.2.2. Termometrik esaslı tayinler .....	12
1.2.3. Piezoelektrik esaslı tayinler .....	12
1.2.4. Fotometrik esaslı tayinler.....	13
1.3. Kimyasal Tayin Yöntemleri.....	13
1.3.1. Transformasyon reaksiyonları .....	13
1.3.2. Bağlanma reaksiyonları .....	14
1.4. Fenolik Bileşikler.....	14
1.5. Fenolik Bileşikleri Tayin Yöntemleri .....	16
1.6. Polifenol Oksidaz.....	17

1.6.1.	PPO'nun bazı özellikleri ve kaynakları .....	20
1.6.2.	Gıda kalitesi üzerine PPO' nun etkileri .....	21
1.6.3.	PPO' nun endüstriyel uygulamaları .....	22
1.7.	Kayısı .....	22
1.8.	Jelatin .....	25
1.9.	Glutaraldehid .....	25
1.10.	Amaç .....	26
<b>2.</b>	<b>MATERYAL VE METOD .....</b>	<b>27</b>
2.1.	Materyal .....	27
2.2.	Metod .....	31
2.2.1.	Kayısı numunesinin toplanması ve saklanması .....	31
2.2.2.	Çözünmüş oksijen probunun çalışma ilkesi.....	31
2.2.3.	Fenol tayinine yönelik çözünmüş oksijen probu temelli doku biyosensörünün çalışma ilkesi .....	33
2.3.	Fenol Tayinine Yönelik Kayısı Dokusu Temelli Biyosensörün Hazırlanması .....	34
2.4.	Fenol Tayinine Yönelik Kayısı Homojenat Temelli Biyosensörlerde Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyonu .....	36
2.4.1.	Kayısı miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi .....	36
2.4.2.	Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi .....	37
2.4.3.	Glutaraldehid miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi .....	38
2.5.	Kayısı Dokusu Temelli Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonu .....	38
2.5.1.	Optimum pH değerinin belirlenmesi .....	38
2.5.2.	Uygun tampon sisteminin belirlenmesi .....	39
2.5.3.	Uygun tampon konsantrasyonunun belirlenmesi.....	39
2.5.4.	Optimum sıcaklığın belirlenmesi.....	39
2.6.	Kayısı Dokusu Temelli Biyosensörün Karakterizasyonu.....	40
2.6.1.	Fenol için doğrusal tayin aralığı .....	40
2.6.2.	Termal kararlılığın Belirlenmesi.....	40
2.6.3.	Operasyonel kararlılığın belirlenmesi.....	40
2.6.4.	Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi .....	40
2.6.5.	Substrat spesifikliği ve girişim etkilerinin belirlenmesi .....	41



2.6.6.	Depo kararlılığının belirlenmesi .....	41
2.7.	Kayısı Dokusu Temelli Biyosensör İle Bazı Fenolik Bileşiklere ve Polifenollere Yönelik Ölçümler .....	41
<b>3.</b>	<b>BULGULAR VE TARTIŞMA</b> .....	<b>42</b>
3.1.	Kayısı Dokusu Temelli Biyosensörlerde Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyonuna İlişkin Bulgular .....	42
3.1.1.	Kayısı miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi .....	42
3.1.2.	Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi .....	43
3.1.3.	Glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	45
3.2.	Kayısı Dokusu Temelli Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonuna İlişkin Bulgular .....	46
3.2.1.	Optimum pH .....	46
3.2.2.	Uygun tampon sistemi .....	47
3.2.3.	Uygun tampon konsantrasyonu .....	48
3.2.4.	Optimum sıcaklık.....	50
3.3.	Kayısı Dokusu Kullanılarak Hazırlanan Doku Biyosensörünün Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular .....	51
3.3.1.	Fenol tayin aralığı .....	51
3.3.2.	Termal Kararlılığın Belirlenmesi.....	52
3.3.3.	Operasyonel kararlılık.....	53
3.3.4.	Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği .....	54
3.3.5.	Substrat spesifikliğı ve girişim etkileri .....	55
3.3.6.	Depo kararlılığı.....	56
3.4.	Kayısı Dokusu Temelli Biyosensör İle Bazı Fenolik Bileşiklerin ve Polifenollerin Tayinine İlişkin Bulgular .....	57
3.4.1.	Kateşol tayin aralığı .....	57
3.4.2.	Pirogallol tayin aralığı .....	58
3.4.3.	L-Askorbik asit tayin aralığı .....	59
3.4.4.	4-Metilkateşol tayin aralığı .....	60
3.4.5.	L-Tirozin tayin aralığı.....	61
3.4.6.	4-Etil rezorsin tayin aralığı .....	62
3.4.7.	Hidrokinon tayin aralığı.....	64
3.4.8.	8-Hidroksikinolin tayin aralığı.....	65
<b>4.</b>	<b>GENEL DEĞERLENDİRME</b> .....	<b>66</b>

<b>5.</b>	<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>68</b>
	<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>77</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Biyosensörlerin çalışma prensibinin şematik gösterimi .....	2
Şekil 1.2. Biyomoleküllerin immobilizasyon metodları.....	4
Şekil 1.3. Polifenol oksidazların reaksiyonları .....	18
Şekil 1.4. Koyu renkli pigmentlerin oluşumu sürecinde gerçekleşen enzimatik olmayan reaksiyonlar .....	19
Şekil 1.5. Malatya kayısısından görünümeler .....	22
Şekil 2.1. YSİ Model 58 çözünmüş oksijen probunun şeması.....	31
Şekil 2.2. Oksijenin reaksiyon ortamından katoda ulaşana kadar karşılaştığı difüzyon engellerinin şematik gösterimi .....	32
Şekil 2.3. Doku temelli biyosensörün kuramsal modeli.....	33
Şekil 2.4. Biyosensörün hazırlanma basamakları.....	35
Şekil 2.5. Doku temelli biyosensörler ile fenol tayini için ölçüm düzeneği.....	35
Şekil 3.1. Kayısı miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	42
Şekil 3.2. Kayısı dokusu temelli biyosensör cevabı üzerine jelatin miktarının etkisi..	44
Şekil 3.3. Glutaraldehid miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi.. .....	45
Şekil 3.4. Kayısı dokusu temelli biyosensörün optimum pH grafiği.....	47
Şekil 3.5. Tampon sisteminin biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	48
Şekil 3.6. Tampon konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi. ....	49
Şekil 3.7. Kayısı dokusu temelli biyosensörün optimum sıcaklık grafiği.....	50
Şekil 3.8. Doku temelli biyosensör için fenol tayin aralığı .....	52
Şekil 3.9. Doku biyosensörünün termal kararlılığı.....	53
Şekil 3.10. Kayısı dokusu temelli biyosensörün operasyonel kararlılığı.. .....	54
Şekil 3.11. Doku temelli biyosensörün depo kararlılığı.. .....	56
Şekil 3.12. Doku temelli biyosensör için kateşol tayin aralığı .....	58
Şekil 3.13. Doku temelli biyosensör için pirogallol tayin aralığı.....	59
Şekil 3.14. Doku temelli biyosensör için L-Askorbik asit tayin aralığı. ....	60
Şekil 3.15. Doku temelli biyosensör için 4-metilkateşol tayin aralığı.....	61
Şekil 3.16. Doku temelli biyosensör için L-Tirozin tayin aralığı.....	62
Şekil 3.17. Doku temelli biyosensör için 4-Etilrezorsin tayin aralığı .....	63
Şekil 3.18. Doku temelli biyosensör için hidrokinon tayin aralığı.....	64
Şekil 3.19. Doku temelli biyosensör için 8-hidroksikinolin tayin aralığı.....	65

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1.1.</b> Biyosensörler için uygulama olanakları .....	9
<b>Çizelge 1.2.</b> Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz alanları .....	9
<b>Çizelge 1.3.</b> Farklı sebze ve meyvelerdeki PPO' ların bazı özellikleri .....	21
<b>Çizelge 1.4.</b> 100 g taze kayısı için elde edilen içerik değerleri . .....	23
<b>Çizelge 2.1.</b> Kullanılan substratlar ve yapıları .....	30
<b>Çizelge 2.2.</b> Kayısı dokusu temelli biyosensörün hazırlanma basamakları. ....	34
<b>Çizelge 3.1.</b> Doku temelli biyosensör ile alınan sonuçların tekrarlanabilirliği. ....	55
<b>Çizelge 3.2.</b> Doku temelli biyosensörün substrat spesifikliğı ve girişim etkileri. ....	55

## SİMGELER VE KISALTMALAR

BHA	Bütillenmiş hidroksi toluen
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
GC	Gaz kromatografisi
GOD	Glukoz oksidaz
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IU	International unit
PPO	Polifenol oksidaz
SCE	Doygun kalomel elektrot
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SS	Standart sapma
THB	Trihidroksi benzen
$\bar{X}$	Ortalama değer
VK	Varyasyon katsayısı

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Biyosensörlere Genel Bakış

Tüm canlılar yaşadıkları ortamdaki değişimleri algılayıp, yaşamlarını sürdürebilmek için bu değişimlere uymaya çalışırlar. İşte bu algılama mekanizması biyosensörlerin *in vitro* kullanımı için temel oluşturmuştur [1].

Canlılar insanların hayal bile edemeyeceği bir duyarlılığa sahiptirler. Örneğin köpeklerin insanlara göre koku almada oldukça duyarlı olmaları, kelebeklerin partnerlerini yaydıkları birkaç molekül ile hissedebilmeleri, algilerin zehirli maddelere karşı çok duyarlı olmaları gibi. Bu canlılarda, ilgili mesajları algılamayı sağlayan biyolojik maddelerin, analiz sistemleri ile birleştirilmesi biyosensörleri oluşturmuştur. Biyosensörler, biyolojik proseslerin izlenmesinin yanında pek çok endüstriyel ve medikal alanda uygulamaya sahiptir [1].

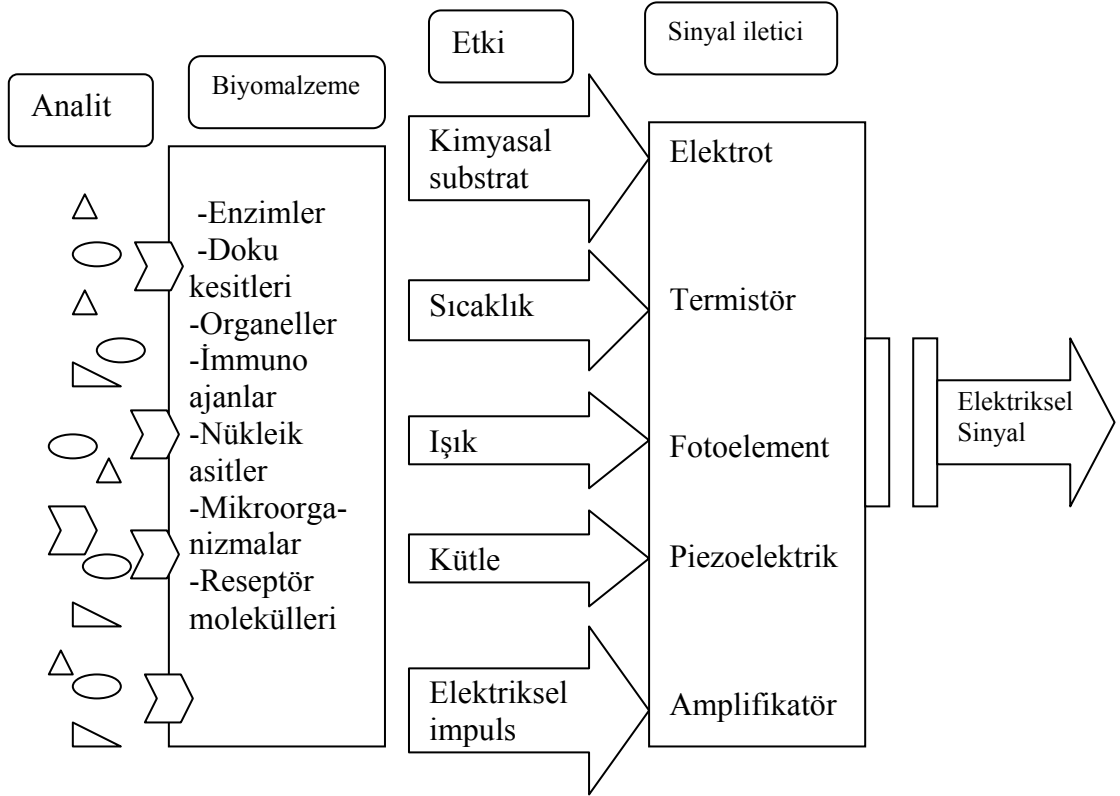
Biyosensörlerin tarihsel gelişimine bakıldığında, ilk kez 1962 yılında Clark ve Lyons tarafından enzim içeren biyomembranlar kullanılarak, oksijen ve ürenin sırasıyla bir oksijen elektrodu ve pH metre vasıtasıyla tayin edilebilecek ürünlere dönüştürülmesi sağlanmıştır. Ardından; 1967 yılında Updike ve Hicks bir oksijen elektrodu yüzeyine glukoz oksidaz içeren polimer jel tabakası kaplı olarak bir enzim elektrodu hazırlamışlardır. Bu elektrodun glukoz ve oksijen içeren biyolojik bir ortama yerleştirilmesi durumunda, her iki bileşen de membran içerisinde difüzyonla ve glukozun oksijen vasıtasıyla glukonik aside oksidasyonu gerçekleşmektedir ki böylece oksijen elektrodu, glukoz konsantrasyonu ile orantılı olarak gerçekleşen kısmi oksijen basıncındaki indirgenmeyi ölçmektedir [2]. Bu buluş, biyolojik analizler açısından önemli bir adımdır. Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonların tayini mümkün iken sisteme biyomalzemelerin de dahil edilmesi diğer pek çok madenini tayinini mümkün kılmaktadır. Hazırlanan bu tip analiz sistemlerine “Biyosensör” adı verilir [1-4].

Canlılarda ilgili mesajları algılamayı sağlayan sistemlerin analiz sistemleri ile birleştirilmesi biyosensörleri oluşturmuştur [5].

### 1.1.1. Biyosensörlerin bileşenleri

Biyosensörler; biyokomponentler (reseptör) ile fiziksel komponentlerden (transduser, dönüştürücü) oluşurlar. Biyosensörlerin görevi, biyolojik bir olayın elektriksel bir sinyale dönüştürülmesidir [1]. Biyosensörler, spesifik bir analit ya da analitler grubunun konsantrasyonuna bağlı olarak sinyal oluştururlar [6].

Biyosensörlerin biyolojik bileşeni; katalitik ve katalitik olmayan özellik taşıyan biyomalzemeler olarak iki önemli gruba ayrılırlar. Katalitik özellikteki grup; enzim, mikroorganizma ve dokuları içerirken, katalitik olmayan özellikteki grup; antikorlar, reseptör ve nükleik asitlerden oluşur [6]. Biyomalzemeler analizlenecek maddeyi dönüşüme uğratırlar ve bu dönüşüme eşlik eden değişimler dönüştürücü tarafından algılanır.



Şekil 1.1. Biyosensörlerin çalışma prensibinin şematik gösterimi

Biyosensörlerin, analitlerin tayini için gerekli olan dönüştürücü kısmı ise elektrokimyasal (amperometrik, potansiyometrik ve kondüktometrik), optik, termometrik, piezoelektrik ya da manyetik özellikteki gruplardan oluşabilir [6,7].

### 1.1.2. Biyokomponentlerin immobilizasyonu

Enzimler, çokluenzim kompleksleri, dokular, mikroorganizmalar, organeller, hücre reseptörleri, antibadiler, nükleik asitler ya da tüm hücre (bakteri, fungus, hayvan ya da bitki) analitlerin tayini için kullanılan biyolojik malzemelerdir. Bu biyomoleküllerin immobilizasyonu için çeşitli metodlar kullanılabilir. Biyoreseptörün kimyasal yapısı ve fiziksel durumuna göre immobilizasyon yöntemi belirlenir. En fazla kullanılan teknikler; fiziksel adsorbsiyon, tutuklama, moleküller arası çapraz bağlama ve kovalent bağlamadır [6].

**a) Adsorbsiyon:** Selüloz, silikajel, cam, hidroksiapatit ve kollagen enzimleri adsorblamak için kullanılan başlıca yapılardır. Hidrojen bağları, çoklu tuz köprüleri, Van der Waals bağları ve elektron transisyon kompleksleri oluşumu sayesinde bağlanma gerçekleşir. Sorpsiyon tersinir bir olay olduğundan adsorpsiyon ile immobilizasyon güvenilir bir yöntem değildir ama yinede biyosensörlerde başarılı uygulamaları vardır [8].

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

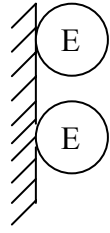
**c) Çapraz bağlama:** Glutaraldehid, heksametilen di-izosiyanat, 1,5-difloro-2,4 dinitrobenzen ve bis-diazobenzidin-2,2-disülfonik asid gibi bifonksiyonel ve multifonksiyonel reaktiflerin kullanılmasıyla biyomoleküllerin moleküller arası çapraz bağlanması sağlanır. Bu reaktifler, katı desteklere biyomolekülleri bağlayabilirler. Tutuklama yöntemi ile kimyasal bağlamanın birleştirilmiş şekli olarak uygulanır.

**d) Kovalent bağlama:** Biyoreseptörün dönüştürücü yüzeyine kimyasal reaksiyon sonucu kovalent bağlanmasıdır. Enzimde katalitik aktivite için gerekli olmayan işlevsel grupların bağlanması yoluyla gerçekleştirilir. Enzimlerin kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için esansiyel olan aminoasitler üzerinden gerçekleşmemesi ve bu grupların bağlanma sırasında sterik olarak rahatsız edilmemesidir. Genellikle proteinlerin amino asit yan zincirlerinde

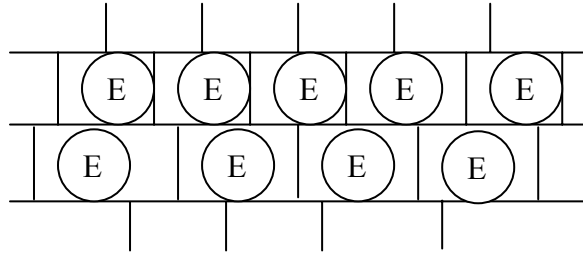


bulunan amino, karboksil, imidazol, tiyol, hidroksil gibi nükleofilik işlevsel gruplarla kovalent bağlama yapılır [6].

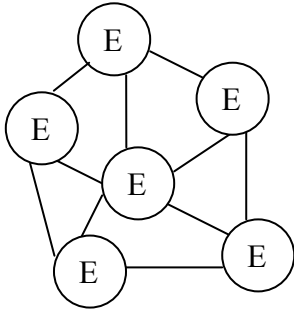
Biyomoleküllerin immobilizasyonu için kullanılan çeşitli metodlar Şekil 1.2’de gösterilmiştir.



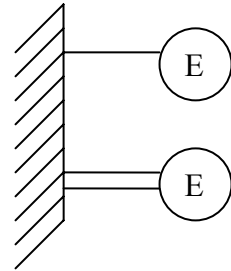
1. Adsorbsiyon



2. Tutuklama



3. Çapraz Bağlama



4. Kovalent Bağlama

**Şekil 1.2** Biyomoleküllerin (örneğin bir enzimin,  $\text{E}$ ) immobilizasyon metodları

### **1.1.3 Kullanılan biyomalzemeye göre sensör tipleri**

Biyosensörlerin hazırlanmasında değişik biyomalzemeler kullanılmakla birlikte kullanılan biyomalzemeye göre biyosensörler sınıflandırılmaktadır. Bunlar biyomalzeme olarak enzimlerin kullanıldığı enzim sensörleri, deoksiribonükleik asitlerin (DNA) kullanıldığı DNA sensörleri, antijen veya antibadi'lerin kullanıldığı immünosensörler, mikroorganizmaların kullanıldığı mikrobiyal biyosensörler ve dokuların kullanıldığı doku biyosensörleri olmak üzere başlıca beş sınıfa ayrılırlar.

#### **1.1.3.1. Enzim sensörleri**

Biyosensör teknolojisinin tarihsel gelişimine bakıldığında bu alandaki ilk çalışmaların enzim sensörleri ile başladığı görülmektedir. 1962'de Clark ve Lyons ve 1967'de Updike ve Hick tarafından rapor edilen glukoz tayinine yönelik glukoz oksidaz enzim elektrotları bu konudaki ilk örnekleri oluşturmaktadır [9].

Temel bilimlerdeki ilerlemeler enzimlerin yanı sıra diğer biyolojik malzemelerin işlevlerinin de çok daha ayrıntılı bir şekilde ortaya çıkmasına imkan vermiştir. Bu ilerlemelerin doğal bir sonucu olarak farklı biyolojik malzemelerin ve iletim sistemlerinin birleştirilmesiyle çok çeşitli biyosensörler geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam edilmektedir (Bugünkü sonuca bakıldığında hangi temel iletim sistemi söz konusu olursa olsun elektrokimyasal esaslı olanların tartışılmaz bir ağırlığı söz konusudur, pratik ve ticari uygulamalarda enzim elektrotlarının büyük bir üstünlüğü göze çarpmaktadır). Bu sonuçtaki en büyük etmen canlı sistemlerle ilgili hemen hemen her türlü maddenin doğrudan veya dolaylı olarak analizinde kullanılabilecek binlerce enzimin varlığıdır. Bilinen enzimlerin yanı sıra bilinmeyenlerin potansiyel varlığı, piyasada yüzlerce enzim ve preparatının bulunabilirliği ve bu sayının her geçen gün yükselmesinin enzim sensörlerinin tartışılmaz üstünlüğünün devam edeceğinin bir göstergesidir [9].

#### **1.1.3.2. DNA sensörleri**

Melezleme, amplifikasyon ve rekombinasyon gibi DNA tekniklerinin hepsi DNA'nın ikili yapısını ele alırlar. Nükleik asitlerin melezlemesi DNA biyosensörlerinin en önemli prensibidir [10].

DNA sensörlerinde tek zincirli DNA prob (sensör, duyarga) yüzeyine; adsorbsiyon, çapraz bağlama, enkapsülasyon, avidin-biyotin kompleksleri ile veya kovalent bağlama yöntemi kullanılarak immobilize edilir [11]. Karışımındaki farklı bir çok non-komplementer (tamamlayıcı olmayan) nükleik asitlerin varlığında yalnızca yüksek spesifiklikle komplementer (tamamlayıcı) nükleik asit duyarga ile melez oluşturur. Oluşan çift zincirli DNA bir sinyal meydana getirir [12].

DNA biyosensörleri ölçüm yöntemine göre optik, elektrokimyasal, piezoelektrik olarak sınıflandırılabilirler [10].

Son yıllarda birçok bileşiğin tayini amacıyla nükleik asitlerin kullanımında artış gözlenmektedir. DNA biyosensörleri kalıtsal hastalıkların tespiti, patolojik enfeksiyonların hızlı bir şekilde tayini, moleküler biyolojide tamamlayıcı DNA (cDNA) kolonilerinin taranması gibi amaçlarla klinik alanda kullanılırlar [13].

Ayrıca DNA biyosensörleri, kanserojenler, ilaçlar ve mutajenik kirleticilerin varlığında gıda ve bitki örnekleri DNA'sın da meydana gelen yapısal farklanmanın bulunmasında da kullanılmaktadır [14].

### **1.1.3.3. İmmünosensörler**

Yüksek seçimlilikteki antijen-antibadi reaksiyonlarının duyarlı detektörlerle kombinasyonu immünosensörleri oluşturur [15]. Bu tip sensörler antijen-antibadi reaksiyonlarının spesifikliğinden dolayı mükemmel seçimliliği olan sistemlerdir [6]. İmmünolojik temelli sensörler çevre, klinik ve savunma amaçlı kullanılabilirler [6]. İmmünosensörlerle hücreler, sporlar, zehirler, mikroorganizmalar, virüsler, pestisidler ve endüstriyel kirleticiler analizlenebilirler [13].

İmmünosensörlerde, elektrokimyasal (amperometrik, potansiyometrik, kondüktometrik), optik (floresans, lüminesans, refraktif indeks), kütle veya ısı özellikli dönüştürücüler kullanılabilir [11].

### **1.1.3.4. Mikrobiyal biyosensörler**

Bugün bir *Escherichia coli* (*E.coli*)i hücresinde bile 3000'den fazla enzim bulunduğu kabul edilmektedir. Gelişmiş hücrelerdeki enzim sayısının çok daha fazla olacağı açıktır. Saf enzimlerle gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonları elbette bu enzimi içeren hücre ile de gerçekleştirilebilir. Bunun için ana koşul hedeflenen

biyotransformasyon reaksiyonunun hücrenin içerdiği diğer enzimler tarafından etkilenmemesidir. Enzimler ile hazırlanan biyosensörler yerine mikroorganizmalar ile hazırlananların kullanılmasının birçok avantajı vardır.

- Enzimler doğal ortamlarında bulunacaklarından dış etkilere karşı daha dayanıklıdır
- Koenzimle çalışan enzimler için dışarıdan koenzim ilavesi gerekmez, ayrıca koenzimlerin rejenerasyonu da hücre içinde gerçekleşir
- Enzim elektrotlarından genelde daha uzun ömürlüdürler
- Enzim izolasyonu ve saflaştırılması çok yorucu ve masraflı bir iştir. Bu sebeple saf enzim yerine hücre kullanılması çok ekonomiktir
- Ayrıca hücre içi enzimler kullanılması durumunda tek enzim yerine birçok enzimin katıldığı bir reaksiyon dizisi incelenecekse enzim yerine hücre kullanılması yine önemli bir avantajdır.

Buna karşın mikrobiyal sensörlerin bazı sakıncaları da vardır:

- Hücre membranı bir difüzyon bariyeri oluşturduğundan makromoleküller ve membrandan geçemeyen moleküller için uygun biyosensörler hazırlanamaz
- Mikrobiyal sensörlerin cevap süresi ve kullanımdan sonra temel sinyal düzeyine dönüş süresi enzim sensörlerinden uzundur
- Hücre birçok enzim içerdiğinden hedeflenen tayin reaksiyonunun diğer enzimler tarafından etkilenmesi söz konusu olabilir.

Çözünmüş oksijen elektrodu mikrobiyal sensörler için en yaygın dönüştürücüdür. Bunun dışında CO<sub>2</sub> elektrodu, NH<sub>3</sub> elektrodu, cam elektrod ve termistör de kullanılmaktadır.

Hedeflenen analizin dayandığı enzimatik reaksiyon sonucu entalpide bir değişme oluyor ise termistörler, biyokomponent olarak foto-bakterilerin kullanılması durumunda ise foto-dedektörler dönüştürücü olarak kullanılır.

Mikrobiyal biyosensörlerin birçok uygulama alanı vardır ama en yaygın olarak gıda ve çevre analizlerinde kullanılırlar [1].

### **1.1.3.5. Doku biyosensörleri**

1981’de ilk defa bitki dokusu temelli elektrot hazırlanmasından itibaren, birçok bitki dokusu temelli biyosensör geliştirilmiştir. Bitki dokusu temelli biyosensörlerin birçoğu: amperometrik elektrotlar, potansiyometrik dönüştürücüler ya da bu sistemlerin gaz-duyar elementlerle birleştirilmesi sonucu oluşturulmaktadır [16].

Bitki doku malzemeleri kullanılarak oluşturulan biyosensörler, izole enzimlerle oluşturulan enzimlere bir alternatiftir [17].

Hayvansal ve bitkisel dokuların ve organellerin kimi enzimlerce özellikle zengin olduğu bilinmektedir. İşte bu enzimlerin izole edilmiş preparatları yerine doğrudan yoğun buldukları bu kaynaklar biyosensör hazırlanmasında kullanılır [1].

Doku biyosensörlerinde enzimin saflaştırılması gerekliliği ortadan kalkar, ayrıca doku biyosensörleri bazı enzimler için doğal ortamda artan kararlılık ve düşük maliyet gibi avantajlara sahiptirler [18,19].

Doku kesitleri kullanıldığında biyosensörün cevap süresi genellikle uzundur. Bu süreyi kısaltmak için doku kesiti yerine bir havanda dokunun ezilmesiyle hazırlanan ve iyice homojenize edilen kısım kullanılır [1].

### **1.1.4. Biyosensörlerin kullanım alanları**

Biyosensörler tıp, tarım, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma ve birçok endüstriyel aktivitede özellikle otomasyon, kalite kontrolü, durum tespiti ve enerji saklanması çok önemli rol oynarlar. Bugüne kadar 180’ den fazla farklı madde için biyosensör hazırlanmış olup bunlardan ancak 25 kadarı ticari olarak üretilmektedir. Biyosensörler için mümkün uygulama alanları Çizelge 1.1 de verilmiştir [9].

Biyosensörler; gıda maddeleri, metabolitler, vitaminler, antibiyotikler, ilaçlar gibi organik maddeler, bazı anorganik bileşikler yanında enzimler, virüsler ve mikroorganizmaların tayininde kullanılırlar. Bunların dışında biyolojik oksijen ihtiyacı (BOD), toksisite ve mutajenite testlerinde de başarı ile uygulanmaktadır. Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz alanları Çizelge 1.2 de verilmiştir [9].

### Çizelge 1.1. Biyosensörler için uygulama olanakları



### Çizelge 1.2. Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz alanları

<b>Biyosensör Grubu</b>	<b>Kapsadığı Analiz Alanı</b>
Enzim Sensörleri	Küçük moleküllü organik ve anorganik maddeler (Metabolitler, ilaçlar, gıda maddeleri, vitaminler, antibiyotikler, pestisitler vb.)
Mikrobiyal Sensörler	Enzim sensörlerinin kapsadığı alanlar, BOD, toksisite, mutajenite
DNA Sensörleri	Virüsler, patojen mikroorganizmalar
İmmüno-sensörler	Virüsler, patojen mikroorganizmalar, ksenobiyotikler

Hiç kuşkusuz biyomedikal sektör biyosensörler için en iyi pazardır. Bu alanda uygulama olanağı bulan ilk biyosensörler enzim sensörleridir. Ticari olarak üretilen ilk biyosensör ise şeker hastalığı teşhisi için kan ve idrarda glukoz tayinini mümkün kılan glukoz oksidaz elektrodudur [20].

Bunu renal fonksiyon testleri için geliştirilen üre ve kreatinin elektrotları ile kas gücünü ölçmeye yönelik laktat elektrodu izlemiştir [20].

İnsan vücuduna takılabilen biyosensörlerde geliştirilmiş olup bunlar biyolojik sıvılar vücut dışına alınmadan ve tüketilmeden analiz imkanı verirler ki, özellikle ameliyat sırasında bu bilgilerin kesintisiz sağlanması çok önemlidir. Biyosensörlerin, ilaçların vücuttaki düzeylerinin ayarlanması ve kontrolünde kullanılması yakın bir gelecekte gerçekleştirilebilecektir. Yapay pankreas çalışmaları buna güzel bir örnektir [20].

Toprak, hava ve su kirliliğinin kontrolünde mikrobiyal sensörler ve enzim sensörleri kullanılmaktadır [20].

Biyosensör piyasası günden güne gelişmektedir. 2000 yılında 1,4 milyar dolarlık piyasanın % 45'i tıp, %22'si gıda, %17'si çevre koruma ve biyoteknoloji, kalan % 16'sının ise diğer sektörlere yönelik olduğu vurgulanmaktadır [20].

## **1.2. Fiziksel Tayin Yöntemleri**

### **1.2.1. Elektrokimyasal esaslı tayinler**

#### **1.2.1.1. Potansiyometrik teknikler**

Bir referans ve uygun bir çalışma elektrodu ile bir çözeltideki potansiyel farkını ölçen tekniğe potansiyometri denir. Referans elektrod kendi çevresinden bağımsız potansiyele sahiptir. Çalışma elektrodu, çözeltideki maddelerin bazılarında seçicilik gösterir. Analizi yapılacak çözeltiye daldırılan bu elektrod ile aynı çözelti ile temasta olan bir referans elektrodu arasında oluşan gerilim değeri ile analizi yapılan maddenin derişimi arasında logaritmik ilişki vardır [2]. İçte ve dışta bulunan çözeltilerde analizi yapılacak maddenin derişimi açısından bir fark varsa membranın iç ve dış yüzeyleri arasında bir gerilim farkı oluşur. Bu elektrotlar ve yanıtta sorumlu maddelerin konsantrasyonları arasındaki potansiyel farkı içeren temel ilişkiyi Nernst eşitliği açıklar [21].

$$E = E_0 + (RT) / (nF) \ln [(Ox) / (Red)]$$

[Ox] ve [Red] ifadeleri sistemde yükseltgenen ve indirgenen maddelerin konsantrasyonlarını göstermektedir. Nernst eşitliğinin bu gösterimi sadece çok seyreltik çözeltilerde geçerlidir. İyonik konsantrasyon arttıkça, ideal termodinamik şartlardan uzaklaşır ve bu durumda konsantrasyon ( C ) ifadesi yerini iyonik aktiviteye ( a ) bırakır;

$$a = \gamma C$$

$\gamma$ : Aktivite katsayısı

Potansiyometrik enzim elektrotlarında kullanılan temel sensör; pH yada tek değerli iyonlara duyar cam elektrotlar, anyon yada katyonlara duyar iyon seçimli elektrotlar ve CO<sub>2</sub> yada NH<sub>3</sub> e yönelik gaz duyar elektrotlardır. Potansiyometrik esaslı enzim elektrotları söz konusu sensörler üzerine bir veya birden fazla enzimin uygun immobilizasyon yöntemleri ile immobilizasyonu ile hazırlanabilir. Cam membranlar yapısının modifikasyonu ile NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> gibi monovalent katyonlara duyarlı hale getirilirler. Bu elektrotlar da daha sonra enzim sensörleri olarak kullanılabilirler. Buna örnek olarak üre-duyarlı enzim sensörü verilebilir. Burada üre, üreaz kaplı cam membran ile enzimatik reaksiyon sonucu oluşan NH<sub>4</sub><sup>+</sup> iyonları ile tayin edilmektedir. pH elektrodu, gaz geçişini mümkün kılan hidrofobik bir membran ile kaplanması durumunda, CO<sub>2</sub> ve NH<sub>3</sub> gibi asidik ya da bazik gazların membrandan geçişi mümkün kılıp gaz konsantrasyonuna bağlı olarak oluşan pH değişimi, gaz duyar biyosensörlerin hazırlanmasında temel oluşturacaktır [21].

### 1.2.1.2. Amperometrik teknikler

Bir mikro çalışma elektrodu ile karşıt elektrot arasında dışarıdan denge geriliminden farklı bir gerilim uygulanırsa, sistem yeniden dengeye ulaşmaya çalışır ve bu sırada bir elektrot tepkimesi olur ve bu iki elektrot arasından akım geçer. Bu yöntem amperometri adı verilir. Çalışma elektrodunda indirgenen ve yükseltgenen madde bir katyon, bir anyon ya da yüksüz bir bileşik olabilir. Çözeltide destek elektrolit denen ve elektrotlar arasına uygulanan gerilim değerinde elektroaktif olmayan iyonların fazla miktarda bulunması çözeltinin elektriksel direncini azaltır [21]. Türlerin indirgenmesi ve yükseltgenmesi genelde çalışma elektrodunda gerçekleşir ve ikinci bir



elektrot referans olarak kullanılır. Çalışma elektrodunun anot ya da katot olarak iş görmesi tamamen analitin yapısına bağlıdır. Buna örnek olarak glukoz oksidaz biyosensörü verilebilir. Burada enzimatik reaksiyon sonucu oluşan  $H_2O_2$ 'nin tayini mümkün olabildiği gibi glukozun oksidasyonu süresince tüketilen oksijende izlenebilir.  $H_2O_2$ 'nin izlenmesi durumunda bir platin elektrot anot olabilmektedir ki (+0,6V/SCE) gibi pozitif bir değerde polarizasyonu olasıdır. Diğer durumda, oksijenin izlenmesi halinde kullanılacak çalışma elektrodunun negatif bir potansiyelde (-0,6V/SCE) polarize olması ve katot işlevini görmesi gerekmektedir.

Oksijen problemleri platin bir katot ve gümüş klorür ile kaplı gümüş bir anodu içermektedir. Bunların her ikisi KCl çözeltisi içerisinde olup analit örnekten oksijen duyarlı membran vasıtasıyla ayrılmaktadır. Membran boyunca difüzleneren oksijen katoda indirgenir. Oluşan akım ise örnek içerisindeki oksijen miktarı ile orantılıdır. Biyolojik sistemlerin bu tip elektrotlar üzerine immobilizasyonu ile biyosensörün hazırlanması mümkündür ve enzimatik reaksiyonlarında oksijen tüketilen ya da üreten enzimler bu tip sistemlerde biyolojik malzeme olarak kullanılabilirler [2].

### **1.2.2. Termometrik esaslı tayinler**

Bilindiği gibi ekzotermik reaksiyonlarda kendiliğinden ısı açığa çıkmaktadır. Artan sıcaklık kimyasal reaksiyon sonucu konulan substrat miktarı ile bağlantılıdır. Örneğin glukoz, glukoz oksidaz (GOD) katalizli oksidasyon ile ne kadar çok dönüşüme uğrarsa sıcaklık o ölçüde artmaktadır. Fakat bu sıcaklık artışı oldukça düşüktür. Bu sebepten dolayı sistem çok iyi yalıtılmalıdır. Ayrıca ölçülecek madde de reaksiyona verilmeden önce aynı sıcaklığa getirilmelidir. Minyatür yarı iletken termistör ile sıcaklık ölçümü yapılarak sıcaklıktaki değişim belirlenir ve bu da belli derişimdeki glukoz için karakteristiktir [2].

### **1.2.3. Piezoelektrik esaslı tayinler**

Sauerbry'nin bir formülüne göre kuartzın titreşimi, kütlesi ile ters orantılıdır. Bu özelliğinden dolayı enzimle veya antikor ile kaplanmış bir kuartz kristali mikro terazi olarak kullanılabilir. Bu prensip yardımıyla patlayıcı maddeler, tarım ilaçları, uyuşturucu maddeler veya mikroorganizmalar tespit edilebilir. Bu metodun dezavantajı

her sensörün sadece bir defa kullanılabilmesi ve piezokristalin maliyetinin yüksekliğidir [2].

#### **1.2.4. Fotometrik esaslı tayinler**

Optodların kullanılmasıyla sıvılarda veya  $O_2$  açığa çıkaran veya sarfeden enzim reaksiyonlarında  $O_2$  miktarı belirlenir. Burada temel prensip floresansın izlenmesidir. Optik ölçü aparatı olarak, bir ucuna indikatör konulmuş fiber optik iletkeni kullanılır. Bu indikatörün luminesans veya absorbe etme özelliği, aynı  $O_2$  konsantrasyonunda olduğu gibi kimyasalın miktarına bağlıdır. Buradaki avantaj ölçüm yapılan cihaz ile optik ölçü aparatının birbirinden ayrı yerlerde bulunabilmesidir. Fiber optik iletken magnetik ve elektrik alanlardan etkilenmemektedir (kullanma alanı NMR-Biyoreaktörleri). Bu tip sensörlerin ucuz olması da araştırma alanı olmalarına sebep olmuştur. Biyolojik aktif madde ihtiva etmeyen optik kimyasal sensör olarak adlandırılır [2].

### **1.3. Kimyasal Tayin Yöntemleri**

#### **1.3.1. Transformasyon reaksiyonları**

Tüm katalizörler gibi, enzimler de belirli bir bileşenin dönüştürücünün belirleyebileceği ürün haline dönüşümünü sağlar. Buna örnek olarak penisilini pensillanik aside dönüştüren pensilnaz verilebilmektedir ki oluşan ürün bir pH elektrodu ile tayin edilebilir, oluşan sinyal ise ürünün konsantrasyonu ile orantılı olmaktadır.

Bir enzimatik reaksiyonun substratı, ayrıca tüketilen kosubstratın izlenmesi yoluyla da belirlenebilir. Bunun yanı sıra, koenzim kullanan birçok enzimatik reaksiyonun da bu yolla izlenmesi söz konusu olmaktadır. Bu reaksiyona en güzel örnek koenzim olarak nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) kullanan alkol dehidrogenaz verilebilir. İlgili koenzim fluometrik tayini ile etanol analizi mümkündür. Bununla birlikte, substratın yerine enzim inhibitörlerinin tayini gerçekleştirilebilir. Enzimatik reaksiyon hızlarına etkiyen inhibitörler, elde edilen sinyalde azalmaya sebep olacaktır ki bu da inhibitör konsantrasyonu ile orantılıdır. Pestisit tayinine yönelik kullanılan kolin esteraz enzimi immobilize edilmiş elektrot buna örnek olarak verilebilir [2].

### 1.3.2. Bağlanma reaksiyonları

Antijen ve antikorlar arasındaki bağlanmalar genellikle yüksek spesifikliğe sahiptir ve trasduserler tarafından direkt olarak dedekte edilebilecek optik, kütlesel ve elektriksel yükte farklanmaya sebep olmaktadır. Yükteki farklanmaların antikoron bir iyonofor molekül ile asosiyasyonu sayesinde potansiyometrik elektrod kullanımıyla belirlenmesi mümkündür. Antikor ve komplement sistemleri arasındaki reaksiyon kütlesel farklanma oluşturur. Bağlanma süresinde oluşan kütlesel farklanmalar pizoelektrik dönüştürücüler ile en kolay şekilde saptanabilirler. Burada tayin sınırı oldukça düşük olup, genellikle çok düşük konsantrasyonlu olan enzim inhibitörleri yada immüno ajanların tayini için bu tip dedektörlerin kullanımı uygundur. Hem bağlanma hem de transformasyon reaksiyonlarının belirlenmesi, immüno ajanların enzimatik olarak işaretlemeyle de gerçekleştirilmektedir [15].

### 1.4. Fenolik Bileşikler

Fenolik madde en az bir aromatik halkası bulunan ve bu aromatik halkalara farklı konumlardan bağlı hidroksil gruplarını içeren, ester ve glikozitleri formunda işlevsel yapıları da içerebilen bileşiklerdir [22].

Polifenoller ise her molekülde birden fazla fenol grubunun bulunduğu yapılardır. Polifenoller genelde sebze ve meyvelerde bulunurlar ve metabolizmada yan ürün olarak ortaya çıkarlar. Bu bileşikler antioksidan, antikarsinojenik aktivite ve gıda kalitesine olan etkilerinden dolayı önemlidirler. Polifenoller potansiyel antioksidan bileşiklerdir ve insan sağlığına muhtemel faydaları vardır. Antioksidan polifenollerin en önemli işlevleri serbest radikalleri süpürerek, metalleri tutuklayarak ve lipid peroksidasyonunu önleyerek oksidatif stres parametrelerini ortadan kaldırmasıdır [23-24].

Ayrıca fenolik bileşikler doğal antimikrobiyal ajan, doğal caydırıcılar veya hasat öncesi tohum çimlenme inhibitörleri olarak da davranırlar [25-27]. Bundan başka, fenolik bileşikler nemli maddelerin, tanen ve ligninin doğal bozunmaları süresince ve herbisit ve insektisitlerin metabolik veya fotolitik bozunmaları süresince oluşurlar [28].

Ayrıca polifenollerin, aktive enzimatik sistemler ve prokarsinojenlerini içeren enzimlerin aktivasyonu ve karsinojenlerin inaktivasyonu ile bazı tümörlerin gelişmesine öncülük eden bazı basamakları inhibe etme özellikleri de vardır [29-31].

Polifenoller çok sayıda hidroksil grubu içerir, bu ise bileşiğe potansiyel metal kelatlama özelliği kazandırır ve böylece zararlı bileşenleri yakalayabilir, eksik elektronlarını doyurabilir veya reaksiyon zincirini kırabilir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, polifenoller E ve C vitamininin göstermiş olduğu antioksidan özelliğin dört katına sahiptir [32-35].

Fenolik maddelerin çoğunluğu bitki hücrelerinde glikozit ve ester formunda oluşmaktadır. Bu maddeler, yüksek yapılı polimerler oluşturabilme özellikleri nedeniyle fungitoksik etkiye sahiptirler ve bitkinin hastalıklara karşı dayanıklılığında önemli rol oynarlar [36,37]. Bazı fenoliklerin (gallik asit, p-hidroksibenzoik asit gibi) *Clostridium botulinum*'un A ve B tiplerinin sporlarına karşı etkili olduğu bildirilmiştir. Hidroksisinemat'ların uygun koşullarda küflere ve *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas fluorescens* gibi mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki gösterdiği belirtilmiştir. Bütillenmiş hidroksitoluen (BHA)'ın, *Aspergillus parasiticus* gelişimini ve aflatoksin üretimini tamamen durdurduğu, BHA'nın aynı zamanda *Staphylococcus aureus*, *E.Coli* ve *Salmonella typhimurium* ile *Pseudomonas fluorescens* ve *Pseudomonas fragi* gibi psikrotropik bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterirken *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* ve *Bacillus megaterium*'a karşı bakteriyostatik etki gösterdiği belirtilmiştir. Fenolik maddelerin bu etkilerini hücre enzimlerini inaktive ederek gerçekleştirdikleri belirlenmiştir [38].

Meyve ve sebzeler, bir çok sıvı içecekler (çay, kahve, meyve suyu ve bazı alkollü içecekler), yağlı tohumlar (zeytin, kanola, keten tohumu..vs), tahıllar (mısır, pirinç, nohut, fasulye, buğday..vs) gibi bir çok gıda ve gıda maddeleri polifenollerini içerirler [22].

Fenolik bileşikler oldukça çeşitlidir. Fenolik bileşikler arasında sadece fenol 50' den fazla kimyasalın üretiminde rol oynar. Yaygın olarak reçinelerin, polimerlerin, boyaların, insektisitlerin, herbisitlerin ve farmasotik ürünlerin imalatında kullanılırlar [39].

Polifenollerin parçalanması sonucu oluşan bazı fenolik bileşiklerin çok düşük konsantrasyon seviyelerinde belirlenmesi onların toksisitesinin verilmesi açısından çok önemlidir. Bu fenolik bileşiklerin çoğu bitki ve hayvanlar üzerinde zehirli etkilere sahiptirler ve akut çevresel problemlere yol açabilirler. Fenolik bileşiklerin bazılarının düşük konsantrasyon seviyelerinde bile sularda toksisite oluşturarak insan ve suda yaşayan organizmalar için dikkate alınacak değerde bir kirlilik yarattığı belirlenmiştir.

Bu nedenle bu kirliliklerin izlenmesi ve kontrolü çevrenin korunması için oldukça önemlidir [40].

### 1.5. Fenolik Bileşiklerin Tayin Yöntemleri

Fenolik bileşiklerin belirlenmesinde ki geleneksel metotlar toplam fenoliklerin ölçümüne ya da bazılarının kararma reaksiyonuyla olan ilişkilerinden dolayı, örneğin 1,2- difenoller [41] ölçümüne dayanmaktadır. Ayırma teknikleri temelli metotlardan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) [42,43], gaz kromatografisi (GC) [44,45], kapiler elektroforez [46,47] ve süperkritik sıvı kromatografisi [48] kullanılarak fenolik bileşikler belirlenebilir. Ayrıca toplam fenolik madde miktarı genellikle kimyasal bir yöntem olan Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak belirlenir [49,50].

Fenolik bileşiklerin tayininde genelde enzimlerin immobilize formlarının kullanıldığı enzimatik yöntemler de denenmiştir. Buna yönelik olarak yapılan bir çalışmada kültür mantarından (*Agaricus bisporus*) izole edilen PPO enzimi kullanılarak doğal meyve sularının fenolik içerikleri tayin edilmiştir [51].

Biyosensör alanındaki gelişmelerin sonuçları ile bunların oluşturulması ve dizaynlarındaki problemler birçok çalışmada incelenmiştir. Biyosensörler uzun depo kararlılığı, substrat spesifikliği gibi konularda birçok avantajlara sahiptir. Tüm laboratuvarlarda kolaylıkla başvurulacak yöntemlerdir. Analizlerin tekrarlanabilirliği oldukça yüksektir. Ayrıca yöntem zaman alıcı değildir, pahalı cihazlara ve kimyasallara gerek duymaz [52]. Bunlara ek olarak çoğu, yerinde analize imkan verecek şekilde taşınabilir niteliktedir. Fenolik yapıları bileşiklerin tayinine yönelik biyosensörler genel olarak enzim ve doku biyosensörleri şeklinde tasarlanabilirler.

Fenollerin amperometrik olarak belirlenmesinde PPO (tirozinaz) enzim biyosensörleri kullanılmaktadır. Bu yöntemde PPO enzimi biyokomponent olarak kullanılır [39,53-55]. Bu enzim fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizler ve karşılık gelen o-kinonlara çevirir. Bu iki reaksiyon basamağıyla başarılıdır. Birinci basamakta tirozinaz fenollerini karşılık gelen kateşollere oksitler, ikinci basamakta ise bu kateşoller o-kinonlara oksitlenirler [56]. Mantarlardan izole edilen tirozinazın biyokomponent olarak kullanıldığı biyosensörler ticari olarak mevcuttur [39,56-58].

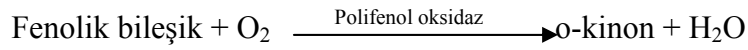
Örneğin, tirozinaz ve kateşol oksidaz enzimlerini içeren biyosensörler zeytinyağı, yeşil çay, üzüm ve yağ ekstraktlarında ve birada ki fenolik bileşiklerin belirlenmesi için geliştirilmiştir. Bir de alkollü elma suyundaki pestisitlerin belirlenmesi için bir PPO

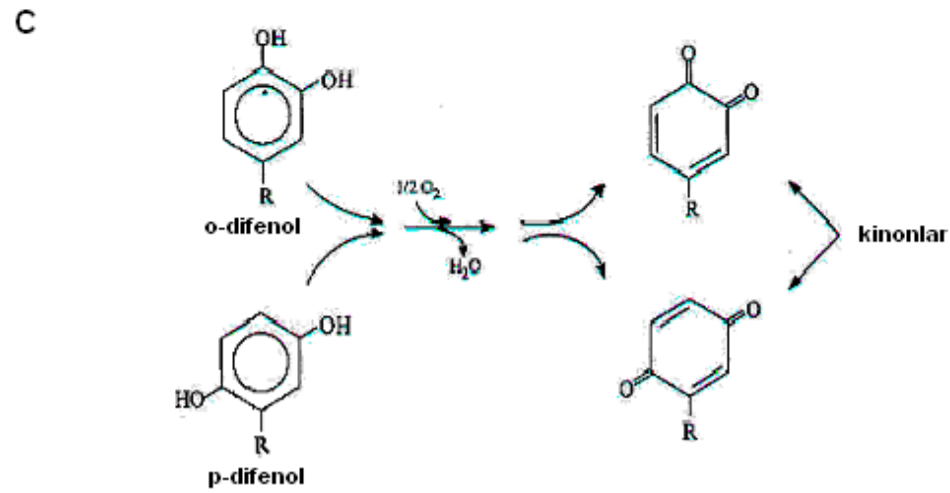
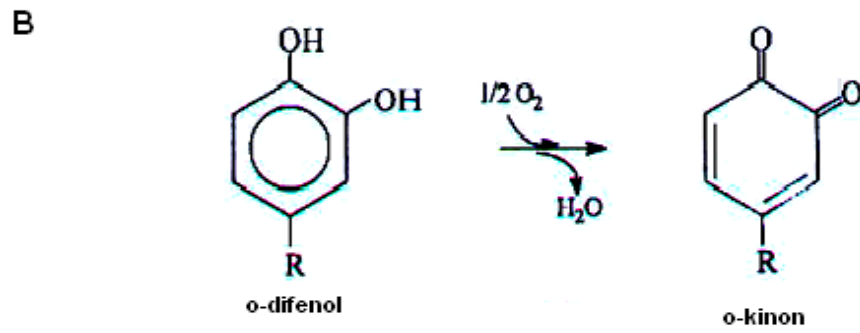
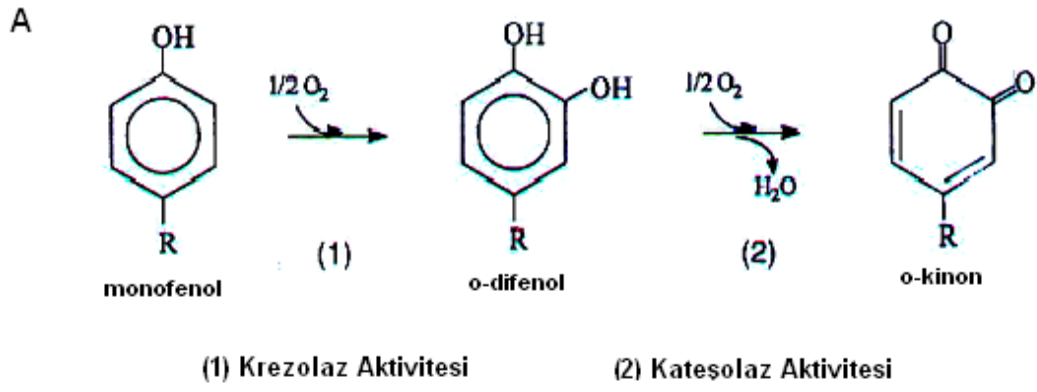
biyosensörü ve içme sularındaki fosfatın belirlenmesi için bir PPO-alkali fosfataz kombinasyonlu biyosensör geliştirilmiştir [59].

### 1.6. Polifenol Oksidaz

Polifenol oksidazlar bakır içeren oksidoredüktazlardır ve moleküler oksijen varlığında fenolik bileşiklerin hidroksilasyonunu ve oksidasyonunu katalizlerler. Substratlarına göre polifenol oksidazlar; tirozinaz, kateşol oksidaz ve lakkaz olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Tirozinaz (EC. 1.14.18.1), monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonunu (monofenolaz ya da krezolaz aktivitesi) ve o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonunu (difenolaz ya da kateşolaz aktivitesi) katalizler. Kateşol oksidaz (EC. 1.10.3.1) sadece o-difenollerin oksidasyonunu katalizler. Lakkaz (EC. 1.10.3.2) ise hem o-difenolleri hem de p-difenolleri karşılık gelen kinonlara oksidasyonunu katalizlerler. Lakkaz ve kateşol oksidaz hidroksilasyon reaksiyonlarını katalizleyemezler. Şekil 1.3. 'de PPO' ların reaksiyon basamakları gösterilmiştir [60].

PPO'ların aktivite için koenzime ihtiyacı yoktur. Bunun dışında grup spesifikliğı gösteren enzimlerdir ve bilinen tüm fenolik bileşikleri substrat olarak kullanırlar [61].



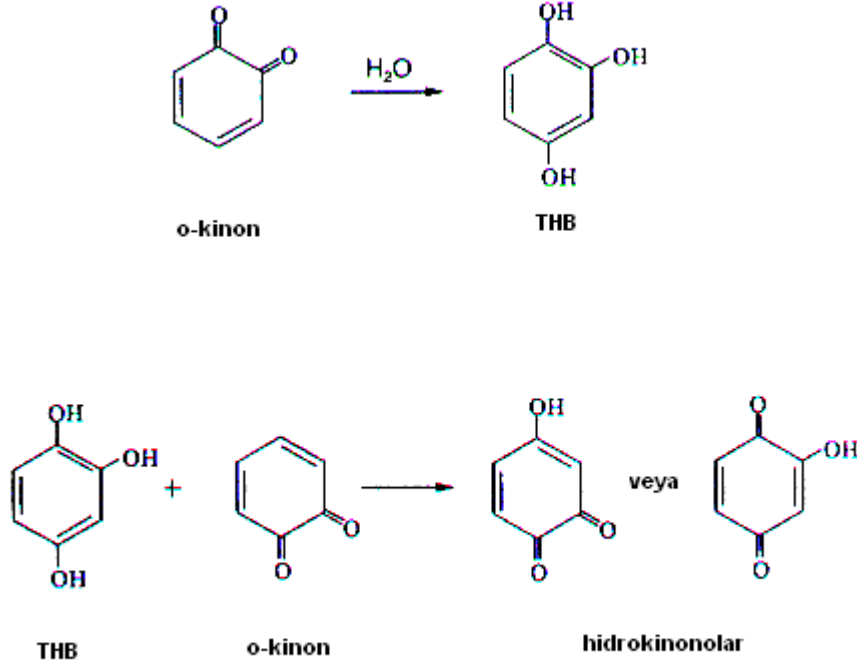


Şekil 1.3. Polifenol oksidazların reaksiyonları [62,63].

(A: Tirozinazın reaksiyon mekanizması, B: Katesol oksidazın reaksiyon mekanizması C: Lakkazın reaksiyon mekanizması)

PPO tarafından oluşturulan o-kinonlar çok reaktiftir ve kendiliğinden tri hidroksi benzenlere (THB) dönüşürler. THB' ler daha sonra o-kinonlarla etkileşerek hidrokinonları oluştururlar ve bunlar kompleks ve koyu renkli pigmentlere polimerize olurlar. Bu reaksiyon enzimatik olmayan kararım reaksiyonu olarak adlandırılır ve bu reaksiyon sebze ve meyvelerin depolanması süresince istenmez.

Şekil 1.4.' de koyu renkli pigmentlerin oluşumu sürecindeki enzimatik olmayan reaksiyonlar gösterilmiştir.



**Şekil 1.4.** Koyu renkli pigmentlerin oluşumu sürecinde gerçekleşen enzimatik olmayan reaksiyonlar [62,63].

Farklı meyve ve sebzelerde PPO' nun substrat spesifikliğı ve fenolik bileşiklerin varlığı çok çeşitlidir. Örneğın, mantarlarda ve patatesde enzimatik kararmanın prekürsörü tirozindir. Şeftali ve armutta enzimatik kararmaya neden olan fenolik bileşikler sırasıyla tanenler ve klorogenik asittir. PPO' nun substrat spesifikliğı bitkinin çeşitli kısımlarında farklı olabilir. Örneğın, elmanın kabuk ve öz kısmındaki enzimatik kararmanın prekürsörleri sırasıyla klorogenik asit ve kateşindir [64].



### 1.6.1. PPO'nun bazı özellikleri ve kaynakları

PPO'lar doğada yaygın olarak dağılmıştır. Bu enzimler yüksek organizasyonlu bitkilerde boldur. Ayrıca birde hayvanlarda ve bazı mikroorganizmalarda, özellikle funguslarda da bulunurlar. Farklı kaynaklardaki PPO' ların özellikleri oldukça değişiktir. Örneğin, bitki PPO' nun substrat spesifikliğı hayvanlardaki PPO' a göre daha geniştir [65].

Bitkilerde PPO başlıca kloroplastların tilakoid membranlarında ve mitokondrilerde lokalize olmuştur [66].

Canlı organizmalarda, PPO çok farklı rollere sahiptir. Örneğin, böceklerde dış iskeletin sklerotizasyon ve melanizasyonundan sorumludur. Ahtapot gibi eklem bacaklılarda siyah renkli mürekkebi oluştururlar. Hayvanlarda, enzim saç ve deri renklenmesinden sorumludur. Oysaki bitkilerde böceklere ve mikrobiyal patojenlere karşı savunma mekanizmasında hayati rol oynar [67].

PPO' nun biyokimyasal özellikleri ve aktivitesi enzimin kaynağına göre değişir (Çizelge 1.3). Bununla beraber, çoğu durumda enzimin optimum pH'sı 5,0 ve 7,0 arasında değişmektedir. Ayrıca PPO enzimi yüksek sıcaklıklarda kararlı bir enzim değildir ve 70 ve 90 °C aralığındaki sıcaklıklara kısa süreli maruz kaldıklarında inaktive olurlar [68].

Polifenol oksidaz enzimi farklı sebze ve meyve dokularında bulunmaktadır. En yoğun olarak kayısı [69,70], muz [71], patlıcan [72], patates [73,74], elma [75], mantar [73] ve avokado'da [73] bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada Malatya kayısılarından polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Bu enzimin en iyi aktivite gösterdiği substratın kateşol, optimum pH değerinin 8,5, optimum sıcaklığının ise 40 °C olduğu bulunmuştur [69].

**Çizelge 1.3.** Farklı sebze ve meyvelerdeki PPO' ların bazı özellikleri

<b>Kaynak</b>	<b>Optimum pH</b>	<b>Optimum Sıcaklık (°C)</b>	<b>Sıcaklıkla Kararlılık*</b>	<b>Referans</b>
Muz kabuğu	6.5 (Dopamin)	30 (Dopamin)	% 90 (30 dak. 60 °C) 80 °C inaktivasyon	[76]
Muz özü	6.5 (Dopamin)	30 (Dopamin)	% 80 (10 dak. 70 °C)	[77]
Çin lahanası	5 (Kateşol)	50 (Kateşol)	Kararsız > 50 °C	[78]
Lahana	7.6 (Phloroglucinol)	40 (Phloroglucinol)	% 40 (10 dak. 100 °C)	[79]
Malatya kayısı	8.5 (Kateşol)	40 (Kateşol)	% 50 (47 dak. 60 °C) % 50 (16 dak. 80 °C)	[80]
Üzüm	5 (Kateşol)	-	70 °C inaktivasyon	[81]
Amasya elması	7.0 (Kateşol) 8.6 (Pirogallol) 6.6 (L-Dopa)	15 (Kateşol) 50 (Pirogallol) 70 (L-Dopa)	-	[82]
Enginar	5-7 (Kateşol) 8 (L-Dopa) 6,5 (Pirogallol)	25 (Kateşol)	% 50 (6 dak. 60 °C) % 50 (4 dak. 70 °C)	[83]

\* Verilen sıcaklıkta kaybedilen % aktivite

### 1.6.2. Gıda kalitesi üzerine PPO' nun etkileri

PPO enzimi meyve ve sebzelerin taşınması veya işlenmesi esnasında meydana gelen zedelenmelerden dolayı veya bu ürünlerin kesilmiş, dilimlenmiş yüzeylerinin havaya maruz bırakılması ya da dondurulduktan sonra çözünmesi enzimatik kararmaya yol açar. PPO enzimi katalizli enzimatik kararma reaksiyonları, ürünün tat, görünüm ve besin değerini düşürdüğünden istenmemektedir. Bu nedenle meyve ve sebzelerdeki

PPO aktivitesinin düşürülmesi ve tamamen durdurulması için çeşitli çalışmalar yapılmıştır [84-87].

### 1.6.3. PPO' nun endüstriyel uygulamaları

Endüstride, ticari olarak kullanılan PPO'lardan lakkaz, *Trametes versicolor* ve beyaz-kırmızı funguslardan fermantasyon yolu ile elde edilir. Son zamanlarda gıda endüstrisine ve diğer endüstri dallarında PPO enziminin kullanımına yönelik büyük bütçeli çalışmalar yapıldı. Polisakkarit ve proteinlerin enzimatik çapraz bağlanması [88,89], antioksidanlar ve renklendirici bileşiklerin üretimi [90-93], içkilerin artırılması [94], biyosensörlerin üretimi [39,56-58], atık sulardan istenmeyen fenoliklerin uzaklaştırılması [94] bu çalışmalara örnek gösterilebilir.

### 1.7. Kayısı

Kayısı (*Prunus armeniaca L.*) Rosales takımının Rosaceae familyasının Prunoideae alt familyasının Prunus cinsine girer. Dünyada kayısının altı türü bulunmaktadır. Malatyada yetişen kayısı ağaçları *Prunus armeniaca*'ya aittir. Kayısı meyvesi; açık sarıdan turuncu rengine kadar geniş bir renk varyasyonuna (açık sarı, sarı, turuncu, koyu turuncu, kırmızı ve yeşil) sahiptir. Kayısı meyveleri oval, yuvarlak, eliptik, kalp ve oblang (sobü) şekilli olup 20-80 g civarındadır [95].



Şekil 1.5. Malatya kayısılarından görünüm

Türkiyenin en önemli kayısı üretim merkezi olan Malatya'da çok çeşitli kayısı türleri olmakla birlikte bu bölgede yetiştirilen kayısı türlerinin %73'nü Hacıhaliloğlu,

%17'sini Kabaası, geriye kalan kısmını ise Soğancı, Hasanbey, Çataloğlu ve Zerdali ağaçları oluşturmaktadır [95].

**Çizelge1.4.** 100 g taze kayısı için elde edilen içerik değerleri [22].

	<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
<b>Ana bileşenler</b>	Su (%)	84.33±1.56
	Enerji (kcal)	61.14±10.30
	Protein (g)	0.78±0.16
	Yağ (g)	0.38±0.14
	Karbonhidrat (g)	14.9±2.23
	Posa (g)	0.65±0.20
	Kül (g)	0.70±0.075
	Selüloz (g)	1.28±0.14
	Total asitlik	0.47±0.06
	<b>Mineraller</b>	Demir (mg)
Bakır (mg)		0.35±0.046
Çinko (mg)		0.31±0.08
Kalsiyum (mg)		12.5±3.0
Magnezyum (mg)		9.80±1.20
Potasyum (mg)		267±32
Sodyum (mg)		1.60±0.25
Fosfor (mg)		24±3.60
<b>Vitaminler</b>	B-Karoten (IU)	2600±110
	B1 Vitamini (mg)	0.03±0.002
	B2 Vitamini (mg)	0.04±0.003
	B3 Vitamini (mg)	0.58±0.16
	C Vitamini (mg)	8.40±3.30

Kayısı insan sağlığı bakımından önemli bir yere sahiptir. Kayısı diğer meyveler gibi günlük enerji ve protein gereksinimine çok az katkıda bulunur. Yapısının büyük bir kısmı sudan oluşur. Kayısının karakteristik aromasını; myrcene, limonin, terpinolin, trans-2-hexanal, linalul, kaproik asit, laktonlar ve benzil alkol gibi uçucu bileşikler

oluşturmaktadır. Meyveler olgunlaştıkça asit miktarı azalmakta, şeker miktarı artmaktadır. Kayısıda glukoz, fruktoz gibi kolayca metabolize edilen şekerlerle, pektinler başlıca karbonhidrat bileşikleridir. Meyvelerin protein içeriklerinin % 60 kadarı serbest aminoasit halindedir. Özellikle esansiyel aminoasitlerden lizin, lösin aminoasitleri bulunmaktadır [95-98].

Bunun yanında bol miktarda A, C, E vitamini ve fenolik maddeler bakımından oldukça zengindir. Önemli bir A vitamini ve beta karoten kaynağı olarak bilinmektedir. Kayısının ilk çağala (yeşil, olgunlaşmamış kayısı) dönemlerinde yüksek bir oranda bulunan C vitamini ise olgunlaşma ile azalmaktadır [98,99].

Kayısı meyvesi çok farklı miktarda fenolik bileşikler içerir. Bunlardan en yoğunluklu olarak hidrosinamik asitler (kafeik asit, ferulik asit, p-coumarik asit ve diğer esterler) bulunur. Kayısı meyvesinde klorogenik asit ise baskın olan türler arasındadır. Neoklorogenik asit, kateşin ve epikateşin de yoğun bir şekilde bulunan diğer fenolik bileşiklerdir. Kayısı meyvesinde bulunan flavanoller ise glikozitleri halinde bulunurlar. Bunlara örnek olarak kaempferol ve quercetin baskın olan türlerdendir [32,33]. Bazı kayısı çeşitlerinde ise aeskuletin, coumarin ve skopoletin de düşük miktarlarda da olsa olduğu belirlenmiştir [100].

Tokoferoller, askorbik asit, flavonoidler ve fenolik asitler kayısının en önemli doğal antioksidan gruplarıdır. Meyve antioksidanları dokuları stres ve çeşitli hastalıklara karşı korumaktadırlar [101].

Meyve ve sebzelerde genellikle çok az miktarda bulunan, fakat bunların işlenmesinde değişik sorunlara neden olabilen önemli maddeler grubundan birisi ikincil metabolitler olarak bilinen fenolik maddelerdir. Fenolik maddelerin bir kısmı bu ürünlerin lezzeti üzerine etkilidir. Diğer taraftan fenolik maddelerin bir kısmı renkli olduklarından, meyve ve sebzelerin renkleri üzerinede etkilidir. Birçok fenolik madde, fenoloksidaz enzimleriyle enzimatik renk esmerleşmelerine neden olan önemli bir madde grubudur. Bu yönde yapılan çalışmalar, meyve ve sebzelerle beslenmekle kalp hastalıkları, akciğer, bağırsak, mide kanserleri, diyabet ve yaşlanma ile oluşan hastalıkların önlenmesi arasında doğrusal bir ilişki olduğunu göstermektedir. Meyve ve sebze tüketimi kansere karşı korunmada oldukça etkin bulunmuştur. Sebze ve meyve tüketimi düşük olanlarda kanser riski, sebze ve meyve tüketimi iyi olanlara göre iki kat daha fazladır. Meyve tüketimi, özellikle akciğer, ösefagus, ağız boşluğu, pankreas, mide, kolon, rektum, mesane ve larinks kanserlerine karşı koruyucudur [99,101].

## **1.8. Jelatin**

Jelatin, kollajenin hidrolizi ile elde edilen bir proteindir ve karakteristik olarak yapısında yüksek oranda glisin, prolin ve hidroksiprolin amino asitleri içerir. Bu amino asitler jelatinin üçlü heliks bir yapı oluşturmasında ve jelleşme özelliği kazanmasında oldukça etkilidir [102].

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

Temel ve mekanik kararlılığının arttırılması amacıyla immobilizasyonda çoğunlukla çapraz bağlayıcı bir reaktif olan glutaraldehid ile birlikte kullanılır [103-105].

## **1.9. Glutaraldehid**

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

Biyosensör geliştirilmesinde kullanılan biyoaktif malzemelerin (enzim, hücre, doku, vb.), jelatin, kollajen, kitosan gibi biyolojik moleküllerle birlikte glutaraldehid ile çapraz bağlar oluşturması esasına dayalı immobilizasyon yöntemi oldukça yoğun bir şekilde kullanılmaktadır [106,107]. Yöntem kolay uygulanabilir olması yanında immobilize sistemin termal ve operasyonel aynı zamanda da depo kararlılığını arttırması bakımından tercih edilmektedir.

## 1.10. Amaç

Fenolik bileşikler, organik kirleticilerin büyük bir grubunu oluşturmaktadır. Bu bileşikler pek çok endüstriyel proseste kullanılmakta olup, aynı zamanda bir çok doğal organik bileşiğin yıkım ürünüdürler. Polifenollerin parçalanması sonucu oluşan fenolik bileşiklerin çok düşük konsantrasyon seviyelerinde belirlenmesi onların toksisitesinin verilmesi açısından çok önemlidir. Bu fenolik bileşiklerin çoğu bitki ve hayvanlar üzerinde zehirli etkilere sahip olup, kanserojen ve alerjen özellik gösteren maddelerdir ve akut çevresel problemlere yol açabilirler. Fenolik bileşiklerin bazılarının düşük konsantrasyon seviyelerinde bile, sulara toksisite oluşturarak insan ve suda yaşayan organizmalar için dikkate alınacak değerde bir kirlilik yarattığı belirlenmiştir. Bu nedenle bu kirliliklerin izlenmesi ve kontrolü çevrenin korunması için oldukça önemlidir. Dolayısıyla özellikle gıda analizleri, çevresel analizler, biyolojik ve medikal çalışmalar açısından bu maddelerin tayinine yönelik duyarlı metotların geliştirilmesi oldukça önemlidir.

Çağımızın en yaygın teknolojilerini incelediğimiz zaman, bazı evrensel gözlemlere varmak mümkündür. Genel olarak boyutları küçülen ve işlevselliği artan, üretimi ve kullanımı daha az enerji gerektiren ve kolaylıkla bol miktarda üretilen teknolojiler eskilerinin yerini almaktadır. Böyle bir yenilenme süreci içinde, daha duyarlı, tekrarlanabilirliği yüksek, ölçüm süresi kısa ve ucuz olmak üzere dört temel ögeye sahip sensörlerin geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

Bu amaçları gerçekleştirmek için pek çok reaksiyonda spesifik ve seçici özellikte olan enzimleri ve biyoorganik molekülleri kullanmak en olası çözümdür. Ancak bu bileşikler hem saflaştırılması zor hem de pahalı bileşiklerdir. Biyosensör türlerinden biri olan doku homojenatı temelli biyosensörler, enzim izolasyon ve saflaştırılması gerekliliği ortadan kalktığı ve enzimler doğal ortamlarında bulunduğu için artan kararlılık ve düşük maliyet gibi avantajlara sahiptirler.

Bu çalışma da Malatya yöresi için büyük ekonomik değere sahip ve polifenol oksidaz enziminin zengin bir kaynağı olan kayısının kullanıldığı doku temelli ve bazı polifenollerin tayinine yönelik biyosensör geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1. Materyal

Çalışmanın deneysel kısmında kullanılan araç-gereç ve kimyasallar aşağıda verilmiştir.

#### **Araç- Gereçler:**

- YSI model 58 Dijital Oksijenmetre ( A.B.D. )
- YSI 5700 Serisinden Çözünmüş Oksijen Probları ( A.B.D. )
- Medisis Ayarlanabilir Otomatik Pipetleri ( Türkiye )
- Clifton Linear Shaker Bath, Su Banyosu ( İngiltere )
- Grant LTD-6G, Su Sirkülatörü ( İngiltere )
- IKA-WERKE T-25, Homojenizatör ( Almanya )
- Chiltern HS 31, Magnetik Karıştırıcı ( A.B.D. )
- NuAire, Derin Dondurucu ( A.B.D. )
- Arçelik Buzdolabı (Türkiye)
- KNF Neuberger Air Pumps, Pompa ( A.B.D. )

#### **Kimyasallar:**

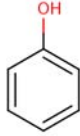
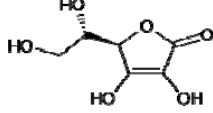
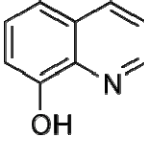
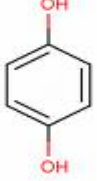
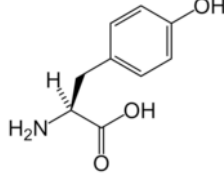
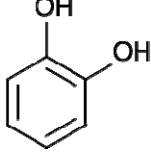
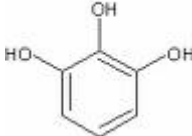
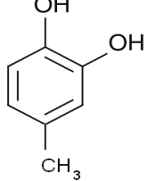
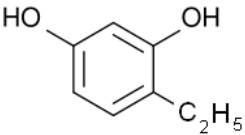
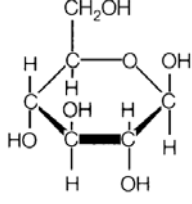
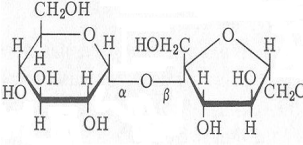
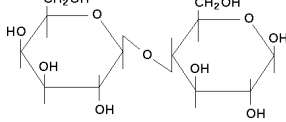
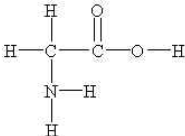
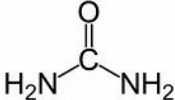
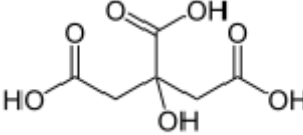
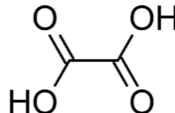
- Sodyum-fosfat tamponları ( pH: 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 ve 50 mM )
- Sodyum-fosfat tamponları ( 25 mM, 50 mM, 100 mM ve pH: 8,5 )



- Tris-HCl tamponları ( pH: 8,5; 9,0 ve 50 mM )
- Glisin-NaOH tamponları ( pH: 9,5; 10,0 ve 50 mM )
- Sodyum borat-NaOH tamponu ( pH:8,5 ve 50 mM )
- Potasyum-fosfat tamponu ( pH:8,5 ve 50 mM )
- Glutaraldehyd ( % 1,25; % 2,5 ve % 5 )
- Jelatin
- % 0,5' lik Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)
- Standart fenol çözeltileri ( 0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 5 mM; 10 mM; 15 mM; 20 mM; 25mM ve 30 mM )
- Standart kateşol çözeltileri ( 0,05 mM; 0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 5 mM; 10 mM; 15 mM; 20 mM; 25mM )
- Standart pirogallol çözeltileri ( 0,05 mM; 0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 5 mM; 10 mM; 15 mM; 20 mM; 25mM )
- Standart L-askorbik asit çözeltileri ( 0,05 mM; 0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 5 mM; 10 mM; 15 mM; 20 mM; 25mM )
- Standart 4-metilkateşol çözeltileri ( 0,05 mM; 0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 5 mM; 10 mM; 15 mM; 20 mM; 25mM )
- Standart L-tirozin çözeltileri ( 0,05 mM; 0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 5 mM; 10 mM; 15 mM; 20 mM; 25mM )

- Standart 4-etilrezorsin çözeltileri ( 0,05 mM; 0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 5 mM; 10 mM; 15 mM; 20 mM; 25mM )
- Standart hidrokinon çözeltileri ( 0,05 mM; 0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 5 mM; 10 mM; 15 mM; 20 mM; 25mM )
- Standart 8-hidroksikinolin çözeltileri ( 0,05 mM; 0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 5 mM; 10 mM; 15 mM; 20 mM; 25mM )
- Substrat olarak kullanılan diğler çözeltiler: Glisin, Glukoz, Sükroz, Laktoz, Okzalik Asit, Sitrik Asit ve Üre ( 5 mM konsantrasyonda pH: 8,5; 50 mM sodyum-fosfat tamponunda hazırlandı ).

**Çizelge 2.1.** Kullanılan substratlar ve yapıları

Substratın Adı	Substratın Yapısı	Substratın Adı	Substratın Yapısı
Fenol		L-Askorbik Asit	
8-hidroksikinolin		Hidrokinon	
L-Tirozin		Kateşol	
Pirogallol		4-Metil Kateşol	
4-Etil rezorsin		Glukoz	
Sükroz		Laktöz	
Glisin		Üre	
Sitrik asit		Okzalik asit	

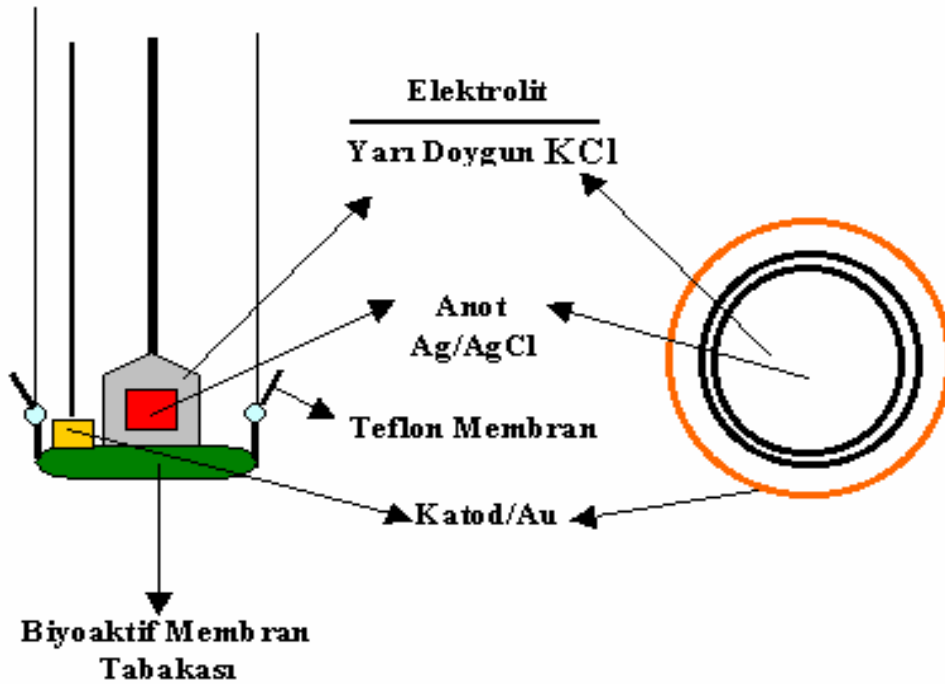
## 2.2. Metod

### 2.2.1. Kayısı numunesinin toplanması ve saklanması

Doku temelli biyosensör geliştirilmesi amacıyla kullanılacak olan kayısılar, Malatya Meyvecilik Araştırma Enstitüsü koleksiyon bahçesinde bulunan Hacıhaliloğlu çeşidine ait tek bir ağaçtan olgun meyve döneminde alınmıştır. Daha sonra biyosensör hazırlanmasında kullanılacak olan bu kayısılar  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

### 2.2.2. Çözünmüş oksijen probunun çalışma ilkesi

Amperometrik temele dayalı çözünmüş oksijen probları, Au (katod), AgCl (anod), yarı doymun KCl (elektrolit) ve oksijene duyarlı teflon bir membrandan oluşmuştur [108].

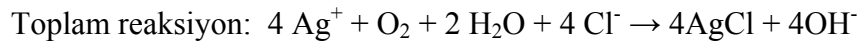
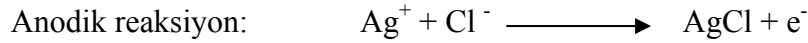
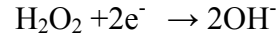
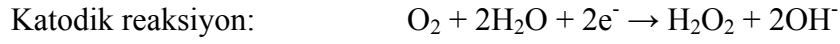


Şekil 2.1. YSI Model 58 çözünmüş oksijen probunun şeması.

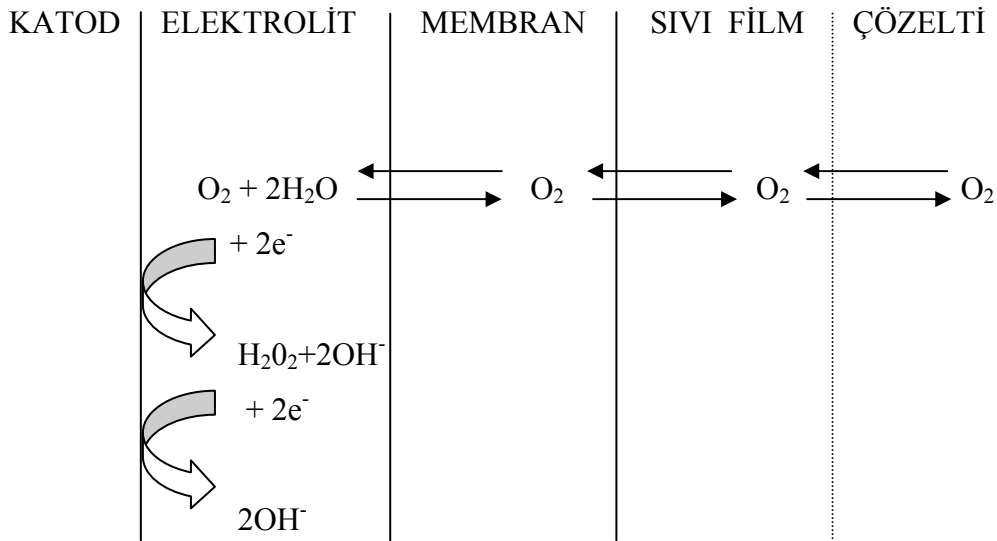
Membran, gaz geçirgenliğinin yanı sıra sensörün dış çevreden korunmasına da olanak sağlar. Bu koruma sayesinde reaksiyon ortamında olabilecek bir takım

safsızlıklardan kaynaklanması muhtemel girişim etkileri de minimize edilmiş olmaktadır [109]. İletici sistem olarak bir amperometrik sensörün kullanılması durumunda potansiyometrik sensörlerden en büyük fark ürünlerden sinyal oluşturan türün elektrot yüzeyinde tüketilmesidir [9].

Polarografik esaslı olarak gerçekleşen toplam elektrot reaksiyonlarını aşağıdaki gibi özetlemek mümkündür.

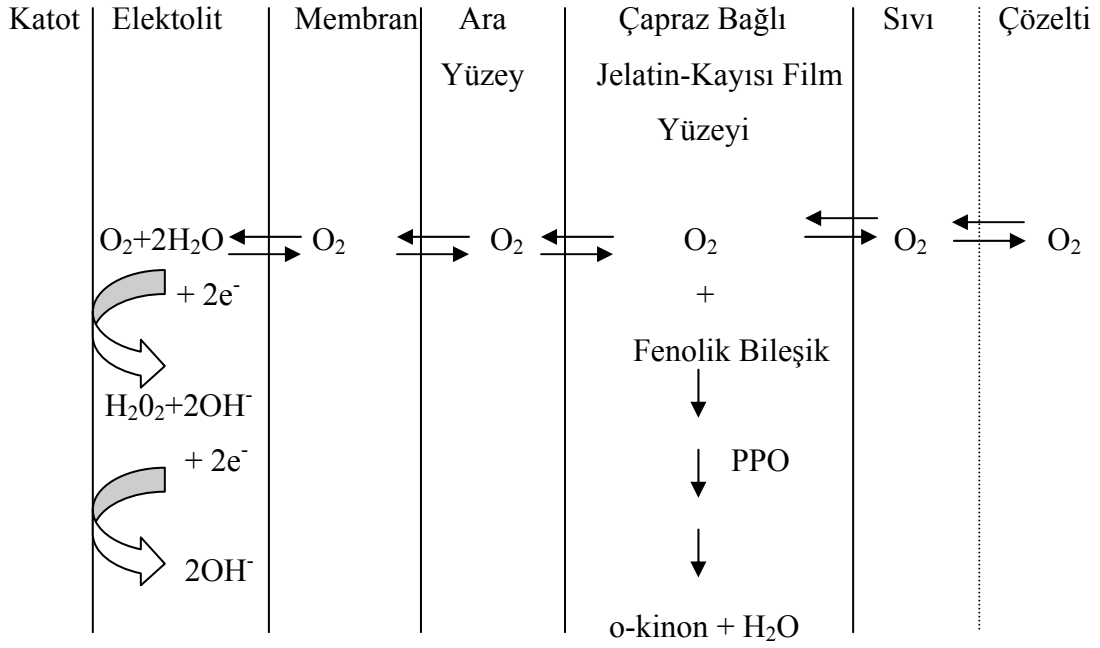


Şekil 2.2’de oksijenin reaksiyon ortamından katoda geçişi sırasındaki difüzyon basamakları verilmiştir.



**Şekil 2.2.** Oksijenin reaksiyon ortamından katoda ulaşana kadar karşılaştığı difüzyon engellerinin şematik gösterimi [52].

### 2.2.3. Fenol tayinine yönelik çözülmüş oksijen probu temelli doku biyosensörünün çalışma ilkesi



Şekil 2.3. Doku temelli biyosensörün kuramsal modeli.

### 2.3. Fenol Tayinine Yönelik Kayısı Dokusu Temelli Biyosensörün Hazırlanması

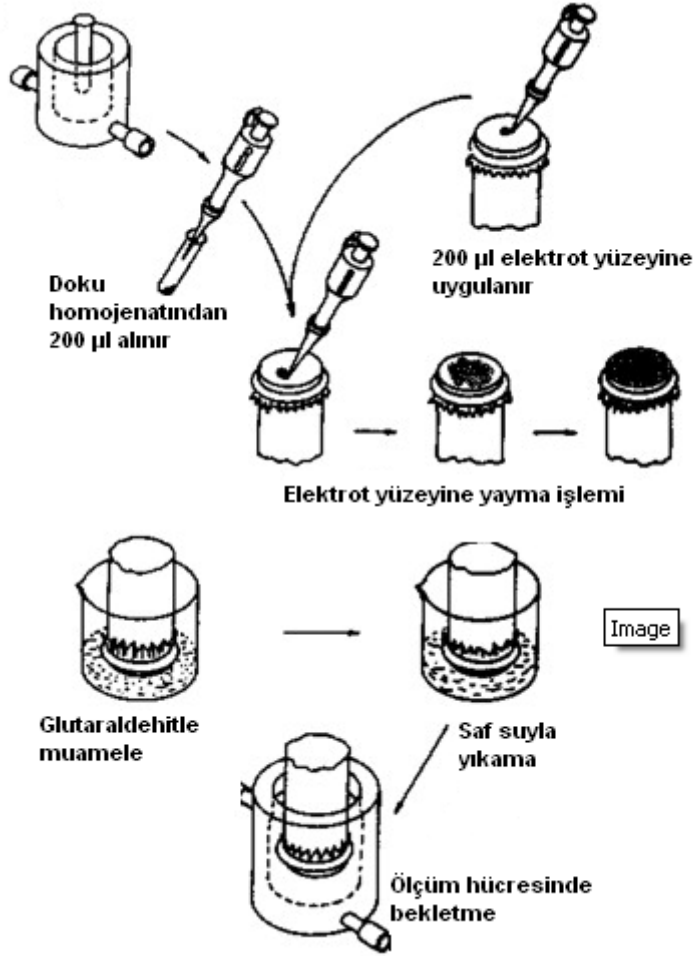
Biyosensörün hazırlanmasında Çizelge 2.2' deki yöntem izlenmiştir.

**Çizelge 2.2.** Kayısı dokusu temelli biyosensörün hazırlanma basamakları.

İşlem sırası	İşlem
1	Bir deney tüpü içerisine 1 g kayısı dokusu tartılır, üzerine 1,5 ml pH:7,5; 50 mM fosfat tamponu eklenir ve buz banyosu içerisinde homojenize edilir.
2	15 mg jelatin, kayısı homojenatının 400 µl'si içerisinde 38 °C'de ki su banyosunda 15 dakika bekletilerek çözünür hale getirilir.
3	Çözünmüş oksijen probu membran yüzeyi % 0,5'lik SDS ile (pH: 7,5; 50 mM fosfat tamponu içinde) muamele edilir.
4	Jelatin–kayısı homojenat karışımının 200 µl'si çözünmüş oksijen probu membran yüzeyine yayılır.
5	Buzdolabında +4 °C' de 20 dakika süreyle beklemeye bırakılır.
6	Bekleme süresinin sonunda % 2,5'lik glutaraldehid ile (pH: 8,5; 50 mM fosfat tamponu içinde) 5 dakika boyunca muamele edilir.
7	Glutaraldehid muamelesi sonrası biyosensör saf su ile pek çok kez yıkanır, daha sonra çalışma sıcaklığı ve tamponunda bekletilir.

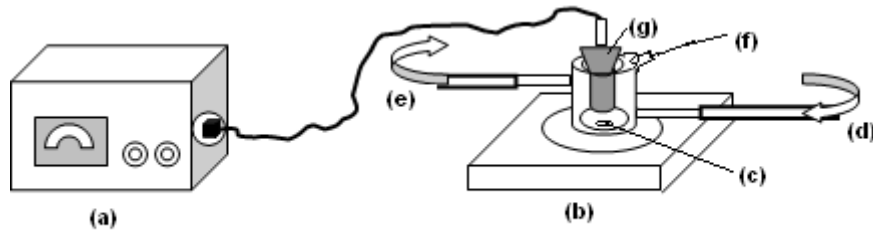
Yukarıdaki izlenen yol gereği hazırlanan kayısı dokusu temelli biyosensör ile fenol tayinine yönelik olarak yapılan ölçümler sonrası biyosensör bir sonraki ölçümlere kadar içerisinde biyoaktif tabakanın kurumasını önleyecek kadar fosfat tamponu (pH: 8,5; 50 mM) bulunan kabına konularak +4 °C'de buzdolabında saklanır.

Aşağıda verilen Şekil 2.4’de biyosensörün hazırlanma basamakları şematize edilmiştir.



Şekil 2.4. Biyosensörün hazırlanma basamakları

### 2.3.1. Doku temelli biyosensörler ile fenol tayini için ölçüm düzeneği



Şekil 2.5. Doku temelli biyosensörler ile fenol tayini için ölçüm düzeneği. (a) YSI 58 Model oksijenmetre, (b) Manyetik karıştırıcı, (c) Manyetik bar, (d) Su girişi, (e) Su çıkışı, (f) Enjeksiyon vanası, (g) Biyosensör.



Biyosensör ölçümler öncesi, reaksiyon hücresi içerisinde çalışma sıcaklığındaki çalışma tamponunda 10 dakika bekletilerek polarize edilir.

Biyosensör ile sabit bir oksijen konsantrasyonuna ulaşıldıktan sonra fenol reaksiyon hücresine enjekte edilir. Enjekte edilen fenol konsantrasyonuna bağlı olarak gerçekleşen reaksiyon sonucu oksijen konsantrasyonunda düşme gözlenir.

Ölçüm tamamlandığında doku temelli biyosensör saf su ile yıkanır. Eğer ölçümlere devam edilecekse diğer ölçüme kadar çalışma sıcaklığındaki çalışma tamponunda bekletilir. Daha sonra kullanılacaksa +4<sup>0</sup>C’de saklanır.

#### **2.4. Fenol Tayinine Yönelik Kayısı Homojenat Temelli Biyosensörlerde Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyonu**

Çalışmanın bu bölümünde; kayısı dokusu temelli biyosensörün biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonu hedeflendi. Bu amaç doğrultusunda; biyoaktif tabakada değişik oranlarda kayısı homojenatı, jelatin ve glutaraldehit içeren karışımlar kullanılarak hazırlanan biyosensörlerle ölçümler yapılarak bunların biyosensör cevabı üzerine etkileri belirlendi.

##### **2.4.1. Kayısı miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

Yapısında PPO enzimini barındıran kayısının kullanılması ile hazırlanan fenol tayinine yönelik doku biyosensörlerinde, kayısı homojenat miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla, jelatin miktarı 15 mg (6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup>) ve glutaraldehit yüzdesi (% 2,5) sabit tutulup farklı miktarlarda kayısı içeren homojenatlar kullanılmasıyla biyosensörler hazırlandı.

Yapılan çalışmada, homojenize edilecek kayısı miktarı sabit tutulup, sodyum-fosfat tampon (pH: 8,5; 50 mM) miktarları değiştirilerek farklı PPO içerikli homojenatlar elde edilmiş ve bu homojenatlar kullanılarak biyosensörler hazırlanmıştır. Tampon hacmindeki değişim ml’deki kayısı miktarını da farklandırmıştır.

Denemeler, 37<sup>0</sup>C’deki sodyum-fosfat tamponunda (pH: 8,5; 50mM) gerçekleştirildi. Farklı oranlarda kayısı içeren homojenatlar kullanılmasıyla hazırlanan biyosensörler ile yapılan ölçümlerden elde edilen standart grafiklerden yararlanarak kayısı miktarının biyosensör cevabı üzerine etkileri incelendi.

Geliştirilen doku biyosensörlerine ilişkin olarak kullanılan kayısı, jelatin ve glutaraldehit oranları aşağıda verilmiştir;

1) 1 g kayısı 1 ml sodyum-fosfat tamponunda (pH: 7,5; 50 mM) homojenize edilerek;

**400 µl homojenat (0,177 g kayısı/cm<sup>2</sup>) + 15 mg jelatin + % 2,5 glutaraldehid**

2) 1 g kayısı 1,5 ml sodyum-fosfat tamponunda (pH: 7,5; 50 mM) homojenize edilerek;

**400 µl homojenat (0,118 g kayısı/cm<sup>2</sup>) + 15 mg jelatin + % 2,5 glutaraldehid**

3) 1 g kayısı 2 ml sodyum-fosfat tamponunda (pH: 7,5; 50 mM) homojenize edilerek;

**400 µl homojenat (0,088 g kayısı/cm<sup>2</sup>) + 15 mg jelatin + % 2,5 glutaraldehid**

#### 2.4.2. Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi

Fenol tayinine yönelik olarak geliştirilen kayısı dokusu temelli biyosensörlerde jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi çalışmasında kayısı miktarının yanı sıra yine biyoaktif tabakanın bileşenlerinden olan glutaraldehid miktarı sabit tutulup, bununla birlikte değişen jelatin miktarlarında biyosensörler hazırlanarak ölçümler gerçekleştirildi.

Hazırlanan biyosensörlere ilişkin olarak kullanılan kayısı, jelatin ve glutaraldehid oranları aşağıda verilmiştir;

1) 400 µl homojenat (0,118 g kayısı/cm<sup>2</sup>) + **3,32 mg jelatin/cm<sup>2</sup>** + % 2,5 glutaraldehid

2) 400 µl homojenat (0,118 g kayısı/cm<sup>2</sup>) + **6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup>** + % 2,5 glutaraldehid

3) 400 µl homojenat (0,118 g kayısı/cm<sup>2</sup>) + **13,27 mg jelatin/cm<sup>2</sup>** + % 2,5 glutaraldehid

Hazırlanan biyosensör ile yapılan ölçümlerden elde edilen standart grafiklerden yararlanılarak jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkileri incelendi. Ölçümler sodyum-fosfat tamponunda (pH: 8,5; 50 mM) ve t: 37 °C'de gerçekleştirildi.

### **2.4.3. Glutaraldehid miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

Bu çalışmada biyoaktif malzemenin immobilizasyonunda çapraz bağlayıcı reaktif olarak glutaraldehid kullanıldı. Glutaraldehid miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisini belirlemek amacıyla; biyoaktif tabakanın bileşenleri olan kayısı miktarı ve jelatin miktarları sabit tutularak değişen oranlarda glutaraldehidin kullanıldığı biyosensörler hazırlandı.

Farklı oranlarda glutaraldehit kullanılmasıyla hazırlanan biyosensörler ile yapılan ölçümlerden elde edilen standart grafiklerden yararlanarak immobilizasyonda çapraz bağlayıcı reaktif olarak kullanılan glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkileri incelendi. Ölçümler sodyum-fosfat tamponunda (pH: 8,5; 50 mM) ve t: 37 °C'de gerçekleştirildi.

Biyosensörlere ilişkin olarak kullanılan kayısı, jelatin ve glutaraldehit oranları aşağıda verilmiştir;

- 1) 400 µl homojenat (0,118 g kayısı/cm<sup>2</sup>) + 6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + **%1,25 glutaraldehid**
- 2) 400 µl homojenat (0,118 g kayısı/cm<sup>2</sup>) + 6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + **%2,5 glutaraldehid**
- 3) 400 µl homojenat (0,118 g kayısı/cm<sup>2</sup>) + 6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + **%5 glutaraldehid**

## **2.5. Kayısı Dokusu Temelli Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonu**

### **2.5.1. Optimum pH değerinin belirlenmesi**

Biyoaktif tabaka bileşenleri optimize edilen biyosensörün optimum pH'sının belirlenmesi amacıyla; pH: 6 - 6,5 - 7 - 7,5 - 8 - 8,5 sodyum fosfat tamponu, pH: 9 tris-HCl tamponu ve pH: 9,5 - 10 glisin-NaOH tamponu kullanıldı. Ölçümler t: 37 °C de 5 mM'lık fenol konsantrasyonu için gerçekleştirildi.

Alınan en yüksek biyosensör cevabı %100 kabul edilerek diğer biyosensör cevapları bununla kıyaslandı.

### **2.5.2. Uygun tampon sisteminin belirlenmesi**

Biyosensörün optimum pH değerinin belirlenmesinin ardından biyosensör için optimum pH değerindeki farklı tampon sistemleri (sodyum-fosfat, potasyum-fosfat, tris-HCl ve sodyum borat-NaOH) kullanılarak biyosensör için en uygun tampon sistemi belirlendi. Ölçümler t: 37 °C'de 5 mM'lık fenol konsantrasyonu için gerçekleştirildi.

### **2.5.3. Uygun tampon konsantrasyonunun belirlenmesi**

Geliştirilen biyosensörün optimum pH ve bu pH değerindeki en uygun tampon sisteminin belirlenmesi sonrası tampon konsantrasyonlarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla, hazırlanan biyosensör için farklı konsantrasyonlarda ki tamponlarda ( 25 mM, 50 mM, 100 mM ) ölçümler gerçekleştirildi. Ölçümler t: 37°C'de 5 mM'lık fenol konsantrasyonu için gerçekleştirildi.

### **2.5.4. Optimum sıcaklığın belirlenmesi**

Kayısı dokusu temelli biyosensör cevabı üzerine sıcaklığın etkisinin belirlendiği bu çalışmada 20, 25, 30, 35, 37, 40, 45 °C'lerde ölçümler gerçekleştirildi. Ölçümler 5 mM'lık fenol konsantrasyonu ve sodyum-fosfat çalışma tamponunda (pH: 8,5; 50 mM) gerçekleştirildi.

Elde edilen en yüksek biyosensör cevabı %100 kabul edilerek diğer biyosensör cevapları bununla kıyaslandı.

## **2.6. Kayısı Dokusu Temelli Biyosensörün Karakterizasyonu**

### **2.6.1. Fenol için doğrusal tayin aralığı**

Kayısı dokusu temelli biyosensörün optimum pH ve optimum sıcaklık gibi çalışma koşulları ve biyoaktif malzemelerin bileşenleri olan kayısı miktarı, jelatin ve glutaraldehid yüzdesinin optimizasyonu sonrası fenol'e ilişkin doğrusal tayin aralığının belirlenmesi amacıyla ölçümler gerçekleştirilerek standart grafik elde edildi. Ölçümler sodyum fosfat tamponunda ( pH: 8,5; 50 mM ), t: 37 °C de gerçekleştirildi.

### **2.6.2. Termal kararlılığın Belirlenmesi**

Termal kararlılığının belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan biyosensörler farklı sıcaklıklarda (37, 40 ve 45 °C) çalışma tamponu içerisinde (sodyum-fosfat tamponu; pH: 8,5; 50 mM) 1 saat bekletildi ve çalışma sıcaklığında 5 mM'lık fenol standardı için ölçümler alındı.

Ölçümler sonunda başlangıçta elde edilen biyosensör cevapları % 100 kabul edilerek, saatte bir yapılan ölçümlerde elde edilen biyosensör cevapları ile kıyaslandı.

### **2.6.3. Operasyonel kararlılığın belirlenmesi**

Geliştirilen biyosensörün operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan biyosensör daha önce optimizasyonu yapılarak belirlenmiş olan çalışma sıcaklığında ve çalışma tamponu içinde bekletilerek her yarım saatte bir 5 mM'lık fenol standardı için ölçümler gerçekleştirildi.

Başlangıçta elde edilen biyosensör cevapları % 100 kabul edilerek her yarım saatte bir yapılan ölçümlerde elde edilen biyosensör cevapları ile kıyaslandı.

### **2.6.4. Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi**

Bu çalışmada sodyum-fosfat tamponu (pH: 8,5; 50 mM) kullanılarak, kayısı dokusu temelli biyosensör ile 5 mM'lık fenol konsantrasyonu için n = 9 ölçüm yapıldı. Elde edilen verilerden yararlanılarak biyosensöre ilişkin ortalama değer ( $\bar{X}$ ), Standart sapma (S.S) ve % varyasyon katsayısı (V.K) hesaplandı.

### **2.6.5. Substrat spesifikliği ve girişim etkilerinin belirlenmesi**

Biyosensörün substrat spesifikliğinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda derişimi 5 mM olan glisin, glukoz, sükröz, laktoz, okzalik asit, sitrik asit ve üre standart çözeltileri kullanıldı.

Biyosensörün girişim etkilerine bakılırken ise buldukları çözeltideki derişimleri 5 mM olan glisin + fenol, glukoz+ fenol, sükröz + fenol, laktoz + fenol, okzalik asit + fenol, sitrik asit + fenol ve üre + fenol çiftlerini içeren standart çözeltileri kullanıldı.

Fenol için elde edilen biyosensör cevapları % 100 kabul edildi ve diğer substratlar ve substrat çiftleri için elde edilen biyosensör cevapları ile kıyaslandı.

### **2.6.6. Depo kararlılığının belirlenmesi**

Biyosensörün depo kararlılığının belirlenmesine yönelik çalışmada yeni hazırlanan biyosensör ile hazırlandığı anda ve periyodik olarak belirli zaman aralıklarında 5 mM'lık fenol standardı için ölçümler gerçekleştirildi. (sodyum-fosfat tamponu; pH: 8,5; 50 mM ve t: 37 °C).

Ölçümler sonunda başlangıçta elde edilen biyosensör cevabı % 100 kabul edilerek belirli zaman dilimlerinde elde edilen biyosensör cevapları ile kıyaslandı.

### **2.7. Kayısı Doku Temelli Biyosensör İle Bazı Fenolik Bileşiklere ve Polifenollere Yönelik Ölçümler**

Biyosensörün farklı fenolik bileşiklere ve L-askorbik aside verdiği cevabın belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda her bir substrat için belirli derişimlerde hazırlanan standartları ile ölçümler gerçekleştirildi. Bu amaç doğrultusunda derişimleri 0,05 mM – 25 mM arasında değişen kateşol, pirogallol, L-askorbik asit, 4-metilkateşol, L-tirozin, 4-etilrezorsin, hidrokinon ve 8-hidroksikinolin kullanılmıştır. Standartlar çalışma tamponunda hazırlanmış (sodyum-fosfat tamponu; pH: 8,5; 50 mM) ve ölçümler çalışma sıcaklığında (t: 37 °C) alınmıştır.

### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

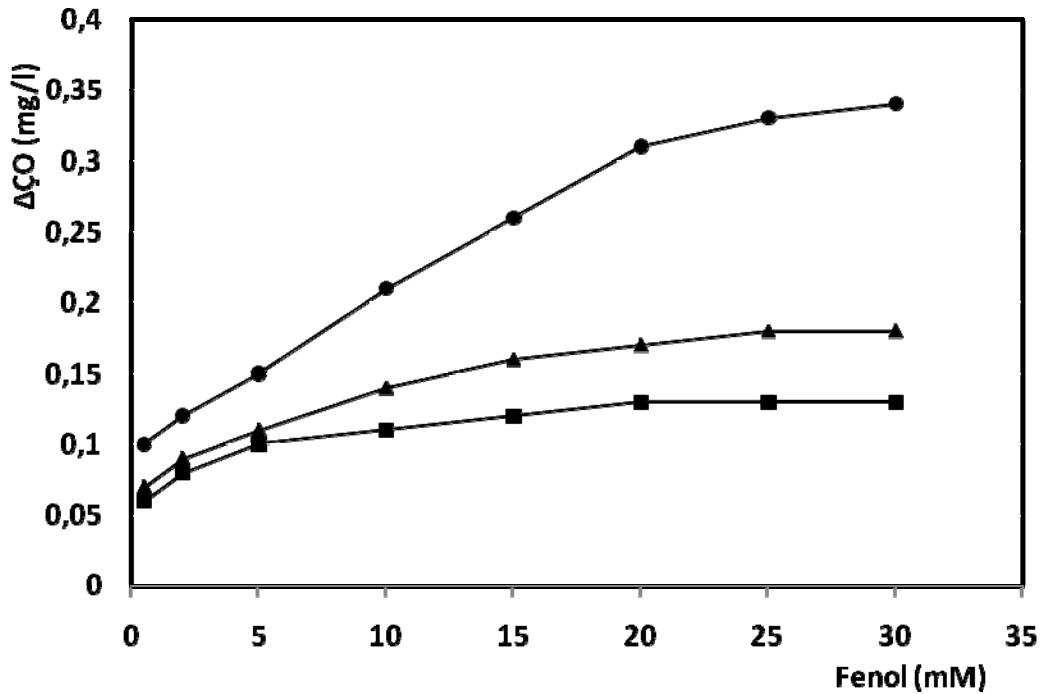
#### 3.1. Kayısı Dokusu Temelli Biyosensörlerde Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyonuna İlişkin Bulgular

Bu bölümde kayısı dokusu kullanılarak hazırlanan biyosensörlerde kayısı miktarı, jelatin ve glutaraldehid oranlarının biyosensör cevabına etkilerinin incelendiği, biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonuna ilişkin sonuçlar verilmiştir.

##### 3.1.1. Kayısı miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Kayısı dokusu temelli biyosensör cevabı üzerine, biyoaktif tabaka bileşenlerinden olan kayısı miktarının etkisinin belirlenmesine yönelik çalışmalara geçildi. Bu amaç doğrultusunda biyosensörün biyoaktif tabakasında ki kayısı miktarı 0,177; 0,118 ve 0,088 g/cm<sup>2</sup> olacak şekilde biyosensörler hazırlandı.

Hazırlanan biyosensörlerle yapılan deneyler sonrası elde edilen grafler Şekil 3.1'de gösterildi.



Şekil 3.1. Kayısı miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi. [Sodyum-fosfat tamponu; pH: 8,5; 50 mM , t: 37<sup>0</sup>C. ■ : 0,177 g/cm<sup>2</sup> ● : 0,118 g/cm<sup>2</sup>, ▲ : 0,088 g/cm<sup>2</sup>, Tüm biyosensörler için jelatin oranı 6,64 mg jelatin/ cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 2,5'dur].

Şekilden de görüldüğü gibi biyoaktif tabakadaki kayısı miktarı  $0,118 \text{ g/cm}^2$  olduğunda  $0,5 \text{ mM} - 20 \text{ mM}$  fenol konsantrasyonu aralığında doğrusal sonuçlar elde edilmiştir.

Biyoaktif tabakadaki kayısı miktarı  $0,088 \text{ g/cm}^2$  olduğunda kayısı miktarındaki azalışla orantılı olacak şekilde biyosensör cevabı elde edilmesine rağmen  $2 \text{ mM} - 15 \text{ mM}$  konsantrasyon aralığında doğrusal sonuçlar elde edilmiştir.

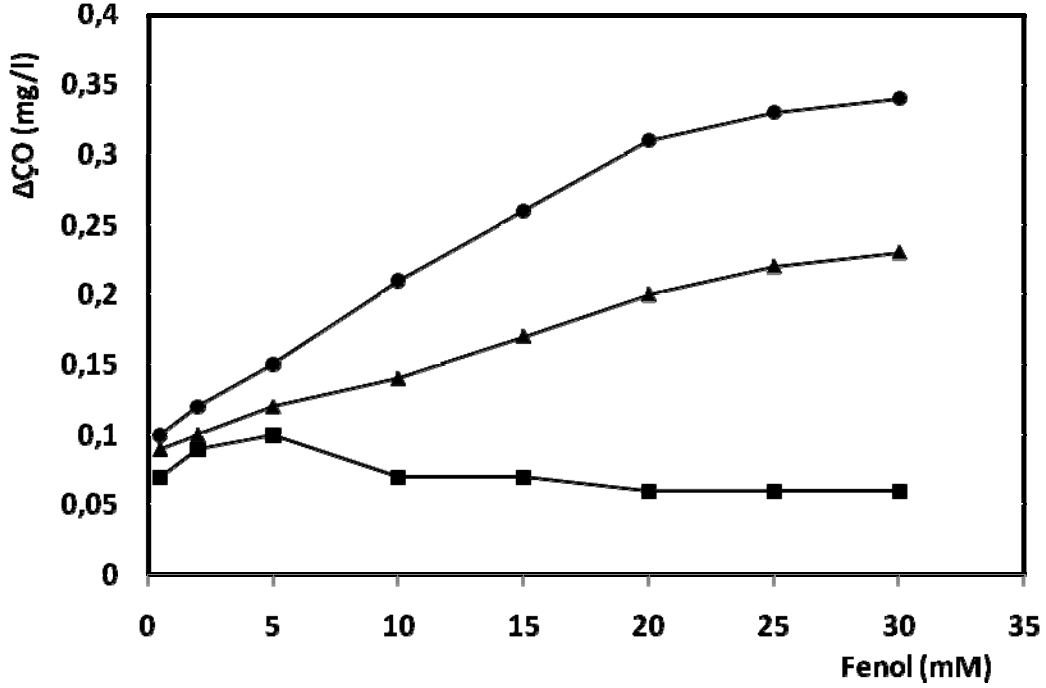
Kayısı miktarı  $0,177 \text{ g/cm}^2$  oranına çıkıldığında hazırlanan biyosensörlerle yapılan ölçümlerde kayısı miktarının çok artması biyoaktif membran tabakasının kalınlaşmasına ve substratın difzyonunda önemli problemlere yol açmasından dolayı biyosensör cevabında düşme gözlenmiştir. Bu nedenle biyoaktif tabakadaki kayısı miktarındaki artışın biyosensör cevabında düşüşe neden olduğu düşünülebilir.

Tüm bu sonuçlar sonrası kayısı miktarı olarak  $0,118 \text{ g/cm}^2$  olacak şekilde hazırlanan biyosensör ile alınan cevapların en uygun biyosensör cevabı olduğuna karar verildi.

### **3.1.2. Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi**

Kayısı dokusu temelli biyosensör cevabı üzerine jelatin miktarının etkisinin belirlenmesi amacı ile biyoaktif tabakadaki kayısı miktarı  $0,118 \text{ g/cm}^2$  ve %2,5'luk glutaraldehid oranları sabit tutulup, biyoaktif tabakada 3,32; 6,64 ve 13,27 mg jelatin/cm<sup>2</sup> olacak şekilde değişen oranlarda kullanılan jelatin miktarı ile elde edilen biyosensör cevabı Şekil 3.2'de verilmiştir.





**Şekil 3.2.** Kayısı dokusu temelli biyosensör cevabı üzerine jelatin miktarının etkisi. [Sodyum-fosfat tamponu; pH: 8,5; 50 mM, t: 37 °C ■ : 3,32 mg jelatin/cm<sup>2</sup>, ● : 6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ▲ : 13,27 mg jelatin/cm<sup>2</sup>. Tüm biyosensörler için kayısı miktarı 0,118 g/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 2,5'dur].

Biyoaktif tabakasında 3,32 mg jelatin/cm<sup>2</sup> jelatin içeren doku biyosensörünün hazırlanmasında kullanılan jelatin çözeltisinin vizkozitesinin oldukça düşük olması, çözülmüş oksijen probu yüzeyine yayma aşamasında uygulama zorluklarına neden oldu. Ayrıca bu elektrotlar ile yapılan ölçümler esnasında biyoaktif tabakada deformasyonlar (yumuşama ve şişme) gözlemlendi.

Grafikte görüldüğü gibi 3,32 mg jelatin/cm<sup>2</sup> jelatin oranı ile hazırlanan biyosensör ile alınan cevapların düşük bulunması; daha gözenekli bir biyoaktif tabakadan oksijen difüzyonunun, enzim tarafından tüketilen oksijen miktarının ara yüzeyde belirgin bir  $\Delta\text{CO}$  farkı oluşturmasına imkan vermeyecek düzeyde yüksek olması ile açıklanabilir.

Buna karşılık biyoaktif tabakadaki jelatin miktarı 6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup> olacak şekilde hazırlanan biyosensör ile hem en yüksek biyosensör cevapları hem de elde edilen biyosensör cevabı açısından fenol için en uygun doğrusal tayin aralığı elde edildi. Şekilden de görüldüğü gibi 6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup>'lik jelatin kullanılarak hazırlanan biyosensörle 0,5 mM – 20 mM fenol konsantrasyonu aralığında doğrusal bir

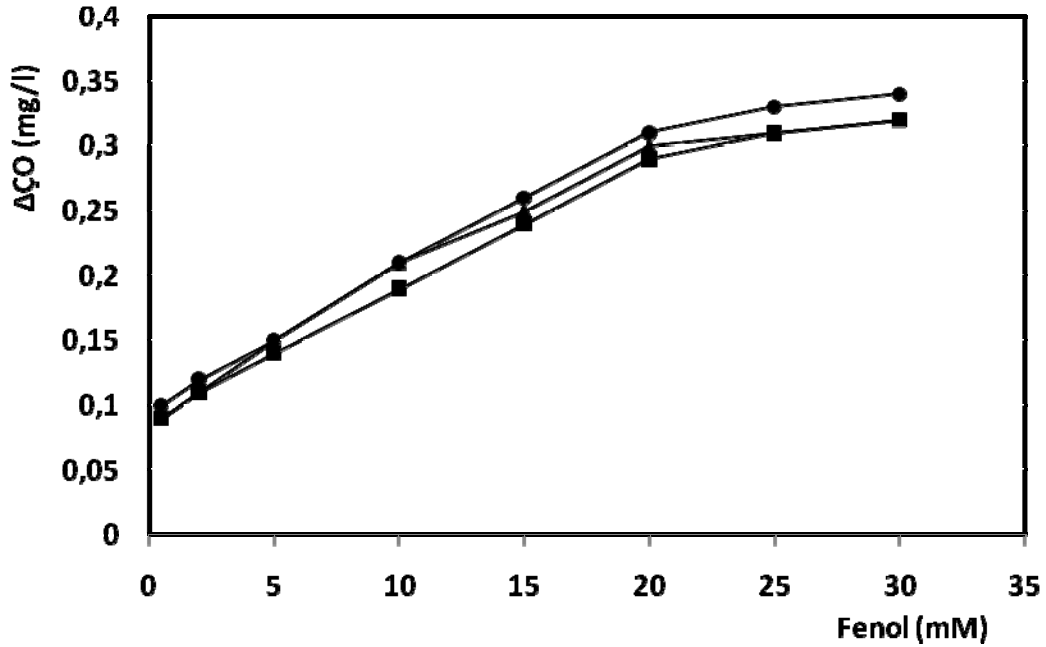
tain aralığı elde edildi. Bu nedenle 6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup>'lik jelatin miktarının optimum değer olduğuna karar verildi.

Diğer taraftan 13,27 mg jelatin/cm<sup>2</sup> jelatin oranı ile hazırlanan biyosensör ile alınan cevaplar 6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup> jelatin oranı ile hazırlanan biyosensörle alınan cevaplara göre daha düşük, 3,32 mg jelatin/cm<sup>2</sup> jelatin oranı ile hazırlanan biyosensörle alınan cevaplara göre daha yüksektir.

### 3.1.3. Glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonuna yönelik olarak gerçekleştirilen bu çalışmada, çapraz bağlayıcı reaktif olan glutaraldehitin biyosensör cevabı üzerine etkisini belirlemek üzere biyoaktif tabakada 0,118 g/cm<sup>2</sup> kayısı ve 6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup> içerecek şekilde doku biyosensörleri hazırlandı. Hazırlanan biyosensörler % 1,25; % 2,5 ve % 5 oranında glutaraldehid ile muamele edildi.

Biyosensörler ile yapılan denemeler sonrası elde edilen sonuçlara ilişkin grafikler Şekil 3.3'de verilmiştir.



Şekil 3.3. Glutaraldehid miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi. [Sodyum-fosfat tamponu; pH: 8,5; 50 mM, t: 37 °C ■: % 1,25 glutaraldehid, ●: % 2,5 glutaraldehid, ▲: % 5 glutaraldehid . Tüm biyosensörler için kayısı miktarı 0,118 g/cm<sup>2</sup> ve jelatin miktarı 6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup> dir].

Şekilden de görüldüğü gibi en iyi ve doğrusal biyosensör cevabı % 2,5'lik glutaraldehid oranı kullanılarak hazırlanan biyosensör ile alındı.

% 1,25'lik glutaraldehid konsantrasyonunda çapraz bağ oranının %2,5'lük glutaraldehid konsantrasyonuna nazaran biraz düşük olması biyoaktif tabakanın daha geniş gözenekli bir yapıda olmasına neden olur. Bu durum oksijenin dış ortam-ara yüzey veya ara yüzey-dış ortam arasındaki difüzyonunu kolaylaştırır; bununla birlikte substrat kaçışı da söz konusudur. Sonuç olarak biyoaktif tabakada tüketilen oksijenin ara yüzeyde sebep olacağı konsantrasyon azalması, dış ortamdan hızlı bir difüzyonla bir ölçüde engellenir ve doğal olarak substrat konsantrasyonuna bağlı olarak izlenen çözünmüş oksijen konsantrasyonu değişimleri dolayısıyla biyosensör cevapları düşük gözlenir.

% 5'lik glutaraldehid oranı kullanıldığında elde edilen biyosensör cevapları bazı fenol derişimleri için % 1,25'lik glutaraldehid konsantrasyonunda ki biyosensör cevaplarına bazı fenol derişimleri için ise % 5'lik glutaraldehid konsantrasyonunda ki biyosensör cevaplarına benzemektedir. % 5'lik glutaraldehid oranı için yüksek fenol derişimlerinde gözlenen biyosensör cevabındaki düşüşün en önemli nedenleri; jelatin-jelatin arasında oluşabilecek çapraz bağ sayısının artışı, bunun yaratabileceği sterik etki, substratın biyoaktif tabakaya difüzyonunun gözenek boyutu küçülmesi nedeni ile daha zor gerçekleşmesi ve difüzyon problemi olabilir.

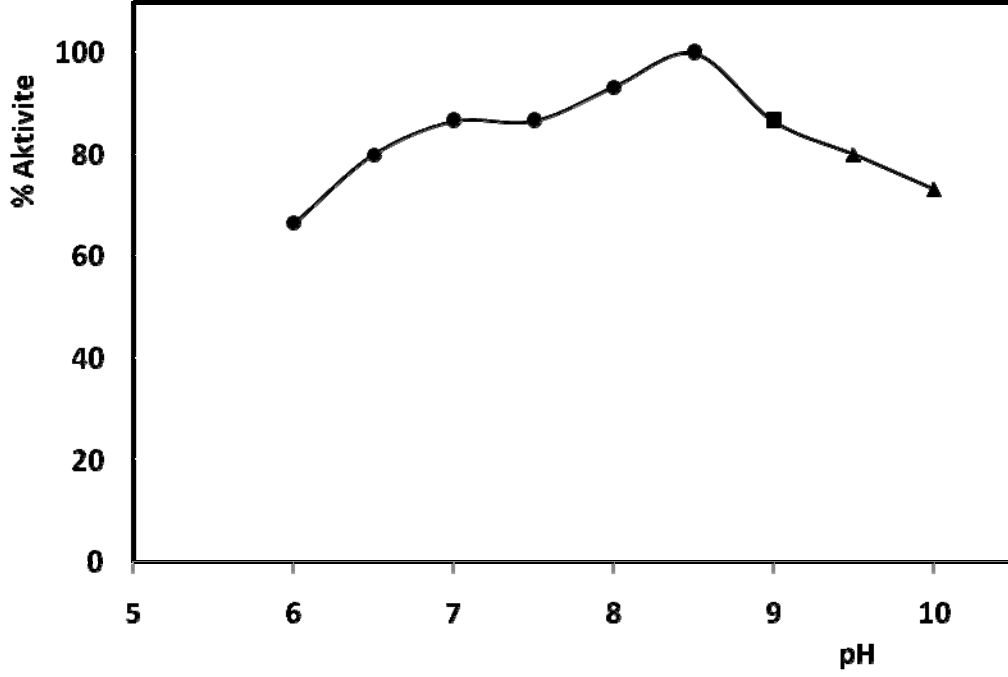
### **3.2. Kayısı Dokusu Temelli Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonuna İlişkin Bulgular**

Kayısı dokusu kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin optimum pH, uygun tampon sistemi, uygun tampon konsantrasyonu ve optimum sıcaklık gibi çalışma koşullarına ait optimizasyon sonuçları bu bölümde verilmiştir.

#### **3.2.1. Optimum pH**

Doku biyosensörünün biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonu sonrası çalışma pH'sının biyosensör cevabı üzerine etkisini ve dolayısıyla biyosensörün optimum pH değerini belirlemek üzere farklı pH değerlerindeki fosfat, tris-HCl ve glisin-NaOH tamponlarının kullanıldığı pH optimizasyonuna yönelik çalışmalar gerçekleştirildi.

Denemeler sonrası elde edilen sonuçlara yönelik grafik Şekil 3.4’de verilmiştir.



**Şekil 3.4.** Kayısı dokusu temelli biyosensörün optimum pH grafiği. [ ●: Sodyum-fosfat tamponu, ■: Tris-HCl tamponu, ▲: Glisin-NaOH tamponu. Tüm biyosensörler için kayısı miktarı 0,118 g/cm<sup>2</sup>, jelatin miktarı 6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 2,5’dir. Çalışma sıcaklığı t: 37<sup>0</sup>C, fenol konsantrasyonu: 5 mM’dir.]

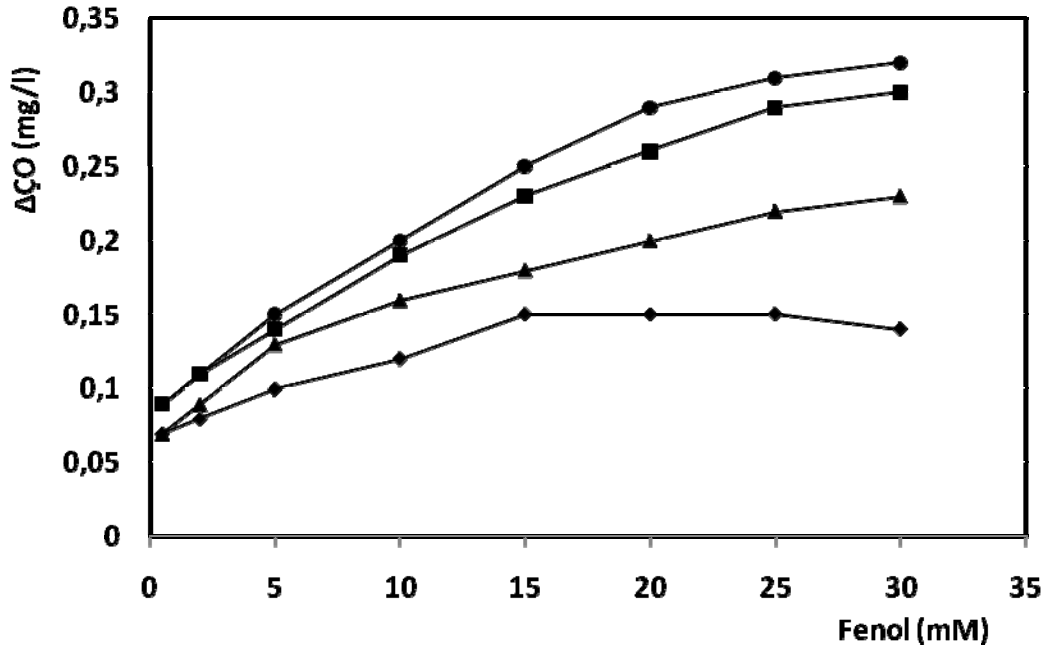
Geliştirilen biyosensör ile yapılan optimum pH taramalarında biyosensörün en yüksek cevabı pH: 8,5 değerinde verdiği bu değerden daha asidik ve daha bazik bölgelere gidildikçe biyosensör cevabında düşmeler tespit edildi.

Yapılan literatür taramalarında kayısı PPO enzimi için optimum pH değerinin 8,5 olduğu göz önüne alındığında, doku temelli biyosensörün optimum pH değerinin 8,5 çıkması beklenen bir neticedir.

### 3.2.2. Uygun tampon sistemi

Doku temelli biyosensörün pH optimizasyonu sonrası bu pH değerine sahip olan tampon sistemleriyle de denemeler yapılarak pH’nın yanı sıra tampon sistemlerinin de doku biyosensör cevabını ne yönde etkilediğinin belirlendiği çalışmalar gerçekleştirildi. Bu amaç doğrultusunda yapılan denemelerde pH: 8,5 değerine sahip sodyum-fosfat, potasyum-fosfat, tris-HCl ve sodyum borat- NaOH tampon sistemleri kullanıldı.

Yapılan denemeler sonrası elde edilen sonuçlara ilişkin grafikler Şekil 3.5’de verilmiştir.



Şekil 3.5. Tampon sisteminin biyosensör cevabı üzerine etkisi. [t: 37 °C, pH: 8,5; 50 mM; ● : sodyum-fosfat tamponu, ■: potasyum-fosfat tamponu, ▲: tris-HCl tamponu, ◆: sodyum borat-NaOH tamponu. Tüm biyosensörler için kayısı miktarı 0,118 g/cm<sup>2</sup>, jelatin miktarı 6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 2,5’tir].

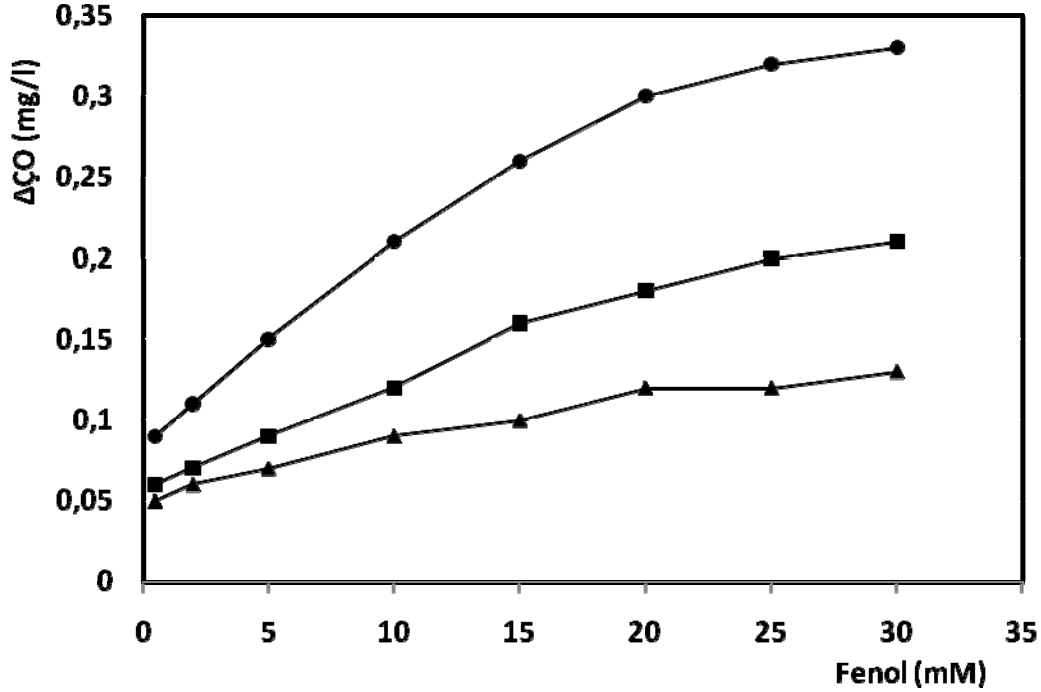
Kayısı dokusu temelli biyosensörler ile yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar, en iyi ve doğrusal biyosensör cevabının sodyum-fosfat tamponu ile alındığını gösterdi. En düşük biyosensör cevapları ise sodyum borat-NaOH tamponu kullanıldığında alındı. En uygun tampon sisteminin sodyum-fosfat tamponu olduğu belirlendi. Bu sonuç tamponun pH’sı kadar içerdiği iyon türünün de biyosensörün etkinliğinde önemli bir parametre olduğunun bir göstergesidir.

Bazı tampon çözeltiler (örneğin; kolin esteraz üzerine borat tamponu) enzim üzerinde zayıf inhibitör etkisi gösterebilir. Bundan dolayı biyosensörler için uygun tampon sisteminin incelenmesi önemli bir parametredir.

### 3.2.3. Uygun tampon konsantrasyonu

Doku temelli biyosensörlerin pH optimizasyonu ve bu pH’daki en uygun tampon sisteminin belirlenmesi sonrası, hangi tampon konsantrasyonları ile çalışıldığında en iyi biyosensör cevaplarının alındığının belirlenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirildi.

Bu amaç doğrultusunda 25, 50 ve 100 mM'lık konsantrasyonlardaki sodyum-fosfat (pH: 8,5) tamponları ile denemeler yapıldı. Denemeler sonrası elde edilen sonuçlara ilişkin grafikler Şekil 3.6'da verilmiştir.



Şekil 3.6. Tampon konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi.[t:37<sup>0</sup>C, pH: 8,5 sodyum-fosfat tamponu. ■ : 25 mM, ● : 50 mM, ▲: 100 mM. Tüm biyosensörler için kayısı miktarı 0,118 g/cm<sup>2</sup>, jelatin miktarı 6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 2,5'tir].

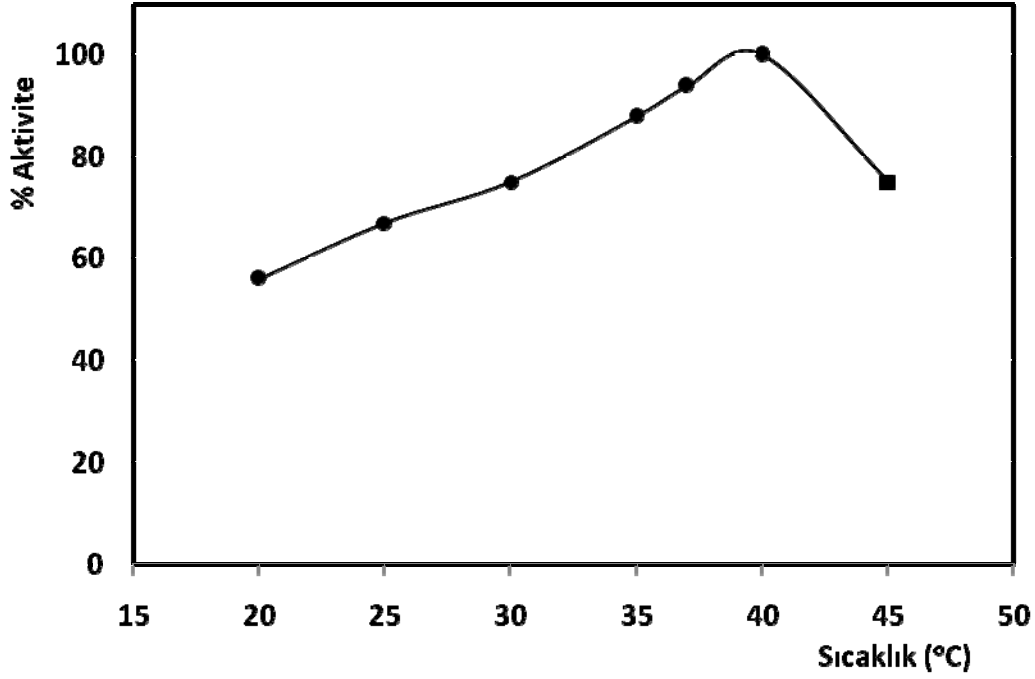
Denemeye ilişkin olarak elde edilen grafiklerden en yüksek ve doğrusal biyosensör cevaplarının 50 mM'lık konsantrasyondaki sodyum-fosfat tamponu ile alındığı görüldü. 25 mM konsantrasyondaki sodyum-fosfat tamponu ile 50 mM'a nazaran daha düşük biyosensör cevapları elde edildi ve doğrusallıktan sapma gözlemlendi. Diğer taraftan 100 mM'lık sodyum-fosfat tamponu kullanıldığında ise en düşük biyosensör cevapları alındı.

İyon şiddetindeki artış belli değere kadar enzim aktivitesinde artışa neden olmaktadır. Bu durum genel enzimolojik prensiplerle de uyum içerisindedir. Ancak belli bir değerden sonra iyon şiddetindeki artış enzim aktivitesinde düşüşe neden olmaktadır.

### 3.2.4. Optimum sıcaklık

Doku temelli biyosensörün pH optimizasyonu sonrası optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik denemeler gerçekleştirildi. Bu amaç doğrultusunda 20, 25, 30, 35, 37, 40 ve 45 °C’lerde ölçümler alındı.

Yapılan denemeler sonrası elde edilen sonuçlara ilişkin grafikler Şekil 3.7’de verilmiştir.



**Şekil 3.7.** Kayısı dokusu temelli biyosensörün optimum sıcaklık grafiği. [ sodyum-fosfat tamponu, pH: 8,5; 50 mM. Fenol konsantrasyonu: 5 mM. Tüm biyosensörler için kayısı miktarı 0,118 g/cm<sup>2</sup>, jelatin miktarı 6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 2,5'tir].

Şekilden de görüldüğü gibi 40°C'ye kadar biyosensör cevabında artış, 40°C'nin üstünde ise azalma kaydedildi. 40°C'nin üstünde sıcaklık artışı ile çözülmüş oksijen konsantrasyonunda da azalma ve dolayısıyla biyosensör cevabında da düşme gözlemlendi. 40 °C PPO'ın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık olduğu için bu sıcaklığa kadar biyosensör cevabında artış gözlemlendi.

40 °C'den daha yüksek sıcaklıklarda biyosensör cevabında düşme gözlenmesini ise optimum sıcaklığın aşılması ile birlikte sıcaklık artışı ile tampon içerisindeki çözülmüş oksijen konsantrasyonundaki azalma ile açıklanabilir. 45°C'de gerçekleştirilen denemeler de ise biyosensörün biyoaktif tabakasında deformasyonlar meydana geldi.

Jelatinin erime sıcaklığının 38 °C olduğu düşünülürken en iyi biyosensör cevabının alındığı 40 °C'nin optimum sıcaklık olarak kabul edilemesinin imkansız olduğu, 37 °C'nin optimum sıcaklık olarak belirlenmesinin doğal bir sonuç olduğu gözükmektedir.

### **3.3. Kayısı Doku Kullanılarak Hazırlanan Doku Biyosensörünün Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular**

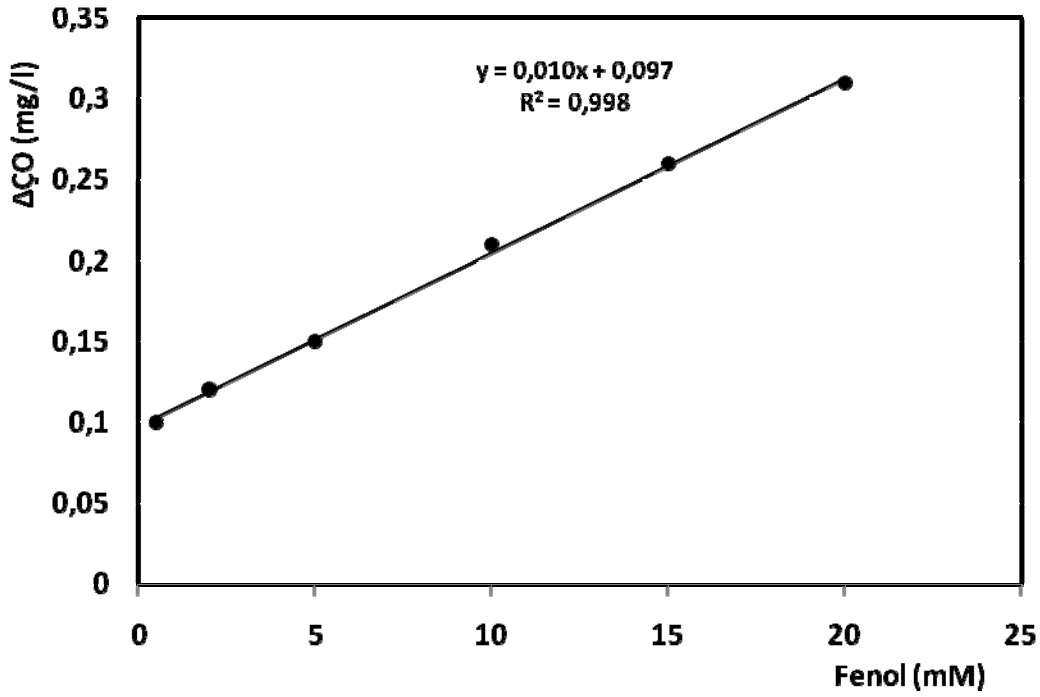
Doku biyosensörünün karakterizasyonu amacıyla bu bölümde fenol tayin aralığının, termal kararlılığın, operasyonel kararlılığın, analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin, substrat spesifikliğı ve girişim etkilerinin ve depo kararlılığının belirlenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirildi.

#### **3.3.1. Fenol tayin aralığı**

Geliştirilen doku temelli biyosensörün gerek biyoaktif tabaka bileşenlerinin ve gerekse çalışma koşullarının optimizasyonu sonrası fenol için standart denemeler yapılarak biyosensörün fenol için tayin aralığı belirlendi.

Şekil 3.8'de doku temelli biyosensöre ilişkin fenol tayin aralığının gösteren standart grafiğı verilmektedir.





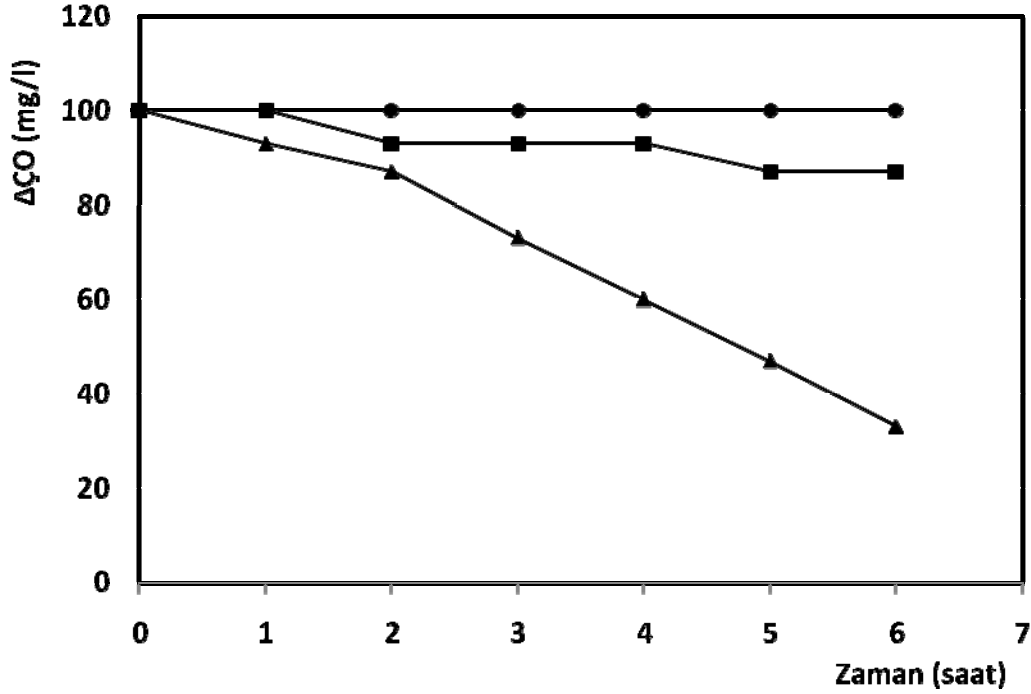
**Şekil 3.8.** Doku temelli biyosensör için fenol tayin aralığı. [Sodyum-fosfat tamponu, pH: 8,5; 50 mM, t:37 °C. Tüm biyosensörler için kayısı miktarı 0,118 g/cm<sup>2</sup>, jelatin miktarı 6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 2,5'tir].

Optimize edilen koşullarda hazırlanan biyosensör ile yapılan denemeler sonrası 0,5 mM -20 mM'lık fenol konsantrasyon aralığında doğrusal grafikler elde edildi. Yüksek fenol konsantrasyonunda meydana gelen lineerlikten sapma, biyoaktif tabakada var olan polifenol oksidazın sınırlı varlığının bir sonucudur.

### 3.3.2. Termal Kararlılığın Belirlenmesi

Biyosensörün termal kararlılığının belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan biyosensörler ile 5 mM'lık fenol standardı için ilk ölçümler çalışma sıcaklığında alındıktan sonra, biyosensörler farklı sıcaklıklarda (37 – 40 ve 45 °C) çalışma tamponu içerisinde (sodyum-fosfat tamponu; pH: 8,5; 50 mM) 1 saat bekletildi ve tekrar çalışma sıcaklığında ölçümler gerçekleştirildi. Bu işlem periyodik olarak bir saat aralıklarla altı saat süresince yapıldı.

Denemelerin sonuçlarına yönelik olarak elde edilen grafikler Şekil 3.9’da verilmiştir.



**Şekil 3.9.** Doku biyosensörünün termal kararlılığı. ●: 37 °C ■: 40 °C, ▲: 45 °C. [Sodyum-fosfat tamponu; pH: 8,5; 50 mM, Fenol konsantrasyonu 5 mM]. Tüm biyosensörler için kayısı miktarı 0,118 g/cm<sup>2</sup>, jelatin miktarı 6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 2,5’tir.

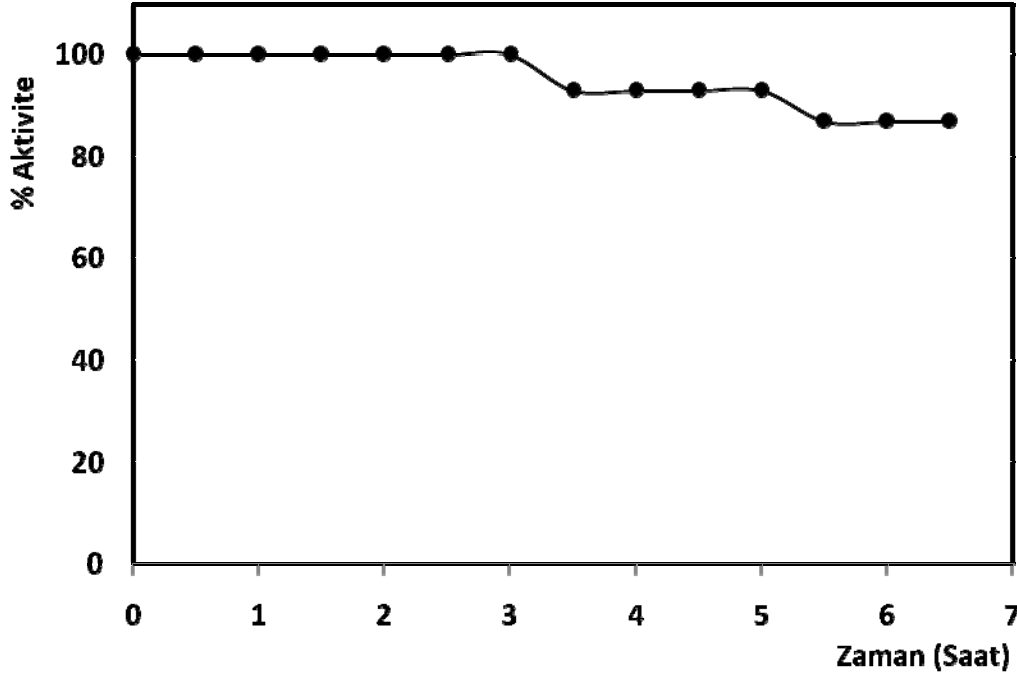
Termal kararlılık denemelerinde 6 saatlik periyotlar sonunda çalışma sıcaklığı olan 37 °C’de biyosensör termal deaktivasyon göstermediğinden biyosensör cevabında bir düşme gözlenmezken enzimin optimum sıcaklığı olan 40 °C’de % 13’lük bir düşme gözlenmiştir. Bu da optimum sıcaklık olarak 40 °C nin seçilmemesinin ne kadar doğru olduğunun bir kanıtıdır. 45 °C için yapılan ölçümlerde ise 6 saat sonunda başlangıçta alınan biyosensör cevabına göre % 67’lik bir düşüş gözlenmiştir. Ayrıca biyosensör tabakasında deformasyonlar meydana gelmiştir.

### 3.3.3. Operasyonel kararlılık

Doku temelli biyosensörün operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacı ile yeni hazırlanan doku temelli biyosensör daha önce optimizasyonu yapılarak belirlenmiş olan çalışma sıcaklığında (37 °C) ve çalışma tamponu içinde (sodyum-fosfat tamponu, pH:

8,5; 50 mM) bekletilerek yarım saatlik periyotlar sonunda 5 mM'lık fenol standartları için ölçümler gerçekleştirildi.

Denemelerin sonuçlarına yönelik olarak elde edilen grafikler Şekil 3.9'da verilmiştir.



**Şekil 3.10.** Kayısı dokusu temelli biyosensörün operasyonel kararlılığı. [sodyum-fosfat tamponu; pH: 8,5; 50 mM; t: 37 °C. Fenol konsantrasyonu 5 mM].

Operasyonel kararlılık denemelerinde ilk üç saatte biyosensör cevabında herhangi bir düşme gözlenmezken bununla birlikte 6,5 saatlik periyot sonunda doku biyosensörünün cevabında sadece % 13'lük bir düşme olduğu belirlendi.

### 3.3.4. Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği

Doku temelli biyosensör ile fenol tayini için elde edilen sonuçların tekrarlanabilirliğinin tespiti amacı ile fenolün 5 mM konsantrasyonda (n= 9) ölçümler yapıldı. Elde edilen sonuçlar ve sonuçlara ilişkin bulunan standart sapma (S.S) ve varyasyon katsayılarına (V.K) ilişkin değerler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Doku temelli biyosensör ile alınan sonuçların tekrarlanabilirliği.

Ölçüm No:	$\Delta\text{ÇO}$ (mg/l)	Fenol (mM)
1	0,15	5
2	0,15	5
3	0,15	5
4	0,15	5
5	0,15	5
6	0,15	5
7	0,15	5
8	0,15	5
9	0,14	4,3
Ortalama değer ( $\bar{x}$ ) (mM)		4,92
Standart sapma ( S.S ) (mM)		$\pm 0,233$
Varyasyon Katsayısı ( % V.K )		% 4,74

### 3.3.5. Substrat spesifikliği ve girişim etkileri

Doku temelli biyosensörün substrat spesifikliği ve girişim etkilerine ilişkin olarak elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2’de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Doku temelli biyosensörün substrat spesifikliği ve girişim etkileri.

Substrat*	% Aktivite	Substrat*	% Aktivite
Fenol	100	Fenol	100
Glisin	7	Fenol + Glisin	93
Glukoz	13	Fenol + Glukoz	93
Sükroz	20	Fenol + Sükroz	87
Laktoz	20	Fenol + Laktoz	87
Okzalik Asit	7	Fenol + Okzalik Asit	100
Sitrik Asit	0	Fenol + Sitrik Asit	87
Üre	0	Fenol + Üre	87

\* Konsantrasyon 5 mM’dir.

Çizelge 3.2’de görüldüğü gibi doku temelli biyosensör en yüksek ve spesifik cevabı fenol için göstermektedir.

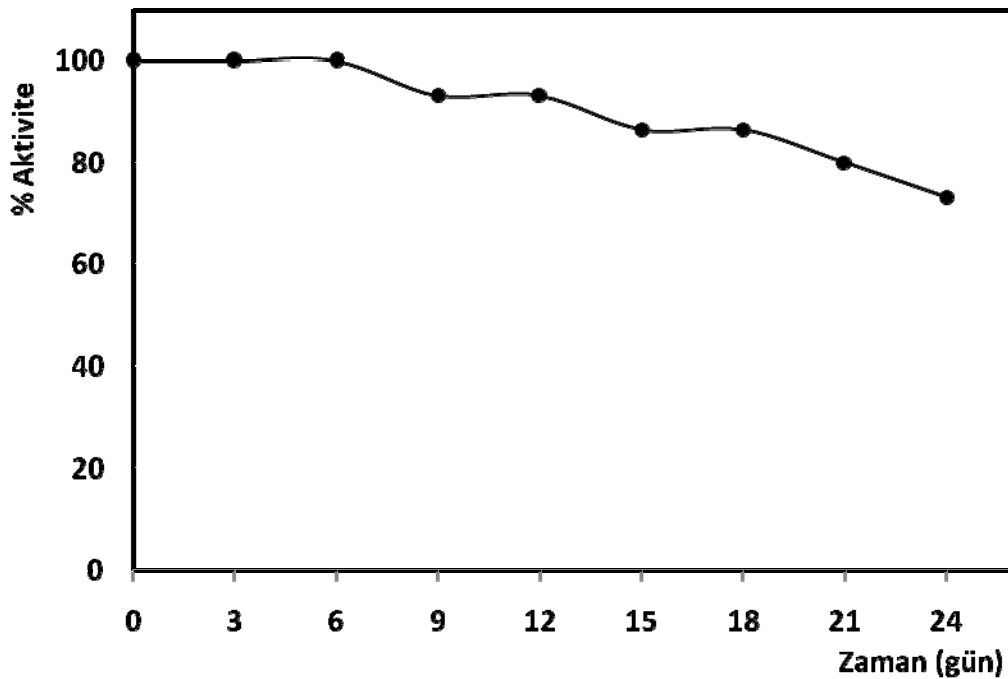
Doku biyosensör ile yapılan substrat spesifikliğı denemelerinde sitrik asit ve üre için herhangi bir biyosensör cevabı gözlenmezken, diğer substratlar için küçükte olsa bir cevap gözlenmiştir. Geliştirilen biyosensörün glukoz, sükröz ve laktoza az da olsa cevap vermesi kayısı dokusu içerisinde şekerlerin oksijen varlığında karbondioksit, su, enerji ve etilen gibi uçucu bileşiklere parçalanmasının bir sonucudur. Bu sırada ortamdaki oksijen konsantrasyonunda bir düşüş olur [110].

Girişim etkilerine baktığımızda ise sadece okzalik asitin bulunduğu ortamda biyosensör cevabında bir düşme gözlenmedi. Diğer substratların varlığında ise alınan yanıtlarda % 7 ve % 13 oranında düşmeler gözlemlendi.

### 3.3.6. Depo kararlılığı

Geliştirilen doku biyosensörünün depo kararlılığının belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan biyosensör ile başlangıç anında ve üç günlük periyotlar sonunda 5 mM fenol konsantrasyonu için ölçümler yapıldı.

Yapılan ölçümler sonrası elde edilen sonuçlara ilişkin grafik Şekil 3.10’da verilmiştir.



Şekil 3.11. Doku temelli biyosensörün depo kararlılığı. [Sodyum- fosfat tamponu; pH: 8,5; 50 mM; t: 37 °C. Fenol konsantrasyonu 5 mM].

Genel olarak biyosensör uzun süre depolandıktan sonra, biyoaktif tabakasında denatürasyon veya inhibisyon oluşabilir. Biyosensörün fenol standardına verdiği cevaplar 24 gün süre ile izlendi. Biyosensör + 4 °C'de distile su içeren koruyucu kabında depolandı. Fakat sensör su ile temas etmedi. Bu şartlar biyosensör için nemli bir ortam sağladı. Böylece biyoaktif tabakanın kuruması önlenmiş oldu.

6 günlük depolamanın ardından biyosensör halen başlangıç aktivitesini korumaktadır. 12, 18 ve 24 günlük depolamanın ardından biyosensör başlangıç aktivitesinin halen sırasıyla % 93,3; % 86,6 ve % 73,3'ünü korumaktadır.

### **3.4. Kayısı Doku Temelli Biyosensör İle Bazı Fenolik Bileşiklerin ve Polifenollerin Tayinine İlişkin Bulgular**

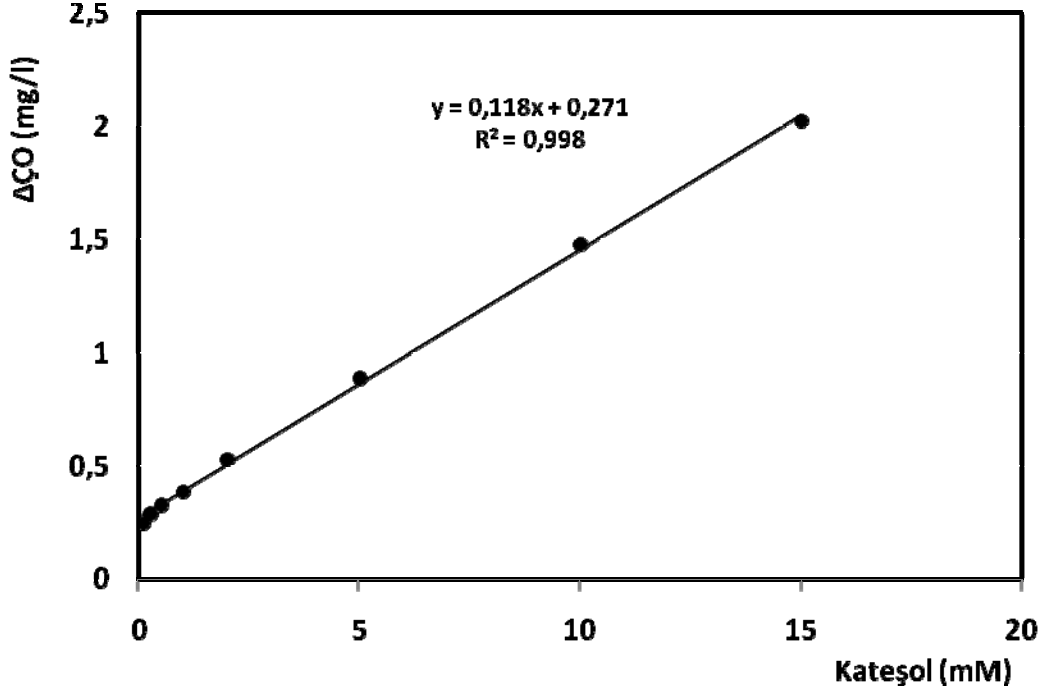
Bu bölümde kayısı doku kullanılarak hazırlanan biyoaktif tabaka bileşenleri ve çalışma koşulları optimize edilmiş biyosensörler ile 7 adet fenolik bileşiğin ve L-askorbik asidin ölçümüne ilişkin kalibrasyon eğrileri verilmiştir.

Ölçümü alınan substratlar içerisinde en yüksek aktiviteyi pirogallol gösterdi. Daha sonra bunu sırasıyla; kateşol, 4-metilkateşol, hidrokinon, 4-etilrezorsin, L-askorbik asit, L-tirozin ve 8-hidroksikinolin takip etti.

#### **3.4.1. Kateşol tayin aralığı**

Geliştirilen doku biyosensörü kullanılarak optimize edilmiş koşullarda farklı kateşol standartları için ölçümler alınmış ve kateşol için tayin aralığı belirlenmiştir.

Şekil 3.11'de doku biyosensörüne ilişkin kateşol tayin aralığını gösteren standart grafiği verilmektedir.



**Şekil 3.12.** Doku temelli biyosensör için kateşol tayin aralığı. [Sodyum-fosfat tamponu, pH: 8,5; 50 mM, t:37 °C. Tüm biyosensörler için kayısı miktarı 0,118 g/cm<sup>2</sup>, jelatin miktarı 6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 2,5'tir].

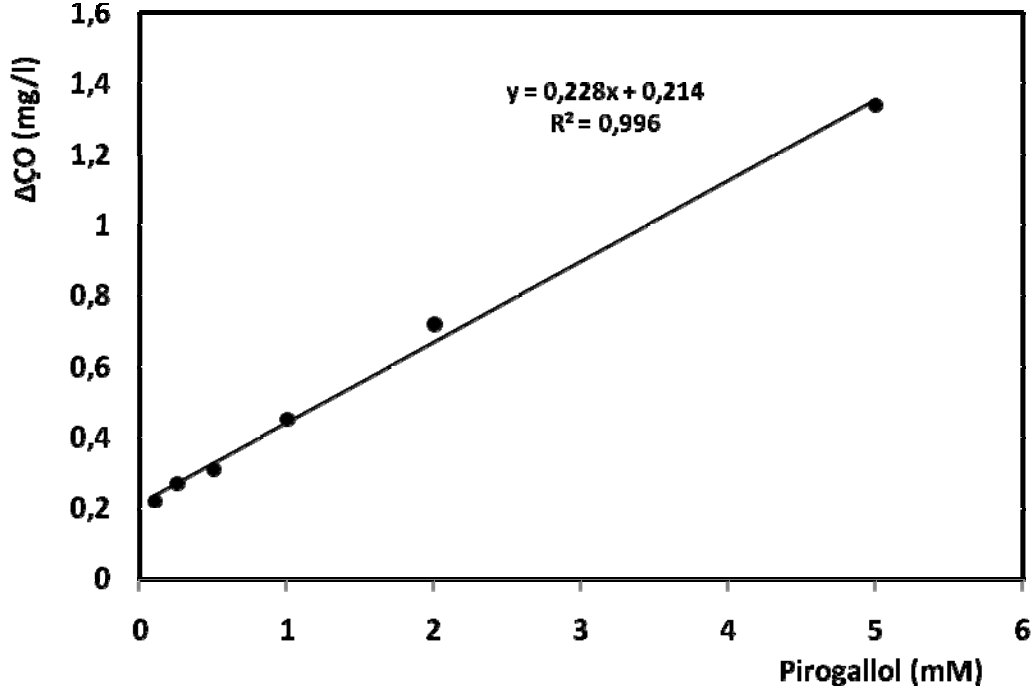
Optimize edilen koşullarda hazırlanan biyosensör ile yapılan denemeler sonrası 0,1 mM -15 mM'lık kateşol konsantrasyon aralığında doğrusal grafikler elde edildi.

Fenol ve kateşolün 5mM'lık standartları için alınan biyosensör cevapları karşılaştırıldığında, fenol için alınan yanıt %100 kabul edildiğinde kateşol için %593 cevap alındığı görülmüştür. Gözlenen bu yüksek cevabın çok çeşitli nedenleri olabilir. Bu enzimin kateşole gösterdiği yüksek aktiviteden kaynaklanabilir [80]. Kateşolün yapısında 2 tane fenol grubunun bulunmasından kaynaklanabilir. Diğer bir neden ise kateşol çok hızlı bozulan bir polifenoldür ve bozunurken ortamdaki oksijeni kullanır bu da elektrot tarafından oksijendeki bir düşüş olarak algılanabilir.

### 3.4.2. Pirogallol tayin aralığı

Kayısı dokusu temelli biyosensör kullanılarak optimize edilmiş koşullarda farklı pirogallol standartları için ölçümler alınmış ve pirogallol için tayin aralığı belirlenmiştir.

Şekil 3.12'de doku temelli biyosensöre ilişkin pirogallol tayin aralığını gösteren standart grafiği verilmektedir.



**Şekil 3.13.** Doku temelli biyosensör için pirogallol tayin aralığı. [Sodyum-fosfat tamponu, pH: 8,5; 50 mM, t:37 °C. Tüm biyosensörler için kayısı miktarı 0,118 g/cm<sup>2</sup>, jelatin miktarı 6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 2,5'tir].

Kayısı dokusu temelli biyosensör ile yapılan denemeler sonrası 0,1 mM -5 mM'lık pirogallol konsantrasyon aralığında doğrusal grafikler elde edildi.

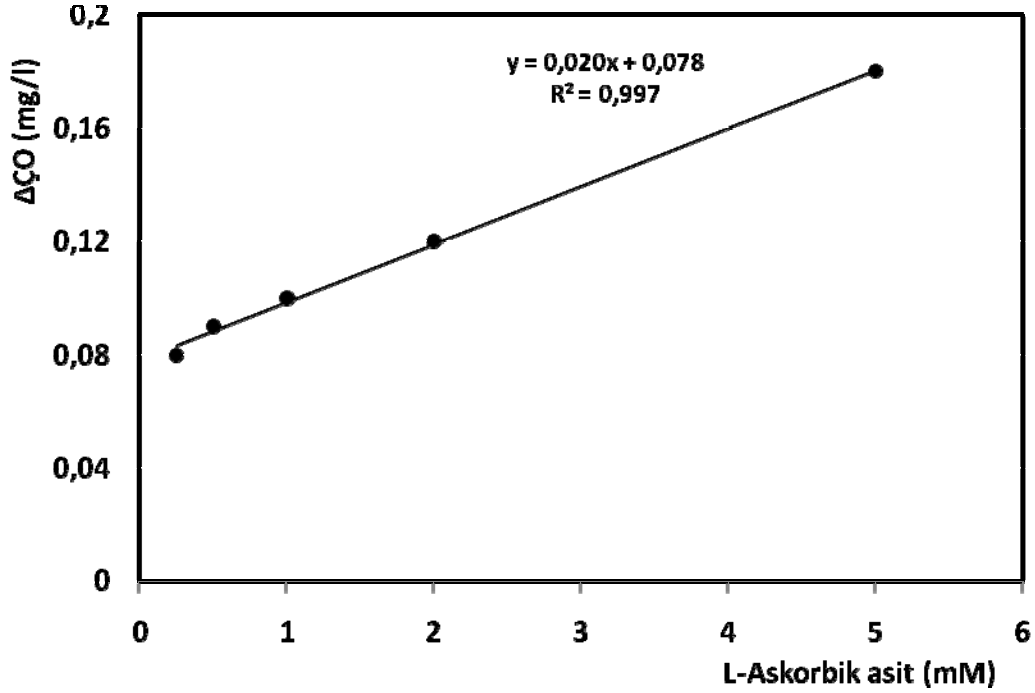
Fenol ve pirogallolün 5 mM'lık standartları için alınan biyosensör yanıtlarına bakıldığında, pirogallol için alınan yanıt fenole göre % 793 daha fazladır. Benzer şekilde kateşolde olduğu gibi alınan bu yüksek cavabın bir çok nedeni vardır. Kateşolden farklı olarak pirogallol bünyesinde 3 adet fenol grubu bulunduran bir polifenoldür.

### 3.4.3. L-Askorbik asit tayin aralığı

Doku biyosensörü kullanılarak optimize edilmiş koşullarda farklı L-Askorbik asit standartları için ölçümler alınmış ve L-askorbik asit için tayin aralığı belirlenmiştir.

Şekil 3.13'de doku biyosensörüne ilişkin L-askorbik asit tayin aralığını gösteren standart grafiği verilmektedir.





**Şekil 3.14.** Doku temelli biyosensör için L-Askorbik asit tayin aralığı. [Sodyum-fosfat tamponu, pH: 8,5; 50 mM, t:37 °C. Tüm biyosensörler için kayısı miktarı 0,118 g/cm<sup>2</sup>, jelatin miktarı 6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 2,5'tir].

Optimize edilen koşullarda hazırlanan biyosensör ile yapılan denemeler sonrası 0,25 mM -5 mM'lık L-askorbik asit konsantrasyon aralığında doğrusal grafikler elde edildi.

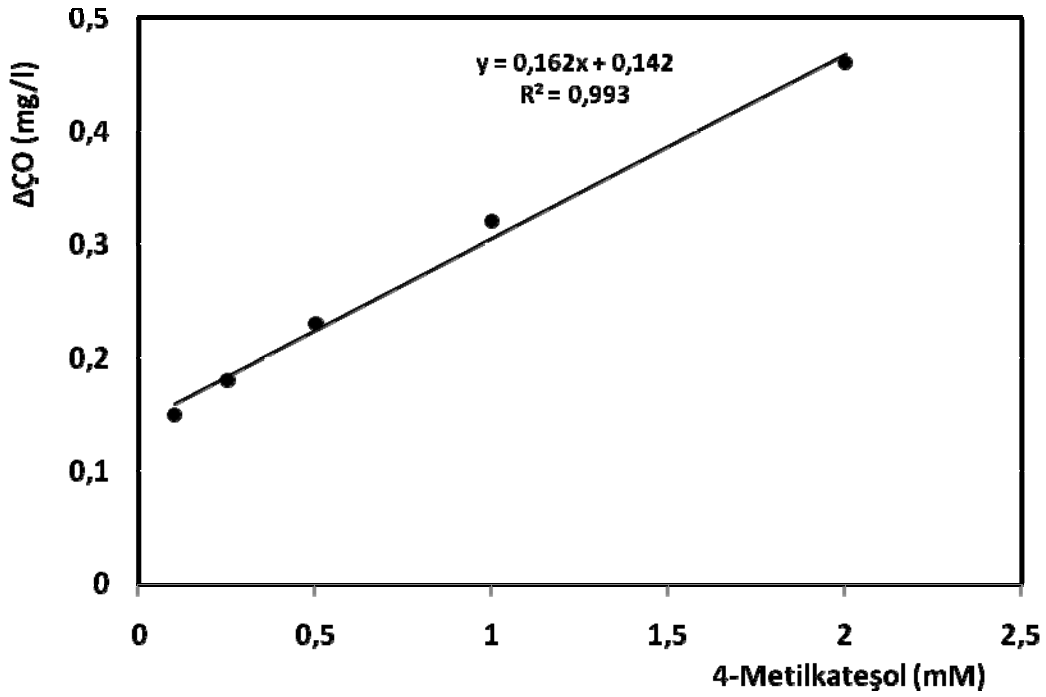
Fenolik bir bileşik olmayan L-askorbik asitin 5 mM'lık standardı için alınan biyosensör cevabı yine aynı derişimdeki fenol için alınan cevapla kıyaslandığında % 20 daha fazladır.

Askorbik asit fenolik bir bileşik olmamasına rağmen fenole göre daha yüksek aktivite göstermesi askorbik asitin evrensel girişim etkisinden ya da sulu formdaki siklik yapısından kaynaklanır [39].

#### 3.4.4.4-Metilkateşol tayin aralığı

Geliştirilen doku biyosensörü kullanılarak optimize edilmiş koşullarda farklı 4-metilkateşol standartları için ölçümler alınmış ve 4-metilkateşol için tayin aralığı belirlenmiştir.

Şekil 3.14'de doku biyosensörüne ilişkin 4-metilkateşol tayin aralığını gösteren standart grafiği verilmektedir.



**Şekil 3.15.** Doku temelli biyosensör için 4-metilkateşol tayin aralığı. [Sodyum-fosfat tamponu, pH: 8,5; 50 mM, t:37 °C. Tüm biyosensörler için kayısı miktarı 0,118 g/cm<sup>2</sup>, jelatin miktarı 6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 2,5'tir].

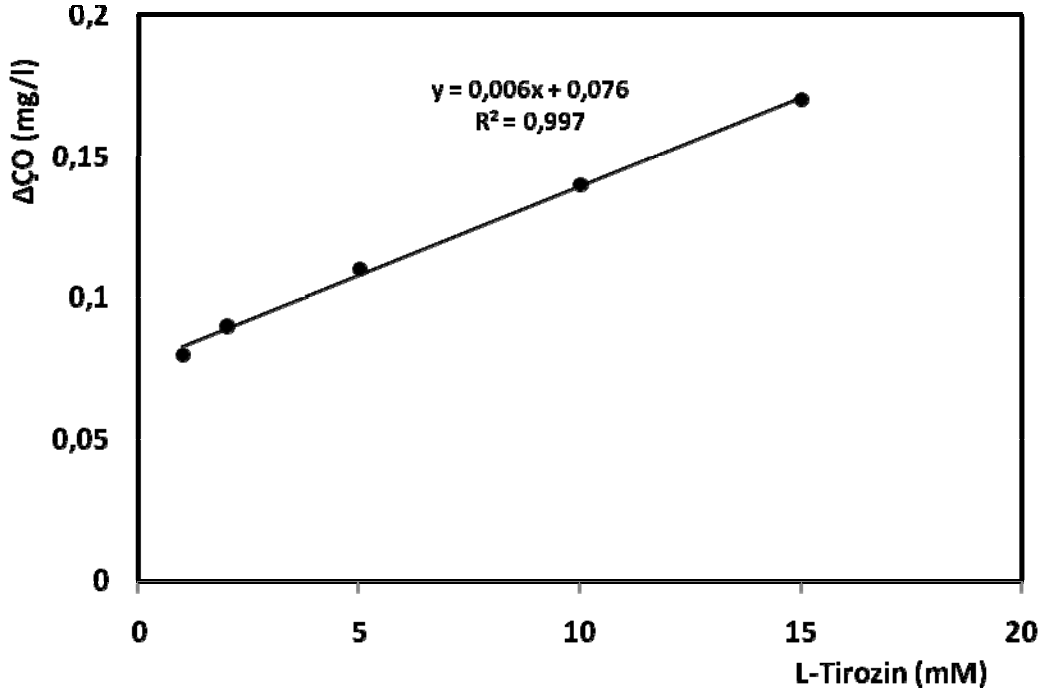
Optimize edilen koşullarda hazırlanan biyosensör ile yapılan denemeler sonrası 0,1 mM - 2 mM'lık 4-metilkateşol konsantrasyon aralığında doğrusal grafikler elde edildi.

2 mM'lık fenol ve 4-metilkateşol standartları için elde edilen biyosensör cevapları karşılaştırıldığında fenol için elde edilen yanıt % 100 kabul edildiğinde, 4-metilkateşol için elde edilen yanıt % 383'tür. Kateşolün 2 mM'lık standardı ile kıyaslandığında biyosensörün 4-metilkateşole verdiği biyosensör cevabında %13'lük bir düşüş gözlenmektedir. Bunun sebebi 4-metilkateşolde ki 4 nolu C atomuna bağlı metil grubunun sterik etkisi olabilir.

### 3.4.5. L-Tirozin tayin aralığı

Kayısı dokusu temelli biyosensör kullanılarak optimize edilmiş koşullarda farklı L-tirozin standartları için ölçümler alınmış ve L-tirozin için tayin aralığı belirlenmiştir.

Şekil 3.15'de doku temelli biyosensöre ilişkin L-tirozin tayin aralığını gösteren standart grafiği verilmektedir.



**Şekil 3.16.** Doku temelli biyosensör için L-Tirozin tayin aralığı. [Sodyum-fosfat tamponu, pH: 8,5; 50 mM, t:37 °C. Tüm biyosensörler için kayısı miktarı 0,118 g/cm<sup>2</sup>, jelatin miktarı 6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 2,5'tir].

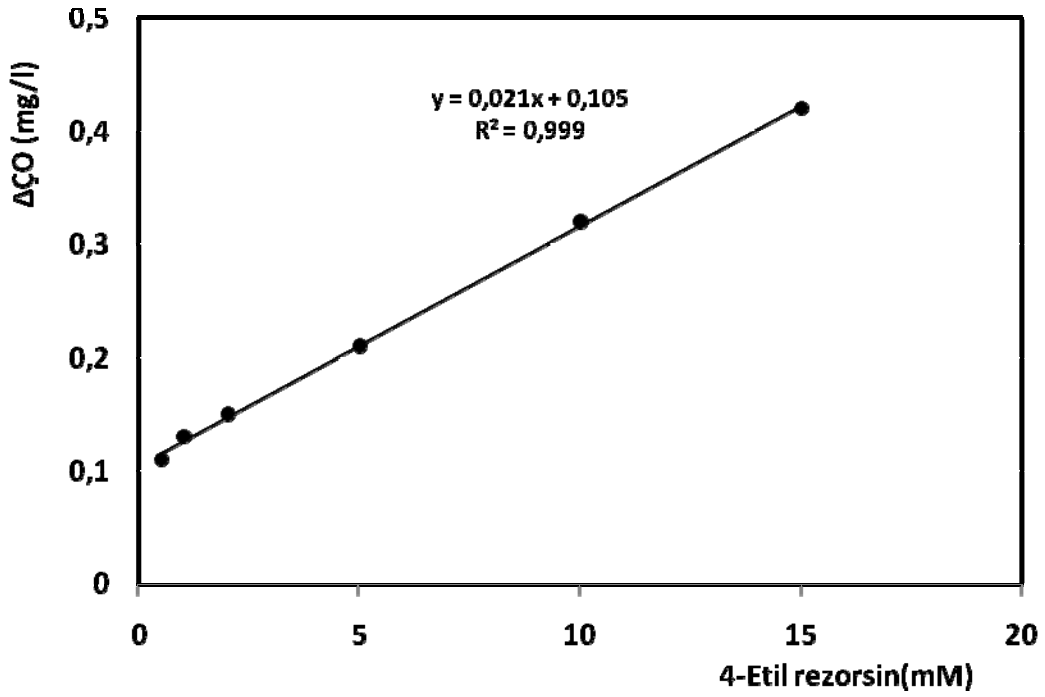
Optimize edilen koşullarda hazırlanan doku biyosensörü ile yapılan denemeler sonrası 1 mM -15 mM'lık L-tirozin konsantrasyon aralığında doğrusal grafikler elde edildi.

Bir amino asit olan L-tirozinin 5 mM'lık standardı için alınan biyosensör cevabı aynı derişimdeki fenol standardına göre %27 daha düşüktür. Kateşol ve 4-metil kateşol arasında olduğu gibi, fenol ve L-tirozin arasında da fenol halkasına yabancı bir grubun bağlı olması biyosensör cevabında bir düşüşe neden olmuştur. Fenol halkasına büyük bir grubun bağlı olması, sterik bir etki yapacağı gibi substratın biyoaktif tabakadan difüzyonunu da yavaşlatacaktır.

#### 3.4.6.4-Etil rezorsin tayin aralığı

Geliştirilen doku biyosensörü kullanılarak optimize edilmiş koşullarda farklı 4-etilrezorsin standartları için ölçümler alınmış ve 4-etilrezorsin için tayin aralığı belirlenmiştir.

Şekil 3.16'da doku temelli biyosensöre ilişkin 4-etilrezorsin tayin aralığını gösteren standart grafiği verilmektedir.



**Şekil 3.17.** Doku temelli biyosensör için 4-Etilrezorsin tayin aralığı. [Sodyum-fosfat tamponu, pH: 8,5; 50 mM, t:37 °C. Tüm biyosensörler için kayısı miktarı 0,118 g/cm<sup>2</sup>, jelatin miktarı 6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 2,5'tir].

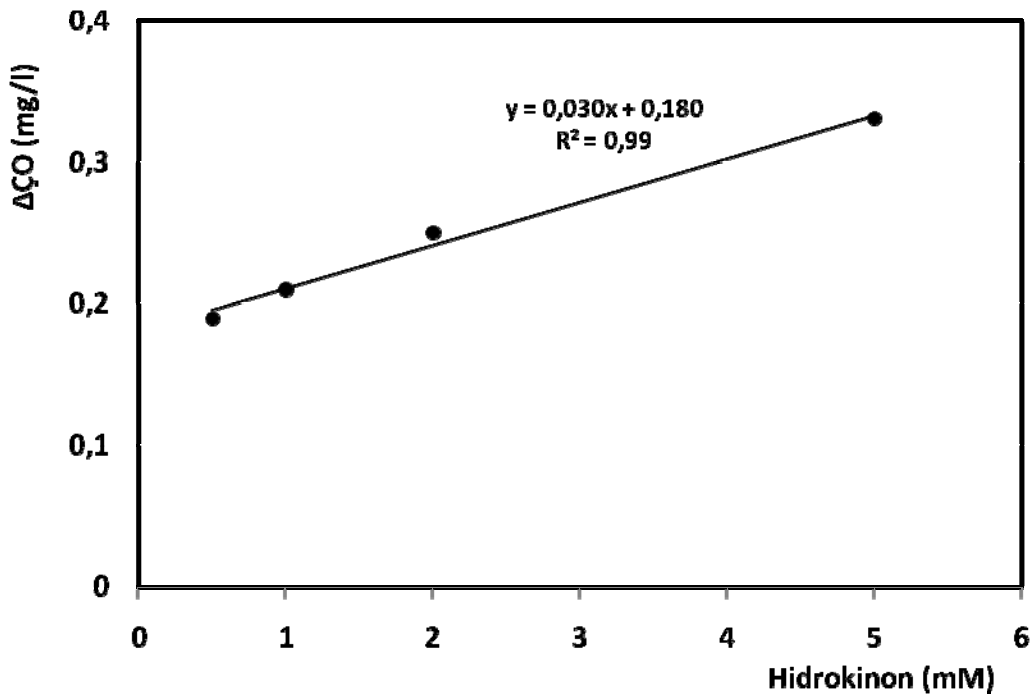
Optimize edilen koşullarda hazırlanan biyosensör ile yapılan denemeler sonrası 0,5 mM -15 mM'lık 4-etilrezorsin konsantrasyon aralığında doğrusal grafikler elde edildi.

5 mM'lık fenol standardı için alınan biyosensör cevabı % 100 kabul edildiğinde, aynı derişimdeki 4-etilrezorsin için alınan cevap fenol için alınan cevaba oranla % 40 daha fazladır. Fenol ile kıyaslandığına bu yanıtlar normaldir. Çünkü 4-etilrezorsin yapısında 2 fenol grubu ve bir etil grubu barındırır. Etil grubunun sterik etkisinden dolayı yaklaşık olarak fenole oranla 2 katı oranında beklenen biyosensör cevabında bir düşüş gözlenmiştir. Fakat yine bünyesinde 2 fenol grubu içeren kateşol ve 2 fenol grubu ve 1 metil grubu içeren 4-metilkateşol ile kıyaslandığında yüksek beklenen biyosensör cevabı oldukça düşüktür. Bunun nedeni enzimin kateşole olan yüksek aktivitesi ve kateşolün bozunma hızının yüksek olması olabilir. Ayrıca benzen halkasına bağlı OH gruplarının konumları da biyosensör cevabını etkiliyor olabilir.

### 3.4.7. Hidrokinon tayin aralığı

Hazırlanan doku biyosensörü kullanılarak optimize edilmiş koşullarda farklı hidrokinon standartları için ölçümler alınmış ve hidrokinon için tayin aralığı belirlenmiştir.

Şekil 3.17'de doku temelli biyosensöre ilişkin hidrokinon tayin aralığını gösteren standart grafiği verilmektedir.



Şekil 3.18. Doku temelli biyosensör için hidrokinon tayin aralığı. [Sodyum-fosfat tamponu, pH: 8,5; 50 mM, t:37 °C. Tüm biyosensörler için kayısı miktarı 0,118 g/cm<sup>2</sup>, jelatin miktarı 6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 2,5'tir].

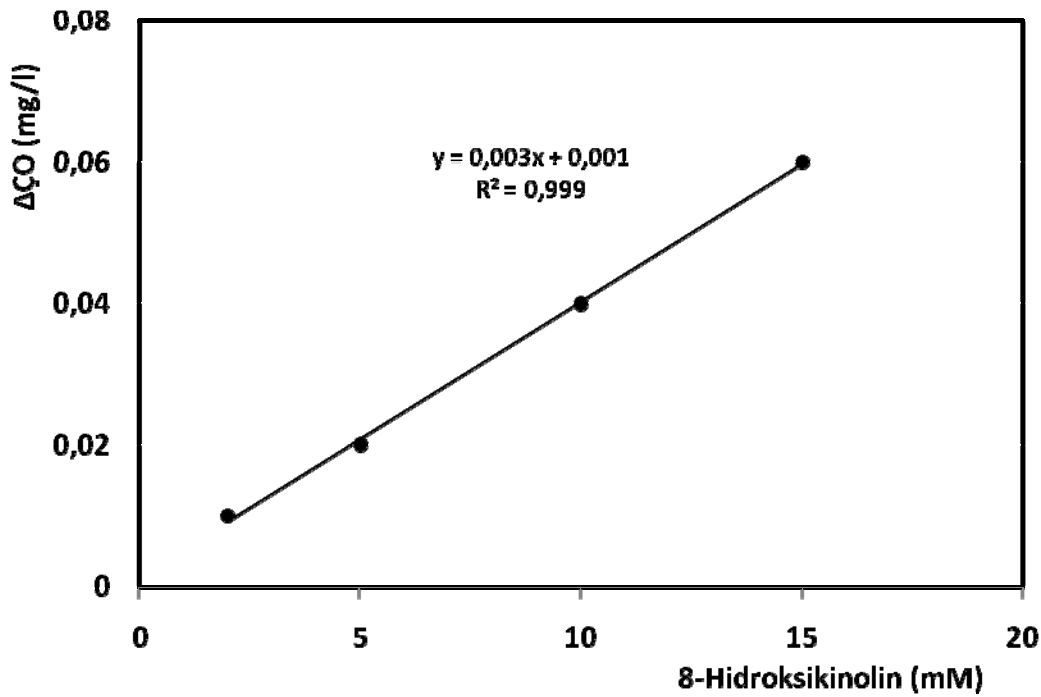
Hazırlanan biyosensör ile yapılan denemeler sonrası 0,5 mM - 5 mM'lık hidrokinon konsantrasyon aralığında doğrusal grafikler elde edildi.

Yapısında 2 fenol grubu içeren bir polifenol olan hidrokinonun 5 mM'lık standardı için alınan biyosensör cevabı yine aynı derişimdeki fenol standardı için alınan cevaba oranla % 120 daha fazladır. Yapısında 2 fenol grubu içerdiği için bu beklenen bir sonuçtur.

### 3.4.8.8-Hidroksikinolin tayin aralığı

Kayıslı dokusu temelli biyosensör kullanılarak optimize edilmiş koşullarda farklı 8-hidroksi kinolin standartları için ölçümler alınmış ve 8-hidroksikinolin için tayin aralığı belirlenmiştir.

Şekil 3.18'de geliştirilen biyosensöre ilişkin 8-hidroksikinolin tayin aralığını gösteren standart grafiği verilmektedir.



Şekil 3.19. Doku temelli biyosensör için 8-hidroksikinolin tayin aralığı. [Sodyum-fosfat tamponu, pH: 8,5; 50 mM, t:37 °C. Tüm biyosensörler için kayıslı miktarı 0,118 g/cm<sup>2</sup>, jelatin miktarı 6,64 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 2,5'tir].

Optimize edilen koşullarda hazırlanan biyosensör ile yapılan denemeler sonrası 2 mM -15 mM'lık 8-hidroksikinolin konsantrasyon aralığında doğrusal grafikler elde edildi.

5 mM'lık fenol ve 8-hidroksikinolin standartları için alınan biyosensör cevapları kıyaslandığında, fenol için alınan yanıt % 100 kabul edildiğinde 8-hidroksikinolin için alınan yanıt sadece % 13'tür. Bunun sebebi benzen halkasına bağlı aromatik piridin yapısından kaynaklanıyor olabilir. Bu yapı enzim için sterik bir engel oluşturduğu gibi, substratın yapısı büyüdüğü için biyoaktif tabakadan difüzyonunda zorlaşmıştır.

#### 4. GENEL DEĞERLENDİRME

Polifenoller, bir çok meyvenin doğal bileşeni olup antioksidanlar olarak görev yaparlar. Özellikle insan vücudundaki çeşitli metabolik yollar sonucu oluşmuş serbest radikalleri süpürme ve ağır metalleri şelatlama açısından oldukça etkilidirler. Polifenollerin parçalanması sonucu oluşan fenolik bileşiklerin çok düşük konsantrasyon seviyelerinde belirlenmesi, onların toksisitesinin verilmesi açısından çok önemlidir. Bu fenolik bileşiklerin çoğu bitki ve hayvanlar üzerinde zehirli etkilere sahip olup, kanserojen ve alerjen özellik gösteren maddelerdir ve akut çevresel problemlere yol açabilirler. Fenolik bileşiklerin bazılarının düşük konsantrasyon seviyelerinde bile, sularla toksisite oluşturarak insan ve suda yaşayan organizmalar için dikkate alınacak değerde bir kirlilik yarattığı belirlenmiştir. Bu nedenle gıda analizleri, çevresel analizler, biyolojik ve medikal çalışmalar açısından bu maddelerin tayinine yönelik duyarlı metodların geliştirilmesi oldukça önemlidir.

Fenolik bileşiklerin belirlenmesinde ki geleneksel metotlar toplam fenoliklerin ölçümüne ya da bazılarının kararma reaksiyonuyla olan ilişkilerinden dolayı, örneğin 1,2- difenoller, ölçümüne dayanmaktadır. Ayırma teknikleri temelli metotlardan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi (GC), kapiler elektroforez ve süperkritik sıvı kromatografisi fenolik bileşiklerin tayini için kullanılmaktadır. Ancak bunlar oldukça zaman alıcı ve pahalı ekipmanları gerektiren sistemlerdir. Biyosensörler bu tip sistemlerle kıyaslandığında, oldukça pratik, çabuk sonuç veren ve pahalı ekipmanlara gerek duymayan sistemlerdir. Biyosensörler uzun depo kararlılığı, substrat spesifikliği gibi konularda birçok avantajlara sahiptir. Tüm laboratuvarlarda kolaylıkla başvurulacak yöntemlerdir. Analizlerin tekrarlanabilirliği oldukça yüksektir. Bunlara ek olarak çoğu, yerinde analize imkan verecek şekilde taşınabilir niteliktedir.

Fenolik bileşiklerin tayinine yönelik biyosensörler genel olarak enzim ve doku biyosensörleri şeklinde tasarlanabilirler. Özellikle ticari enzim preparatlarının yerine, ilgili enzimi yüksek oranda içerdiği bilinen dokuların biyokomponent olarak kullanıldığı doku biyosensörlerinin kullanımıyla hazırlanan sistemler oldukça pratik ve ekonomik tayin yöntemlerini oluşturmaktadır.

Bu tez kapsamında polifenol oksidaz enziminin zengin olan kayısı dokusu kullanılmış ve oksijen elektrodu yüzeyine immobilize edilerek fenolik bileşikler için verdikleri biyosensör cevapları ve tayin aralıkları belirlenmiştir. En iyi cevap veren kayısı doku homojenatı miktarı belirlendi ve bu sistemin optimizasyonu gerçekleştirildi.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde geliştirilen sistemin çoğu laboratuvarında kolaylıkla gerçekleştirilebilecek ölçümleri mümkün kılan pratik ve ekonomik bir sistem olduğu ortadadır. Bu aşamada, hazırlanan kayısı dokusu temelli bu biyosensörle, çoğu fenolik bileşiğin ölçümünün yapılabileceği açıktır. Ancak fenolik bileşikleri bir karışım olarak içeren numulere istenilen fenolik bileşiğin ölçümüne imkan vermemektedir. Bu doku biyosensörü olmanın bir dezavantajı olmayıp, PPO gibi grup spesifikliğine sahip tüm enzimleri içeren ve literatürlerde de yaygın olarak karakterize edilmiş sistemler için ortak bir problemdir. Dolayısıyla, analiz sonuçlarının total fenol yükü olarak verilebileceği analizlerde, herhangi bir dezavantaj bulunmamakla birlikte, ucuz, saflaştırma adımlarının elimine edilmesi ve ticari preparat gereksinimini ortadan kaldırması açısından oldukça pratik bir sistemdir.

Bu çalışmanın ortaya çıkış noktası, öncelikle, PPO enzimini yüksek oranda içeren, stabilitesi ve tekrarlanabilirliği yüksek ölçümleri mümkün kılacak sistemlerin eldesidir ki, ileriye yönelik planlanan ve minyatürize biyoanalitik sistemler ve farklı komposit membranların bir biyobileşeni olarak kayısı dokusunun, çeşitli fenolik bileşiklerin analizinde kullanılabileceği oldukça açıktır.

Fenolik bileşiklerin tayinine yönelik kayısı dokusu temelli bu çalışma daha önce yapılmamış olup tamamen orjinaldir. Kayısı ile ilgili çalışmalar genellikle içeriğinin belirlenmesine yönelik olup kullanım alanlarını gösteren çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu çalışma o açıdan da önemli olup kayısının homojenatı kullanılarak hazırlanmış biyosensör, kayısı çalışmalarına bir başka boyut kazandıracaktır. Ayrıca Malatya yöresi için büyük ticari değere sahip kayısının başka bir alanda kullanımı için önemli bir adımdır.



## 5. KAYNAKLAR

- [1] A. Telefoncu, Biyosensörler, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu (A. Telefoncu, Ed.), Kuşadası,1999.
- [2] C.T. Minh, Biosensors, Chapman & Hall, London, 1993, p. 217.
- [3] T. Scheper, F. Plötz, C. Müller, B. Hitzmann, Sensors as components of integrated analytical systems, **Trends Biotechnology**, 12 (2): (1994) 42-46.
- [4] J.E. Pearson, Analytical aspects of biosensors, **Annals of Clinical Biochemistry**, 37: (2000), 119-145.
- [5] S. Timur, Pestisit tayinine yönelik biyosensör geliştirilmesi ve karakterizasyonu, doktora tezi, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, İzmir, 2001.
- [6] S.K. Sharma, N. Sehgal, A. Kumar, Biomolecules for development of biosensor and their applications. **Current Applied Physics**, 3: (2003), 307-316.
- [7] M.N. Velasco-Garcia, T. Mottram, Biosensor technology addressing agricultreel problems, **Biosytem Engineering**, 84 (1): (2003), 1-12.
- [8] M. Aizawa, G.F. Khan, E. Kobatake, T. Haruyoma, Y. Ikariyama, Interfacial Design and Chemical Sensing, (T.E. Mallouk and D.J. Harrison Ed.), **American Chemical Society**, Washington, 1994.
- [9] E. Dinçkaya, Biyosensörler, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu (A. Telefoncu, Ed.), Kuşadası,1999, 81-142.
- [10] Z. Junhui, C. Hong, Y. Ruifu, DNA based biosensors, **Biotechnology Advances**, 15 (1): (1997), 43-58.
- [11] P. D’Orazio, Biosensors in clinical chemistry, **Clinica Chimica Acta**, 334: (2003), 41-69.
- [12] M.I. Pividori, A. Merkoçi, S. Alegret, Electrochemical genosensor design: immobilization of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods, **Biosensors and Bioelectronics**, 15: (2000) 291-303.
- [13] B.D. Malhotra, A. Chaubey, Biosensors for clinical diagnostics industry, **Sensors and Actuators B**, 91: (2003), 117-127.
- [14] M. Mascini, I. Palchetti, G. Marrazza, DNA electrochemical biosensors, **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, 369: (2001), 15-22.
- [15] A.H. Usulan, İmmunosensörler, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu (A. Telefoncu, Ed.), Kuşadası,1999, 194-205.

- [16] L. Baoxin, Z. Zhujun, J. Yan, Plant tissue-based chemiluminescence flow biosensor for determination of unbound dopamine in rabbit blood with on-line microdialysis sampling, **Biosensors and Bioelectronics**, 17: (2002), 585-589.
- [17] J.S. Sidwell, G.A. Rechnitz, Progress and challenges for biosensors using plant tissue materials, **Biosensors**, 2 (4): 1986, 221-233.
- [18] L. Macholan, Recent progress in developing enzyme and tissue-based membrane electrodes, **Acta-Biotechnol.**, 7 (69): (1987), 547-553.
- [19] J. Wang, N. Naser, Reticulated vitreous carbon-plant tissue composite bioelectrodes, **Analytica Chimica Acta**, 242 (2): 1991, 259-265.
- [20] E. Sarı, Katalaz enzim temelli biyosensör hazırlanması ve fenolik bileşiklerin tayininde kullanılması, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Diploma tezi, 2003.
- [21] A. Yıldız, Elektrokimyasal Biyosensörler, Biyosensörler, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu (A. Telefoncu, Ed.), Kuşadası, 1999, s 42.
- [22] S. Erdoğan, Çeşitli kayısı örneklerinde bakır spesiasyonu (türlendirme), İnönü Üniversitesi, Doktora tezi, 2008, 36-38.
- [23] I.C. Arts, P.C. Hollman, Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies, **American Journal of Clinical Nutrition**, 81 (1): (2005), p: 317-325.
- [24] A. Escarpa, M.C. Gonzalez, An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods, **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, 31 (2): (2001), 57-19.
- [25] E. Haslam, Practical Polyphenols: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action, University Press, Cambridge, 1998.
- [26] E. Haslam, T.H. Lilley, Natural astringency in foodstuffs- A molecular interpretation. **CRC Critical Reviews in Food Science Nutrition**, 27: (1988), 1-40.
- [27] L. Bravo, Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, **Nutrition Reviews**, 56: (1998), 317-333.
- [28] N. Masque, E. Pocurull, R.M. Marce, F. Borrull, Determination of eleven priority EPA phenolics at ng L<sup>-1</sup> levels by on-line solid-phase extraction and liquid chromatography with UV and electrochemical detection. **Chromatographia**, 47: (1998), 176-182.
- [29] J.M. MCGinnis, W.H. Foege, Actual causes of death in the united states, **Journal of the American Medical Association**, 270: (1993), 2207-2212.

- [30] C. Morang, V. Crespy, C. Manach, C. Besson, C. Remesy., Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties, **American Journal of Physiology**, 275: (1998), 212-219.
- [31] A. Mısırlı, R. Gülcan, A. Tanrıseven, The relationship between the phenolic compounds and the progress of pormangy in some apricot varieties. X<sup>th</sup> international symposium on apricot culture, İzmir, Sep. 20-24, (1993), 303-308.
- [32] C. Garcia Viguera, P. Zafrilla, F.A. Tomas-Barberan, Determination of authenticity of fruit jams by HPLC analysis of aanthocyanins, **Journal of the Science and Food Agriculture**, 73: (1997), 207-213.
- [33] S.T. Savova, F. Riborova, M. Gerova, (+)-Catechin and (-) epicatechin in Bulgarian fruits, **Journal of Food Composition and Analysis**, 18: (2005), 691-698.
- [34] V.D. Uzelag, J. Pospisil, B. Levaj, K. Delonga, The study of phenolic profiles of raw apricots and apples and their purees by HPLC for the evaluation of apricot nectars and jams authenticity, **Food Chemistry**, 91: (2005), 373-383.
- [35] V.D. Uzelag, K. Delonga, B. Levaj, S. Djakovic, J. Pospisil, Phenolic profiles of raw apricots, pumpkins, and their purees in the evaluation of apricot nectar and jam authenticity, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 53: (2005), 4836-4842.
- [36] A. Mısırlı, A. Tanrıseven, R. Gülcan, Determination of phenolic compounds of some almond cultigens, First International Congress on Almond, **Acta Horticultural**, N:373, 185-192.
- [37] A. Mısırlı, A. Tanrıseven, R. Gülcan, Determination of phenolic compounds of different organs and tissues in some apricot varieties. **Acta Horticultural**, 384: (1995), 345-350.
- [38] F. Imad Kanaze, C. Gabrieli, E. Kokkalou, M. Georgarakis, Simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic method fort he determination of diasmin, hesperidin and naringin in different citrus fruit juices and pharmaceutical formulations, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 33: (2003), 243-249.
- [39] S. Topçu, M.K. Sezgintürk, E. Dinçkaya, Evaluation of a new biosensor-based mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate: investigation of certain phenolic compounds and some inhibitor effects, **Biosensors and Bioelectronics**, 20: (2004), 592–597.

- [40] A. Gutés, F. Céspedes, S. Alegret, M. Del Vale, Determination of phenolic compounds by a polyphenol oxidase amperometric biosensor and artificial neural network analysis, **Biosensors and Bioelectronics**, 20: (2005), 1668-1673.
- [41] C. Nergiz, K. Unal, Effect of method of extraction on the total polyphenol, 1,2-diphenol content and stability of virgin olive oil, **Journal of the Science and Food Agriculture**, 56: (1991) 79–84.
- [42] O. Fiehn, M. Jekel, Analysis of phenolic compounds in industrial wastewater with high-performance liquid chromatography and post-column reaction detection, **Journal of Chromatography A**, 769 (2), (1997), 189–200.
- [43] E. Pocurull, R.M. Marce, F. Borrull, Determination of phenolic compounds in natural waters by liquid chromatography with ultraviolet and electrochemical detection after on-line trace enrichment, **Journal of Chromatography A**, 738 (1): (1996), 1–9.
- [44] M.A. Crespin, E. Ballesteros, M. Gallego, M. Valcarcel, Trace enrichment of phenols by on-line solid-phase extraction and gas chromatographic determination, **Journal of Chromatography A**, 757: (1997), 165–172.
- [45] H. Kishi, H. Arimoto, T. Fujii, Analysis of alcohols and phenols with a newly designed gas chromatographic detector, **Analytical Chemistry**, 70: (1998) 3488–3492.
- [46] D. Martinez, E. Pocurull, R.M. Marce, F. Borrull, M. Calull, Separation of eleven priority phenols by capillary zone electrophoresis with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, 734 (2): (1996) 367–373.
- [47] S. Morales, R. Cela, Highly selective and efficient determination of US Environmental Protection Agency priority phenols employing solid-phase extraction and non-aqueous capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, 896: (2000) ,95–104.
- [48] S.F. Dressman, A.M. Simeone, A.C. Michael, Supercritical-fluid chromatography with electrochemical detection of phenols and polyaromatic hydrocarbons, **Anal. Chem.** 68 (18): (1996) 3121–3127.
- [49] APHA, Standard Methods for Examination of Water and Waste-water, 17th ed. American Public Health Association 5550, 1989, New York.
- [50] J.D. Box, Investigation of the Folin–Ciocalteu phenol reagent for the determination of phenolic substances in natural waters, **Water Research**, 17: (1983) 511–525.

- [51] D. Odacı, Pirogallol Tayinine Yönelik Doku Biyosensörü Hazırlanması Ve Karakterizasyonu, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Yüksek lisans tezi, 2004.
- [52] E. Akyılmaz, Preparation of ascorbate oxidase enzyme electrode and its usage for L-ascorbic acid determination, Master of thesis, E.Ü.Faculty of science, 1996, 11p.
- [53] M. Trojanowicz, Determination of pesticides using electrochemical enzymatic biosensors, **Electroanalysis**, 14: (2002), 1311–1328.
- [54] S.E. Stanca, I.C. Popescu, L. Oniciu, Biosensors for phenol derivatives using biochemical signal amplification, **Talanta**, 61: (2003), 501–507.
- [55] B. Serra, S. Jimenez, M.L. Mena, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, Composite electrochemical biosensors: a comparison of three different electrodes matrices for the construction of amperometric tyrosinase biosensors, **Biosensors and Bioelectronics**, 17: (2002), 217–226.
- [56] P. Dantoni, S.H.P. Serrano, A.M.O. Brett, L.G.R. Gutz, Flow-injection determination of catechol with a new tyrosinase/DNA biosensor, **Analytical Chimica Acta**, 366: (1998), 137–145.
- [57] C. Nistor, J. Emneus, L. Gorton, A. Ciucu, Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds, **Analytical Chimica Acta**, 387: (1999), 309–326.
- [58] B. Fuhrmann, U. Spohn, An enzymatic amplification flow injection analysis (FIA) system for the sensitive determination of phenol, **Biosensors and Bioelectronics**, 13: (1998.), 895–902.
- [59] L.D. Mello, L.T. Kubota, Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries, **Food Chemistry** 77: (2002), 237-256.
- [60] Ş. Şimşek, Production of commercially suitable pectin methylesterase and polyphenol oxidase from agro-industrial wastes, İzmir Institute of Technology, Yüksek lisans tezi, İzmir, 2004.
- [61] N. Duran, E. Esposito, Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compound in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, 28: (2000), 83-99.
- [62] B. Cemeroğlu, F. Karadeniz, Meyve Suyu Üretim Teknolojisi, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara, 2001, 41-45.

- [63] B. Cemeroglu, A. Yemenicioğlu, M. Özkan, Meyve ve Sebzelerin Bileşimi Soğukta Depolanmaları, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara, 2001, 128-133, 139-140.
- [64] J. Davidek, J. Velisek, J. Pokorny Chemical Changes During Food Processing, Czechoslovak Medical Press, Czechoslovakia, 1990, p. 307-308.
- [65] S. Burton, Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review, **Catalysis today**, 22: (1994), 459-487.
- [66] J.J. Nicolas, F.C. Richard-Forget, P.M. Goupy, M. Amiot, S.Y. Aubert, Enzymatic browning reactions in apple and apple products **CRC Critical Reviews of Food Science and Nutrition**, 34 (2): (1994), 109-157.
- [67] D. Strack, W. Schliemann, Biofunctional polyphenol oxidases: Novel functions in plant pigment biosynthesis, **Angewandte Chemie International Edition**, 20: (2001), 3791-3794.
- [68] L. Vamos-Vigyazo, Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables, **CRC Critical Reviews of Food Science and Nutrition**, 15: (1981), 49-127.
- [69] A. Yemenicioğlu, B. Cemeroglu, Consistency of Polyphenol Oxidase (PPO) Thermostability in Ripening Apricots (*Prunus armeniaca* L.): Evidence for the Presence of Thermostable PPO Forming and Destabilizing Mechanisms in Apricots, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 51: (2003), 2371-2379.
- [70] T. Chevalier, D. Rigal, A. Mbe'guie, F. Gauillard, F. Richard-Forget, B.R. Fils-Lycaon, Molecular Cloning and Characterization of Apricot Fruit Polyphenol Oxidase, **Plant Physiology**, 119: (1999), 1261-1269.
- [71] J.S. Sidwell, G.A. Rechnitz, Bananatrode-an electrochemical sensor, **Biotechnol Lea**, 7: (1985), 419.
- [72] A. Navaratne, M.S. Lin, G.A. Rechnitz, Eggplant-based bioamperometric sensor for the detection of catechol. **Analytica Chimica Acta**, 237: 107, (1990).
- [73] F. Mazzei, F. Botre, M. Lanzi, G. Lorenti, F. Porcelli, C. Botre, Plant metabolism as an analytical tool. Some applications of plant tissue electrodes for the selective determination of catecholamines, **Sensors and Actuators**, 7: (1992), 427.
- [74] C. Botre, F. Botre, M. Lanzi, G. Lorenti, F. Mazzei, **Analytica Chimica Acta**, 255: (1991), 59.
- [75] T.C. Chart, Y. Chan, Sensing characteristics of an immobilized apple powder enzymic sensor. **Sensors and Actuators**, 17: (1994).

- [76] C. Yang, S. Fujita, K. Kohno, A. Kusubayashi, M. Ashrafuzzaman, N. Hayashi, Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) peel, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 49: (2001), 1446-1449.
- [77] C. Yang, S. Fujita, K. Kohno, M. Ashrafuzzaman, N. Nakamura, N. Hayashi, Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 48: (2000), 2732-2735.
- [78] T. Nagai, N. Suzuki, Partial purification of polyphenol oxidase from chinese cabbage (*Brassica rapa* L), **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 49: (2001), 3922-3926.
- [79] S. Fujita, N. bin Saari, M. Maegawa, T. Tetsuka, N. Hyashi, T. Tono, Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.), **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 43: (1995), 1138-1142.
- [80] O. Arslan, A. Temur, İ. Tozlu, Polyphenol oxidase from malatya apricot (*Prunus armeniaca* L.), **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 46: (1998), 1239-1241.
- [81] S.C. Garcia, A.M. Buzaleh, Polyphenoloxidase: An enzyme widespread in fruits, **Biochemical Education**, 22 (3): (1994), 152-153.
- [82] M. Oktay, İ. Küfrevioğlu, İ. Kocaçalışkan, H. Şakiroğlu, Polyphenol oxidase from Amasya apple, **Journal of Food Science**, 60: (1995), 494-496.
- [83] T. Aydemir, Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, **Food Chemistry**, 87: (2004), 59-67.
- [84] C.W.B. Bachem, G.J. Speckmann, P.C.G. Van der Linde, F.T.M. Verheggen, M.D. Hunt, J.C. Steffens, M. Zabeau, Antisense expression of polyphenol oxidase genes inhibits enzymatic browning in potato tubers, **Bio/Technology**, 12: (1994), 1101-1105.
- [85] C. Coetzer, D. Corsini, S. Love, J. Pavek, N. Tumer, Control of enzymatic browning in potato (*Solanum tuberosum* L.) by sense and antisense RNA from tomato polyphenol oxidase, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 49: (2001), 652-657.
- [86] L. Li, J.C. Steffens, Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic plants results in enhanced bacterial disease resistance, **Planta**, 215: (2002), 239-247.

- [87] F.A. Thomas-Berberan, J.C. Espin, Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables, **Journal of the Science of Food Agriculture**, 81: (2001), 853-876.
- [88] C.R. Thalmann, T. Lötzbeyer, Enzymatic cross-linking of proteins with tyrosinase, **European Food Research and Technology**, 214: (2002), 276-281.
- [89] V. Micard, J.F. Thibault, Oxidative gelation of sugar-beet pectins: use of laccases and hydration properties of the cross-linked pectins, **Carbohydrate Polymers**, 39: (1999), 265-273.
- [90] T. Rigdway, G. Tucker, H. Wiseman, Novel biocentrations for the production of designer antioxidant and colourant flavanoids using polyphenol oxidases, **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, 14: (1997), 165-188.
- [91] T.J. Rigdway, G.A. Tucker, Procedure for the partial purification of apple leaf polyphenol oxidase suitable for commercial application, **Enzyme and Microbial Technology**, 24: (1999), 225-231.
- [92] D. Strack, W. Schliemann, Biofunctional polyphenol oxidases: Novel functions in plant pigment biosynthesis, **Angewandte Chemie International Edition**, 20: (2001), 3791-3794.
- [93] J.C. Espin, C. Soler-Rivas, E. Cantos, F.A. Tomas-Barberan, H.J. Wichers, Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 49: (2001), 1187-1193.
- [94] R.C. Minussi, G.M. Pastore, N. Duran, Potential applications of laccase in the food industry, **Trends in Food Science and Technology**, 13: (2002), 205-216.
- [95] B.M. Asma, Kayısı yetiştiriciliği, İnönü Üniversitesi, Evin matbası, Malatya, 2000, 1-65.
- [96] B. Cemeroglu, J. Acar, Fruit and vegetable processing technology, **Turkish Association of Food Technologists**, Ankara, 1996, 508.
- [97] I. Cilingir, M. Güner, E. Dursun, Important technical properties such as surface area, projected area, mass, dimensions some apricot varieties cultivated in Malatya region and determination of relations between these properties, Ankara University, Faculty of Agriculture, Ankara, 1239.
- [98] S. Joshi, R. K. Srivastava, D.N. Dhar, The chemistry of prunus armeniaca, **British Food Journal**, 88: (1986), 74-78.



- [99] B. Cemeroğlu, A. Yemencioğlu, M. Özkan, Meyve ve sebzelerin bileşimi, soğukta depolanmaları, Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi, Cilt 1, Gıda teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara, 2001, 189-202.
- [100] F. Simon, J. Perez, T. Hernandez, İmportance of phenolic compounds for the characterization of fruit nectars, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 40: (1992), 1531-1535.
- [101] B. Cemeroğlu, A. Yemencioğlu, M. Özkan, Meyve ve sebzelerin bileşimi soğukta depolanmaları, Gıda Teknolojisi Derneği, Ankara, 2001.
- [102] P.J. Rose, H.F. Mark, N.M. Bikales, C.G. Overberger, G. Menges, J.L. Kroschwitz, Encyclopedia of polymer science and engineering, 2nd. ed., vol 7, Wiley Interscience, New-York 1987, s 89.
- [103] V. Scardi, Immobilization of enzymes and microbial cells in gelatin, **Methods in Enzymology**, 135: (1987), 293-294.
- [104] E. Esposito, R. Cortesi, C. Nastrazzi, Gelatin microspheres: influence of preparation parameters and thermal traetment on chemico-physical and biopharmaceutical properties, **Biomaterials**, 20: (1995), 2009-2020.
- [105] A. Bigi, M. Borghi, G. Lojazzi, A.M. Fichera, S. Panzavolta, N. Roveri, Structural and mechanical properties of crosslinked drawn gelatin films, **Journal of Thermal Analysis**, 61: (2000), 451-459.
- [106] G.G. Guilbault, J.M. Kauffmann, Enzyme-based electrodes as analytical tools, **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 9: (1987), 95-113.
- [107] H.W. Scouten, J.H.T. Loung, R.S. Brown, Enzyme or protein immobilization techniques for application in biosensor design, **Trends in Biotechnology**, 13: (1995), 178-185.
- [108] E. Dinçkaya, A. Telefoncu, Enzyme electrode based on oxalate oxidase immobilized in gelatin for specific determination of oxalate, **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, 30: (1993), 282-284.
- [109] E. Dinçkaya, E. Akyılmaz, M.K. Sezgintürk, A biosensors based on urate oxidase-peroxidase coupled enzyme system for uric acid determination in urine, **Talanta**, 61: (2003), 73-79.
- [110] N. Arslan, Meyvelerin bozulmasını önleyici bir katkı: şeker pancarı küspesi, *Bilim-Teknik Dergisi*, 30 Mart 2005, s.6

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı : Ali ERDOĞAN  
Doğum Yeri ve Tarihi : Doğanşehir / 20.07.1981  
E-mail : aerdogan@inonu.edu.tr  
Adress : İnönü Üniversitesi  
Fen Edebiyat Fakültesi  
Kimya Bölümü  
44280, MALATYA

### EĞİTİM BİLGİLERİ

Yüksek lisans : İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya  
Bölümü (2005-....)  
Üniversite : Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü  
(1999-2004)  
Lise : Malatya Lisesi (1995-1998)

### AKADEMİK GÖREVLERİ

Araştırma Görevlisi : İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya  
Bölümü (2006- ....)

### ULUSLARARASI DERGİLERDE YAYINLANMIŞ MAKALELERİ

- Akyılmaz E., Erdogan A., Ozturk R., Yasa I. Sensitive determination of L-Lysine with a new amperometric microbial biosensor based on *S.cerevisiae* yeast cells, *Biosensors & Bioelectronics*, 22:6, 1055-1060, 2007
- Ates B, Dogru MI, Gul M, Erdogan A, Dogru AK, Yilmaz I, Yurekli M, Esrefoglu M. Protective role of caffeic acid phenethyl ester in the liver of rats exposed to cold stres, *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 20:3, 283-289, 2006