



GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FENOLLERE DUYARLI POTANSİYOMETRİK MİKRO BİYOSENSÖRLER
VE UYGULAMALAR

BAHAR ÇİL

OCAK 2014

GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FENOLLERE DUYARLI POTANSİYOMETRİK MİKRO BİYOSENSÖRLER
VE UYGULAMALAR

BAHAR ÇİL

OCAK 2014

Fen Bilimleri Enstitü Müdürünün Onayı.

.../.../.....

Doç. Dr. Kültiğın ÇAVUŞOĞLU

Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak Kimya Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Murat TAŞ

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumuzu ve Yüksek Lisans tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarız.

Yrd. Doç. Dr. Murat YOLCU

Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. M. Serkan SOYLU

Yrd. Doç. Dr. Saim TOPÇU

Yrd. Doç. Dr. Murat YOLCU

ÖZET

FENOLLERE DUYARLI POTANSİYOMETRİK MİKRO BİYOSENSÖRLER VE UYGULAMALAR

ÇİL, Bahar

Giresun Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Murat YOLCU

OCAK 2014, 77 sayfa

Çalışma kapsamında bütünüyle katı-hal kompozit pH sensörlerin yüzeyine polifenol oksidaz enziminin immobilizasyonu ile fenollere duyarlı mikro biyosensörler hazırlandı. Hazırlanan biyosensörlerin potansiyometrik performansları tasarım ve yazılımı laboratuvarımızda gerçekleştirilen bilgisayarlı ölçüm sisteminde araştırıldı. Hazırlanan fenol duyarlı mikro biyosensörler yaygın fenolik türlere (kateşol, fenol, m-krezol, p-krezol, o-krezol) karşı geniş bir doğrusal aralıkta (yaklaşık 1.10^{-2} – 1.10^{-5} mol/L) oldukça duyarlı iken, cevap zamanları kısa (<15 s) ve kullanım ömürleri uzundur (3-4 hafta). Hazırlanan fenol duyarlı mikro biyosensörler siyah çay numunesinde kateşol analizi için başarı ile uygulandı. Aynı numune için UV spektroskopik analiz gerçekleştirildi. Potansiyometrik ve spektroskopik yöntemler için istatistiksel (f- testi) testi uygulandı.

Anahtar Kelimeler : Fenol Duyarlı Mikro Biyosensör, Potansiyometri, pH Sensör, Polifenol Oksidaz, İyon Seçici Elektrot

ABSTRACT

PHENOLS SENSITIVE POTENTIOMETRIC MICRO BIOSENSORS AND APPLICATIONS

ÇİL, Bahar

University of Giresun

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry, Master Thesis

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Murat YOLCU

JANUARY 2014, 77 pages

In this work all solid-state phenols sensitive micro biosensors were prepared by polyphenol oxidase immobilization onto surface of all solid-state composite pH sensor. The potentiometric performance characteristics were examined with a computerized measuring system which hardware and software were manufactured in our research laboratory. All electrodes almost exhibited sensitive response in linear range ($\sim 1.10^{-2} - 1.10^{-5}$ mol/L), short response times (< 15 s), long life times (3-4 week). Prepared phenol sensitive biosensors were successfully applied both potentiometric and UV spectroscopic determination for catechol in black tea sample. Statistical f- test was applied for method sensitivity between potentiometric and spectroscopic data.

Keywords : Phenols Sensitive Micro Biosensor, Potentiometry, pH Sensor, Polyphenol Oxidase, Ion Selective Electrode.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, planlanması ve tez çalışmalarım sırasında göstermiş olduğu ilgi ve yardımlarından dolayı, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her konuda anlayışlı olan, çok değerli danışman hocam Sayın **Yrd. Doç. Dr. Murat YOLCU**'ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan fikir ve tecrübelerinden yararlandığımız değerli hocam Sayın **Yrd. Doç. Dr. Zuhâl YOLCU**'ya, laboratuvarından teknik desteğini hiç esirgemeyen değerli hocam Sayın **Yrd. Doç. Dr. Saim TOPÇU**'ya, değerli bilgi, tecrübe ve yardımlarını gördüğüm Kimya Bölümü'nden diğer hocalarıma çok teşekkür ederim.

Laboratuvar ortamını daha keyifli hale getiren ve her zaman yanımda olan, aynı laboratuvar ortamını paylaştığım arkadaşlarım **Esra ŞENGÜN**, **Nurşen DERE**, **Nesime KARACA**, **Gizem GÜREL**, **Ümit ER**, **Ayşe Nur YILMAZ**, **Gülcan ÜLGÜ** ve **Ekrem ÖZDEMİR**'e teşekkürlerimi sunarım, ayrıca uzakta olsalarda manevi olarak her zaman yanımda olan can dostlarıma çok teşekkür ederim.

Her zaman güzel bir aileye sahip olduğum için ne kadar şanslı olduğumu hissettiren ve hayatım boyunca attığım her adımda maddi ve manevi desteğini esirgemeyen Sevgili annem **Fatma ÇİL**'e her zaman olduğu gibi beni her konuda destekleyen, Yüksek Lisans yapmama beni teşvik eden babam **Ali ÇİL**'e ve ablam **Nilgün CANTÜRK**'e, kardeşlerim **Zeynep ÇİL**'e ve **Sümeyye ÇİL**'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım, ayrıca hayatımın her döneminde yanımda olan nişanlım **Ömer Yenal DEMİRTAŞ**'a çok teşekkür ederim.

Tez Çalışmasına **FEN-BAP-C-220413-12 Nolu Araştırma Projesi** kapsamında yapılan finansal desteklerden dolayı **Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi**'ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
SİMGELER DİZİNİ.....	XII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Biyosensörler ve Çalışma Prensipleri	1
1.2. Biyosensörlerin Tarihi	2
1.3. Biyosensörlerin Bileşenleri.....	3
1.3.1. Biyoajanlar (Biyoaktif Tabaka)	3
1.3.2. Sinyal Çevirici (Transduser).....	5
1.4. İdeal Bir Biyosensörde Olması Gereken Özellikler	5
1.5. Biyolojik Materyallerin İmmobilizasyonu.....	7
1.5.1. Taşıyıcıya Bağlama Yöntemi.....	8
1.5.1.1. Fiziksel Adsorpsiyon	9
1.5.1.2. İyonik Bağlanma.....	10
1.5.1.3. Kovalent Bağlanma.....	10
1.5.2. Çapraz Bağlama.....	12
1.5.3. Hapsetme Yöntemi	14
1.5.3.1. Kafes Tipi (Polimer Matriks İçine Tutuklama)	14
1.5.3.2. Mikrokapsül Tipi	15
1.6. İmmobilize Enzimlerin Doğal (Serbest) Enzimlere Göre Üstünlükleri.....	15
1.7. İletim ve Ölçüm Sistemlerine Göre Biyosensörlerin Sınıflandırılması	16
1.7.1. Elektrokimyasal Esaslı Biyosensörler	16

1.7.1.1. Amperometri Esaslı Biyosensörler	16
1.7.1.2. Potansiyometri Temelli Biyosensörler.....	18
1.7.1.3. Yarı İletkenleri Esas Alan Biyosensörler.....	21
1.7.2. Optik Esaslı Biyosensörler.....	21
1.7.3. Kalorimetri Esaslı Biyosensörler	22
1.7.4. Piezoelektrik Esaslı Biyosensörler.....	23
1.8. Biyosensörlerin Uygulama Alanları	24
1.9. Polifenol Oksidazlar	26
1.9.1. Polifenol Oksidaz Enzimlerinin Keşfi	28
1.9.2. Fenolik Bileşiklerin Tayin Yöntemleri	29
1.9.3. Bitkilerde Doğal Olarak Bulunan Fenolik Maddeler.....	32
1.9.4. Fenolik Bileşiklerin Tayin Edilmelerinin Önemi	33
1.10. Potansiyometri	34
1.11. Potansiyometrik Tayin İlkesi	35
1.12. Referans Elektrotlar	37
1.12.1. Standart Hidrojen Elektrodu	37
1.12.2. Kalomel Elektrot.....	38
1.12.3. Gümüş/Gümüş Klorür Elektrot.....	38
1.13. İyon-Seçici Elektrotlar	39
1.13.1. İyon-Seçici Elektrotların Sınıflandırılması.....	39
1.13.1.1. Sıvı-Membran İyon-Seçici Elektrotlar.....	39
1.13.2. İyon-Seçici Elektrotların Performansına Etki Eden Faktörler	41
1.13.2.1. Cevap Zamanı	41
1.13.2.2. Tayin Limiti	42
1.13.2.3. Seçicilik	43
1.13.3. İyon-Seçici Elektrotların Uygulamaları	44
1.13.3.1. Doğrudan Ölçümler	44

1.13.3.2. Potansiyometrik Titrasyonların Dönüm Noktalarının Tayini	45
1.13.3.3. İyon-Seçici Elektrotların Hareketli Ortamlarda Kullanılması	46
1.14. Çalışmanın Amacı.....	46
2. MATERYAL VE METOT.....	50
2.1. Materyal	50
2.1.1. Kimyasallar	50
2.1.2. Cihaz ve Ekipmanlar.....	50
2.2. Metot.....	50
2.2.1. Çalışma Yöntemi	50
2.2.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	51
2.2.3. PVC- NH ₂ Sentezi	51
2.2.4. Mikro Katı-Hal Kompozit pH Sensörlerin Hazırlanması	51
2.2.5. Fenollere Duyarlı Mikro Biyosensörlerin Hazırlanması	52
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	54
3.1. pH Sensörlerin Potansiyometrik Davranışları	54
3.1.1. Quinhidron Temelli pH-1 Sensörün Potansiyometrik Davranışı.....	54
3.1.2. PVC-NH ₂ Temelli pH-2 Sensörün Potansiyometrik Davranışı	55
3.1.3. PVC-NH ₂ Temelli pH-3 Sensörün Potansiyometrik Davranışı	56
3.1.4. Cam Elektrodun Potansiyometrik Davranışı	57
3.2. Fenol Duyarlı Mikro Biyosensörün Cevabına Etki Eden Parametrelerin Optimizasyonu	58
3.2.1. pH Etkisi	58
3.2.2. Tampon Derişiminin Etkisi.....	59
3.2.3. Sıcaklık Etkisi	60
3.3. Fenol Duyarlı Mikro Biyosensörlerin Potansiyometrik Davranışı	61
3.3.1. Quinhidron Temelli Fenol Duyarlı Mikro Biyosensörün (Biyosensör A) Potansiyometrik Davranışı.....	61

3.3.2. PVC-NH ₂ Temelli Fenol Duyarlı Mikro Biyosensörün (Biyosensör B) Potansiyometrik Davranışı.....	62
3.3.3. PVC-NH ₂ Temelli Fenol Duyarlı Mikro Biyosensörün (Biyosensör C) Potansiyometrik Davranışı.....	63
3.4. Fenol Duyarlı Mikro Biyosensörün Diğer Fenolik Bileşiklere Duyarlılığı.....	66
3.5. Fenollere Duyarlı Mikro Biyosensör İle Gerçek Numune Analizi.....	67
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	69
5. KAYNAKLAR	70
6. ÖZGEÇMİŞ	77



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1 Biyoafinite ve biyokatalitik ajanlar ve bunlarla tayin edilebilen analitler.....	4
Tablo 1.2 İmmobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması.....	8
Tablo 1.3 İletim ve ölçüm sistemlerine göre biyosensörlerin sınıflandırılması.....	16
Tablo 2.1 Mikro katı-hal pH sensörler için kullanılan kompozit oranları	52
Tablo 2.2 Hazırlanan fenol duyarlı mikro biyosensörlerin içerikleri.....	53
Tablo 3.1 pH sensörlerin performans karakteristikleri	58
Tablo 3.2 Fenol duyarlı mikro biyosensörlerin performans karakteristikleri	65
Tablo 3.3 Siyah çay numunesinde bulunan kateşol miktarları	68



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Enzimlerin kovalent bağlama ile immobilizasyonunda bağ oluşumuna katılan amino asitlerin reaktif grupları.....	12
Çizelge 1.2 Bazı bifonksiyonel reaktiflerin kimyasal formülleri	13



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Biyosensörlerin çalışma prensibi.....	2
Şekil 1.2	Biyosensörün şematik gösterimi	2
Şekil 1.3	Clark'ın enzim elektrodu.....	3
Şekil 1.4	Biyoajan olarak kullanılan enzim kaynakları	4
Şekil 1.5	Sinyal iletilicilerde gerçekleşen değişimler ve ölçüm cihazları	5
Şekil 1.6	Taşıyıcıya bağlama yönteminin şematik gösterimi	9
Şekil 1.7	Fiziksel adsorpsiyonun şematik gösterimi	10
Şekil 1.8	Kovalent bağlamanın şematik gösterimi	11
Şekil 1.9	Çapraz bağlamanın şematik gösterimi	12
Şekil 1.10	Kafes tipi tutuklama yönteminin şematik gösterimi.....	15
Şekil 1.11	Enzimin bir kapsül içerisinde tutuklanması	15
Şekil 1.12	Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi	17
Şekil 1.13	Potansiyometrik biyosensörlerin şematik gösterimi.....	18
Şekil 1.14	Enzim alan etki transistörü	21
Şekil 1.15	Optik esaslı biyosensörlerin şematik gösterimi.....	22
Şekil 1.16	Kalorimetri esaslı biyosensörlerin şematik gösterimi	23
Şekil 1.17	Piezoelektrik esaslı biyosensörlerin şematik gösterimi.....	24
Şekil 1.18	Polifenol oksidaz enziminin 3 boyutlu yapısı ve aktif merkezi	27
Şekil 1.19	Potansiyometrenin çalışma prensibinin şematik olarak gösterimi	34
Şekil 1.20	Bilgisayar kontrollü potansiyometrik ölçüm sistemi.....	35
Şekil 1.21	o-fenantrolin'in yapısı	40
Şekil 1.22	Potasyum tetrakis (p-klorofenil) borat'ın yapısı	40
Şekil 1.23	Bazı lityum iyonoforların yapısı.....	41
Şekil 1.24	IUPAC'a göre cevap zamanı	42
Şekil 1.25	IUPAC'a göre tayin limiti	43
Şekil 1.26	Basit bir kalibrasyon grafiği	45
Şekil 1.27	Hareketli ortamda ölçüm sistemi.....	46
Şekil 2.1	PFO immobilize edilmiş fenol duyarlı biyosensörün genel yapısı	53
Şekil 3.1	Quinhidron temelli pH-1 sensörün potansiyometrik davranışı	54
Şekil 3.2	Quinhidron temelli pH-1 sensöre ait kalibrasyon grafiği	54

Şekil 3.3 PVC-NH ₂ temelli pH-2 sensörün potansiyometrik davranışı	55
Şekil 3.4 PVC-NH ₂ temelli pH-2 sensöre ait kalibrasyon grafiği	55
Şekil 3.5 PVC-NH ₂ temelli pH-3 sensörün potansiyometrik davranışı	56
Şekil 3.6 PVC-NH ₂ temelli pH-3 sensöre ait kalibrasyon grafiği	57
Şekil 3.7 Cam elektrodun potansiyometrik davranışı	57
Şekil 3.8 Cam elektrota ait kalibrasyon grafiği	58
Şekil 3.9 Fenol duyarlı mikro biyosensörün cevabına pH'nın etkisi	59
Şekil 3.10 Fenol duyarlı biyosensörün cevabına tampon derişiminin etkisi	60
Şekil 3.11 Fenol duyar biyosensörün cevabına sıcaklığın etkisi	61
Şekil 3.12 Biyosensör A'nın kateşol çözeltilerine karşı potansiyometrik davranışı	62
Şekil 3.13 Biyosensör A'nın ait kateşol çözeltilerinde kalibrasyon grafiği	62
Şekil 3.14 Biyosensör B'nin kateşol çözeltilerine karşı potansiyometrik davranışı	63
Şekil 3.15 Biyosensör B'nin kateşol çözeltilerinde kalibrasyon grafiği	63
Şekil 3.16 Biyosensör C'nin kateşol çözeltilerine karşı potansiyometrik davranışı	64
Şekil 3.17 Biyosensör C'nin kateşol çözeltilerinde kalibrasyon grafiği	64
Şekil 3.18 Biyosensör B ve pH-1 sensörlerin kateşol için kalibrasyon grafikleri	66
Şekil 3.19 Fenol duyarlı biyosensörün diğfer fenolik bileşiklere karşı cevabı	67

SİMGELER DİZİNİ

M veya mol/L	: 1 litre çözeltildeki maddenin mol miktarını ifade eder.
mg/L	: 1 litre çözeltildeki maddenin miligram miktarını ifade eder.
mV	: Milivolt
mM	: Milimolar
V	: Volt

KISALTMALAR

CZE	: Kapiler Bölge Elektroforezi
DOS	: Dioktil sebetat (Bis 2-etilhegzilsebetat)
ENFET	: Enzim alan etki transistörleri
EMK	: Elektrostatik motor kuvveti
ISE	: İyon seçici elektrot
ISFET	: İyon-seçici alan etki transistörleri
IUPAC	: Uluslararası uygulamalı kimya birliği
KTpCIPB	: Potasyumtetrakis(p-klorofenil)borat
MOSFET	: Metal oksit yarı iletken alan etki transistörleri
NPOE	: o-Nitrofeniloktiletler
PVC	: Polivinil klorür
PVC-NH ₂	: Aminlenmiş polivinil klorür
PFO	: Polifenol oksidaz
SHE	: Standart hidrojen elektrodu
TNT	: Trinitrotoluen
THF	: Tetrahidrofur

1. GİRİŞ

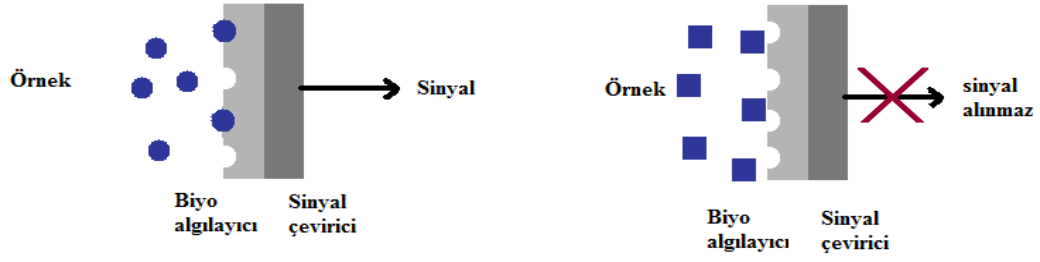
Biyosensörler; biyoloji, kimya, biyokimya, mühendislik gibi pek çok bilim alanının bilgi birikiminden yararlanılarak biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirilmesi sonucu geliştirilen biyoanalitik cihazlar olarak bilinmektedir. Son yıllarda bilim ve teknolojiye hızlı gelişmeler biyosensörler kavram ve tanımlarında da önemli genişlemelere yol açmıştır (1, 2).

1.1. Biyosensörler ve Çalışma Prensibi

Biyosensörler biyolojik tepkimelerde hedef analitleri denetlemek için kullanılan küçük algılayıcı cihazlardır. Birbiri içine geçmiş biri biyokimyasal diğeri elektrokimyasal özellikteki iki çeviriciden oluşmaktadır. Biyokimyasal kısmın görevi analizlenecek maddeyle etkileşerek onu tanımadır. Bu tanıma olayının sonucunda bir biyokimyasal ürün de oluşabilmektedir. Biyosensörün ikinci kısmı olan elektrokimyasal kısım ise bu tanıma olayını ölçülebilir (okunabilir) bir sayısal değere çevirmekle görevlidir (1, 2).

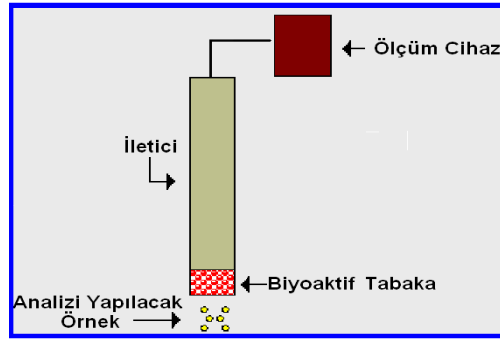
Biyoreseptörler analizi yapılacak olan hedef maddeye özeldir. Bu reseptörler bütün biyolojik sistemlerde analiz edilecek olan maddeyi ayırt edebilmektedirler. Örnek olarak; antijen, antikor, enzim veya hücrenin tamamı verilebilir.

Analizi yapılacak olan hedef molekül biyoreseptör tarafından algılandığında biyoreseptörde bir değişiklik meydana gelir ve bu sinyal iletimi yapan bölge (transduser) tarafından ölçülebilen bir sinyale dönüştürülür (Şekil 1.1) (3).



Şekil 1.1 Biyosensörlerin çalışma prensibi

Analizlenecek madde ve yapılar genel olarak analit olarak adlandırılırlar. Biyosensör teknolojisinde kullanılan analitlere örnek olarak; metaller, substratlar, aktivatörler, inhibitörler, enzimler, koenzimler, hormonlar, antikorlar, antijenler, nükleik asitler, mikroorganizmalar, virüsler, makromoleküller, anorganik ve organik maddeler verilebilir. Biyosensörlerde kullanılan ve analizlenecek madde ile spesifik bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bileşenler, basitten karmaşığa doğru bir sıralama yapıldığında; iyonoförler, antikorlar, enzimler, nükleik asitler, lipozomlar, biyomembranlar, hücre organelleri, tüm hücreler, doku kesitleri ve organlar olarak sınıflandırılabilirler. Şekil 1.2’de biyosensör şematik olarak gösterilmiştir (4).

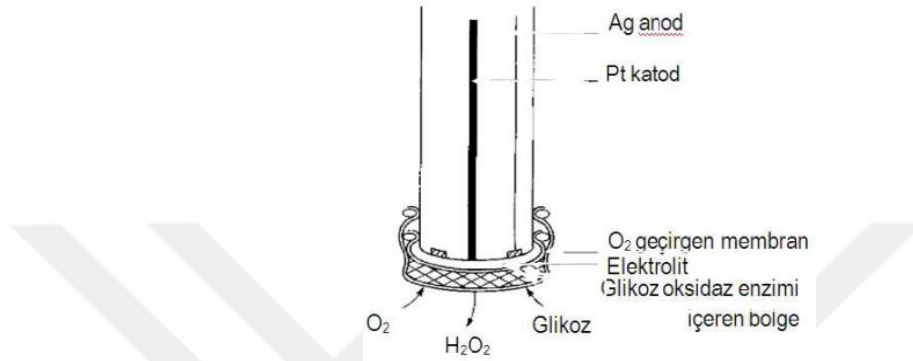


Şekil 1.2 Biyosensörün şematik gösterimi

1.2. Biyosensörlerin Tarihi

Biyosensör teknolojisi alanındaki ilk çalışmalar, biyokimyasal bileşen olarak enzimlerin kullanılmasıyla hazırlanan enzim sensörleriyle başlamıştır. 1950'li yılların ortalarında L. C. Clark ameliyat sırasında kanın O_2 miktarını bir elektrot ile izlemiştir.

1962 yılında Clark ve Lyons, 1967’de Updike ve Hick tarafından hazırlanan glukoz tayinine yönelik glukoz oksidaz enzim elektrotları bu alandaki ilk örnekleri oluşturmuştur. Daha sonraki yıllarda da enzimlerin yanında doku kültürleri, organeller, mikroorganizmalar, antikolar ve nükleik asitler gibi biyokimyasal bileşenlerin kullanılmasıyla değişik tipte birçok biyosensör hazırlanmıştır. Clark’ın enzim elektrodu Şekil 1.3’de verilmiştir (5).



Şekil 1.3 Clark’ın enzim elektrodu

1.3. Biyosensörlerin Bileşenleri

1.3.1. Biyoajanlar (Biyoaktif Tabaka)

Biyoajan bir analitin tanınmasında biyosensörün biyolojik hassasiyete sahip kısmıdır. Biyosensörün hassasiyeti ve seçiciliğinde etkilidir. Bu reseptörler tek bir substratı bağlayacak ve diğer substratlara bağlanmayacak özellikte olmalıdır; temel olarak biyoajanlar; biyokatalitik ve biyoafinite olmak üzere 2 grup altında incelenirler (6).

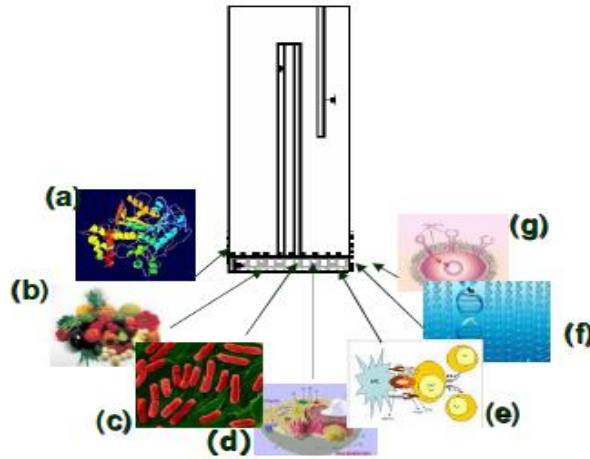
Biyoafinite ajanları olan antikolar, hormon almaçları, DNA, lektin gibi moleküller antijenlerin, hormonların, DNA parçacıklarının ve glikoproteinlerin moleküler tanımlanmasında kullanılır. Kompleks oluşumu sonucunda, tabaka kalınlığı, kırınım indisi, ışık emilmesi ve elektriksel yük gibi fizikokimyasal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

Biyokatalitik ajanlar, analit üzerinde moleküler değişime neden olmakta ve bu dönüşüm sonucu ortamda azalan ya da artan madde miktarı takip edilerek sonuca gidilmektedir. Bu amaçla saf enzim ya da koenzim sistemleri, mikroorganizmalar ve bitkisel ya da hayvansal doku parçaları kullanılmaktadır. Bu nedenle aslında biyosensörleri de çalışma prensiplerine göre Tablo 1.1'deki gibi biyoafinite sensörleri ve biyokatalitik sensörler olmak üzere iki grupta incelemek mümkündür.

Tablo 1.1 Biyoafinite ve biyokatalitik ajanlar ve bunlarla tayin edilebilen analitler

Biyoafinite Sensörler		Biyokatalitik Sensörler	
Reseptör	Analit	Reseptör	Analit
Enzim	Substrat, İnhibitör	Enzim	Substrat
Apoenzim	Prostetik grup	Mikroorganizma	Kofaktör
Antikor	Antijen	Organel	Aktivatör
Reseptör	Hormon	Doku Kesiti	İnhibitör
Lektin	Glikoprotein, Sakkarit, Protein		Enzim

Günümüzde bir biyosensör geliştirilmesi için biyoajan olarak kullanılacak enzim kaynakları Şekil 1.4'te gösterilmektedir.

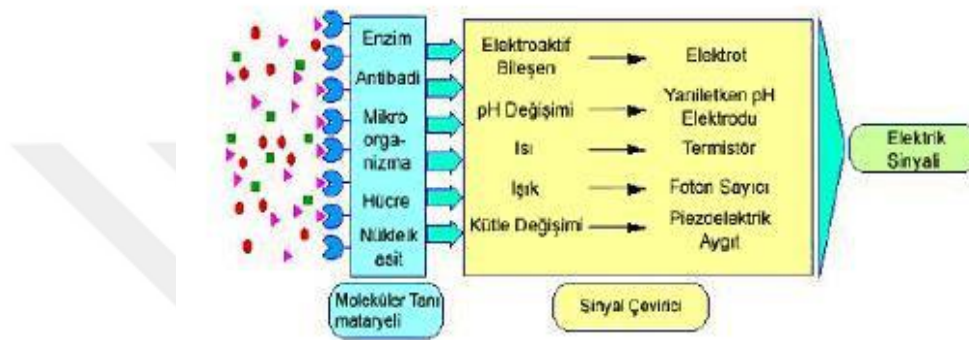


Şekil 1.4 Biyoajan olarak kullanılan enzim kaynakları

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

1.3.2. Sinyal Çevirici (Transduser)

Biyolojik ve biyokimyasal sinyalleri veya cevabı belirlenebilir sinyale dönüştürebilen sistemlere transduser denir. Bir substrat için komponentin aktivitesi O₂ tüketimiyle, H₂O₂ oluşumuyla, NADH konsantrasyonundaki değişimle, floresans, absorpsiyon, pH değişimiyle, kondüktivite, sıcaklık ya da kütledeki değişimle izlenebilmektedir (7). Sinyal ileticilerde gerçekleşen değişimler ve bu değişimleri ölçebilecek ölçüm cihazları Şekil 1.5'te gösterilmektedir (8).



Şekil 1.5 Sinyal ileticilerde gerçekleşen değişimler ve ölçüm cihazları

1.4. İdeal Bir Biyosensörde Olması Gereken Özellikler

Biyosensörün pratikte kullanılabilmesi veya nitelikli bir biyosensör olarak kabul edilebilmesi için bazı parametrelere sahip olması gerekmektedir (8-10);

Kararlılık: Kararlılık, biyosensörün kullanım ömrü hakkında bilgi verir. Aynı bir sensör ile çok sayıda ölçüm yapılabilmesi, iş gücü ve maliyet açısından çok önemli avantajlar sağlar. Biyosensörlerin ömrü, onların saklanma ve çalışma koşullarına bağlıdır. Hibrit bir yapıya sahip olmaları nedeniyle enzim sensörlerini, hem sensör hem de enzim kararlılığı açısından değerlendirmek gerekir. Amperometrik sensörlerde özellikle yüksek potansiyelde çalışıldığında, reaksiyon ürünleri tarafından yüzeyin bozulması problemi ile karşılaşılabilir. Enzimin saflık düzeyi, kaynağı ve immobilizasyon yöntemi enzim sensörünün kararlılığını önemli ölçüde etkilemektedir. Saflık düzeyi ile kararlılık arasında doğrusal bir ilişki yoktur. Safsızlığın artması durumunda ise ilgilenilen enzimatik reaksiyonla girişim yapacak türler arası olumsuz reaksiyonların olabileceği düşünülmelidir.

Duyarlılık: Kalibrasyon grafiğinde substrat derişimi ile sensör yanıtı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu bölgeye “doğrusal aralık” denir. Bu doğrusal aralığın en alt sınırı da tayin sınırı olarak tanımlanır. Potansiyometrik enzim sensörlerinde kalibrasyon grafiği, ürün derişiminin logaritması ile potansiyel arasında çizilir. Amperometrik esaslı enzim sensörlerinde ise ürün derişimiyle akım arasında doğrusal grafikler elde edilir (4). Biyosensör yanıtını etkileyen parametrelerin sensör kalibrasyonunu etkileyeceği unutulmamalıdır. pH, sıcaklık ve girişim yapıcı türler, sensörün yanıtını bunun da tayin sınırını değiştireceği kesindir. Örneğin sıcaklık, optimum koşuldan uzaklaştığında enzim sensörün yanıtını olumsuz yönde etkilerken, bazı kimyasal türlerin difüzyon hızlarının sıcaklıkla artması enzim sensörün yanıtında artışa sebep olur. Aynı analit derişime karşılık ne kadar büyük yanıt elde edilirse duyarlılığın o kadar iyi olduğu söylenir.

Seçicilik: Diğer analiz sistemleri ile kıyaslandığında biyosensörler için en önemli özelliktir. Enzimler, spesifik enzimler hariç seçicilik sırasında antikor ve nükleik asitlerden sonra gelmektedir. Seçiciliği etkileyen bazı parametreler vardır. Bunlar; sensörle girişimler, biyokatalizatörle girişimler ve pH’dır. Sensörde meydana gelebilecek girişimleri önlemenin en iyi yolu örnekteki diğer maddelere yanıt vermeyen, sadece ilgili reaksiyonu izleyebilecek bir sensör kullanmaktır (9).

Cevap Zamanı: Bir biyosensör ile pratik bir işlem sonucunda kısa sürede sonuç alınabilmesi biyosensörlerin yaygınlaşmasını sağlamıştır. Bir biyosensörün cevap zamanını aşığda belirtilen üç aşama etkilemektedir.

- Substratın analiz ortamından membran yüzeyine difüzyon hızı,
- Substratın membran içine difüzyon hızı ve biyokatalizörün aktif merkezi ile ne kadar hızlı reaksiyon verdiği,
- Elde edilen ürünün sensör yüzeyine ne kadar hızlı difüzyon hızıdır.

Çözeltinin karıştırılma hızı, substrat derişimi, enzim derişimi, pH, sıcaklık ve sensör yüzeyinde herhangi bir membranın kullanılıp kullanılmadığı ve kullanılıyorsa membranın niteliği ile kalınlığı ve morfolojisi cevap zamanını etkileyen başlıca unsurlardır.

Tekrarlanabilirlik: Enzimin aktivitesi, kararlılığı ve saflık düzeyi hazırlanacak olan enzim sensörü ile tekrarlanabilir sonuçlar alınmasında oldukça önemlidir. En basit anlamıyla tekrarlanabilirlik, aynı örnekte ard arda ölçüm yapılması ile elde edilen değerlerden sapma ve korelasyon katsayısının hesaplanmasıyla ifade edilir (10).

1.5. Biyolojik Materyallerin İmmobilizasyonu

Enzimler yaşayan hücrelerdeki kimyasal reaksiyonları hızlandıran protein molekülleridir. Enzimler reaksiyonlar sonucunda modifiye olmazlar. Bu nedenle aynı enzim bir kereden fazla kullanılabilir, ancak enzimin reaktanlar ve/veya ürünler ile birlikte bir çözelti içerisinde bulunması, enzimin çözülden ayrılmasını zorlaştırmaktadır. Böyle durumlarda enzimin bir katıya tutundurulması sağlanarak, ürünler ortamdaki alınmakta ve enzim tekrar kullanılabilir bir hale gelmektedir. Enzim immobilizasyonu, enzimin hareketini engelleyen bir yöntemdir. Bir katıya tutundurulmuş, üzerinden geçen substratların ürünlere dönüşmesini sağlayan enzimlere immobilize enzimler denir (11).

Günümüzde immobilizasyon teknolojisindeki gelişmelerle immobilizasyon işlemi sırasında oluşabilecek sorunlara çabuk ve etkili çözümler getirilebilmektedir, ancak her enzim için ayrı ayrı kabul edilen genel bir metod bulunmamaktadır (12). İmmobilizasyon yöntemi seçilirken kullanılan enzimin kimyasal yapısı ve bileşimi, substrat ve ürünlerin özellikleri, oluşan ürünün kullanılacağı alanlar dikkate alınmalıdır (13). Ayrıca, immobilizasyon işleminde, enzimin bağlanma bölgesindeki aktif gruplarını ve kimyasal yapısını değiştirmeyecek, enzimde aktivite kaybına neden olmayacak bir yöntem seçilmesi çok önemlidir. Bu nedenle enzimin bağlanma bölgesindeki gruplarla reaksiyon vermektan kaçınılmalıdır. İmmobilizasyon işleminde bağlanma sırasında enzimin aktif bölgesi koruyucu gruplarla korunur. Bağlanma sonrasında koruyucu gruplar, enzimde aktivite kaybına neden olmadan uzaklaştırılır. Bazı durumlarda bu koruyucu etki substrat ya da yarışan tip inhibitör ile sağlanabilir. İmmobilizasyon yöntemleri Tablo 1.2'deki gibi sınıflandırılmaktadır.

Tablo 1.2 İmmobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması

Taşıyıcıya Bağlama	Çapraz Bağlama	Hapsetme
Fiziksel Adsorpsiyon		Kafes Tipi
İyonik Bağlama		Mikrokapsül Tipi
Kovalent Bağlama		

Enzimin immobilize edileceği yüzey, hidrojen bağı oluşumu gibi enzimin yapısını korumaktadır. Bu bağlanmalar enzimdeki titreşimi engellemekte ve bu da sıcaklık kararlılığının artmasını sağlamaktadır. Yüzey ve enzimin yakın çevresi elektrik yüklüdür ve bu da enzimin optimum pH'sının 2 pH birimi kadar artmasına neden olmaktadır. Böylece enzimin etkin bir şekilde çalışabileceği pH aralığı artmakta ve aynı pH'ta çalışmayan enzimlerin bir arada çalışması sağlanmaktadır (14).

1.5.1. Taşıyıcıya Bağlama Yöntemi

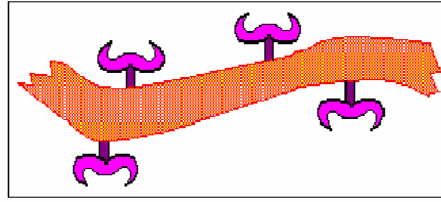
Taşıyıcı bağlama metodu en eski immobilizasyon yöntemidir, enzimlerin suda çözünmeyen taşıyıcılara bağlanması şeklinde gerçekleşir. Bu yöntemde bağlanan enzimin miktarı ve immobilizasyon sonrası enzimin aktivitesi taşıyıcının yapısına bağlıdır (14).

Taşıyıcının seçilmesi immobilize enzimin performansı açısından büyük önem taşımaktadır. Taşıyıcı seçiminde en önemli kriter enzimin cinsidir (14, 15). Bunun dışında taşıyıcı seçiminde dikkat edilmesi gereken kriterler aşağıdaki gibidir:

- Geniş yüzey alanı
- Tanecik boyutu ve şekli
- Kimyasal bileşimi
- Hidrofilik grupların hidrofobik gruplara molar oranı
- Geçirgenliği
- Hidrofilik karakteri
- Kimyasal, mekanik ve ısıl kararlılığı
- Yüksek sertliği

- Mikrobiyal saldırılara karşı dayanıklılığı
- Rejenerasyon kabiliyeti (14, 15)

Şekil 1.6'da enzimin taşıyıcıya bağlanması görülmektedir. Genel olarak; hidrofilik gruplardaki ve bağlanan enzim konsantrasyonundaki artış immobilize enzimin aktivitesinin yükselmesini sağlamaktadır. Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan taşıyıcılardan bazıları selüloz, dekstran, agaroz polisakkarit türevleri veya poliakrilamid jel gibi yapılardır (14).

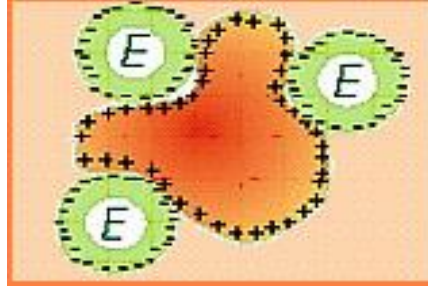


Şekil 1.6 Taşıyıcıya bağlama yönteminin şematik gösterimi

1.5.1.1. Fiziksel Adsorpsiyon

Enzim immobilizasyonunda kullanılmakta olan bu yöntem enzimin suda çözünmeyen bir taşıyıcının yüzeyine fiziksel adsorpsiyonuna dayanmaktadır. Enzim ile taşıyıcı arasında tersinir bir yüzey etkileşimi gerçekleşmektedir. Adsorpsiyon, en basit ve uygun taşıyıcı kullanıldığı durumlarda ucuz bir immobilizasyon metodudur. Bu yöntemde hidrofobik bağlanma gerçekleşebilmekte, ayrıca van der Waals kuvvetleri, iyonik ve hidrojen bağ etkileşimleri gibi elektrostatik kuvvetler de etkili olmaktadır. Bu yöntem ilk olarak beta-D-frukto-furanosidaz enziminin alüminyum hidroksit üzerine immobilizasyonunda kullanılmıştır.

Fiziksel adsorpsiyon ile immobilizasyon işleminde enzimin aktif merkezinin yapısında ve de enzimde konformasyonel değişiklik çok az olmakta ya da hiç olmamaktadır. İşlem sırasında enzimin aktivitesini kaybetmemesi ve optimum adsorpsiyon koşullarının sağlanabilmesi için uygun çözücü kullanılmalı, sıcaklık, enzim konsantrasyonu, adsorbant konsantrasyonu, pH ve iyon konsantrasyonları kontrol edilmelidir. Fiziksel adsorpsiyonun şematik gösterimi Şekil 1.7'de gösterilmiştir (14-16).



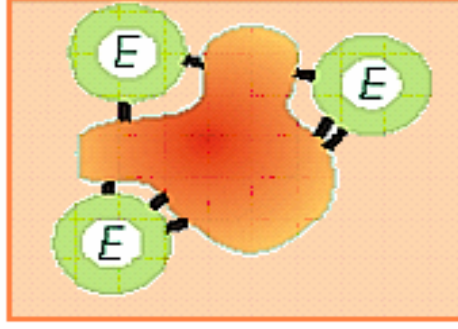
Şekil 1.7 Fiziksel adsorpsiyonun şematik gösterimi

1.5.1.2. İyonik Bağlanma

Bu metot, yüzeyinde iyon değiştirme yeteneğine sahip gruplar bulunduran, suda çözünmeyen taşıyıcılara proteinlerin iyonik bağlanması esasına dayanır. Şartlarının kovalent bağlanmaya göre daha kolay olması bu yöntemi avantajlı kılar. Ayrıca enzimin aktif sitesinde ve formasyonunda küçük çapta değişiklikler olur ve bu yöntem yüksek aktiviteye sahiptir. İyonik bağlama yönteminin dezavantajı, pH değişimleri olan veya yüksek iyonik şiddetli çözeltilerde enzimin taşıyıcıdan kopması durumuyla karşılaşılmasıdır (17).

1.5.1.3. Kovalent Bağlanma

Suda çözünmeyen taşıyıcılara proteinlerin kovalent bağlanma yoluyla bağlanması esasına dayanır. Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeni ile bu grupların rahatsız edilmemesidir. Bunun bir sonucu olarak aktif molekülde aktivite kaybı meydana gelebilir. Kovalent bağlanma diğer yöntemlere göre karmaşık işlemler içerir ve pahalıdır. Kovalent bağlanma kullanılarak hazırlanan bir biyosensör, sıcaklık, pH, iyonik şiddet değişikliklerine karşı dirençlidir. Ayrıca bağlanma metodu ve taşıyıcı materyallerin seçiciliğinden dolayı kovalent bağlanma yöntemi geniş bir seçim aralığına imkan sağlar. Kovalent bağlanmanın şematik gösterimi Şekil 1.8'de verilmiştir (17, 18).

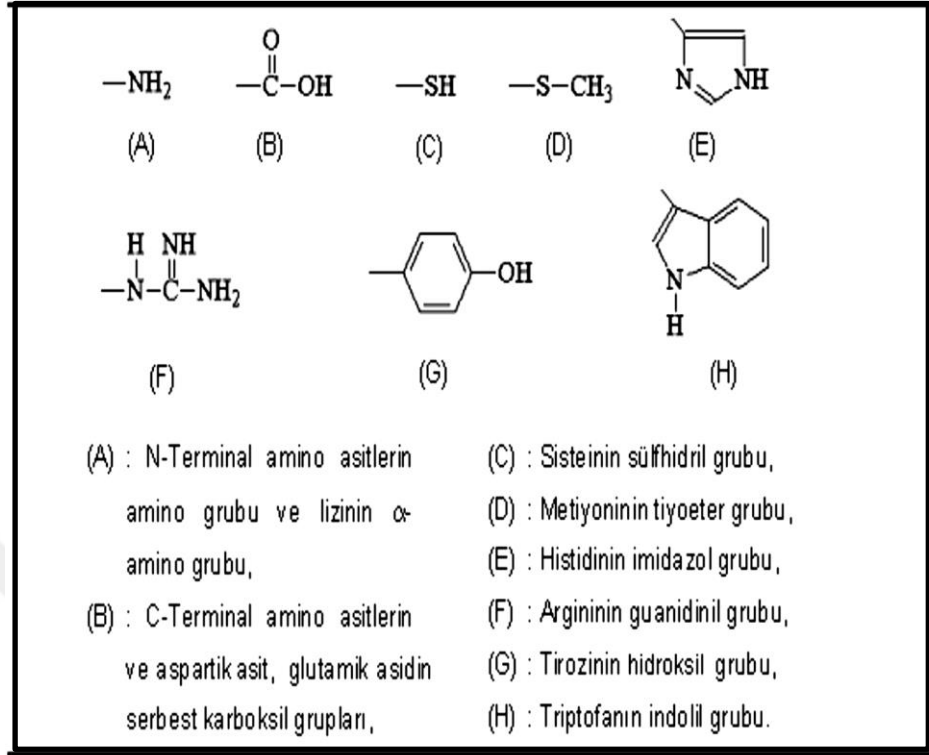


Şekil 1.8 Kovalent bağlamanın şematik gösterimi

Kovalent bağlanmada enzimin aktif merkezi engellenmiş olmamalıdır. Bazı durumlarda immobilize enzimin verimini arttırmak için enzimin reaktif kalıntılarının miktarını arttırmak mümkündür. Böylece enzimatik aktivite için gerekli olan alternatif reaksiyon bölgeleri sağlanmaktadır.

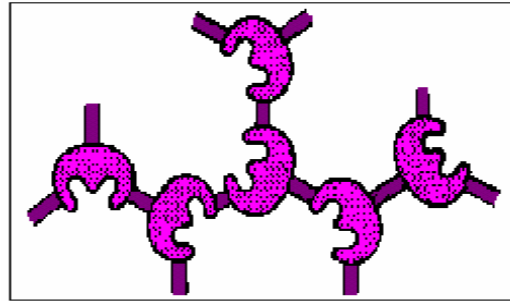
Çapraz bağlanma ile uygulandığında kovalent bağlanma sonucunda kararlı, çevredeki çözeltiliye sızıntı yapmayan immobilize enzim türevleri elde edilmektedir. Bağlanma reaksiyonlarının ve kovalent bağ yapabilen taşıyıcıların çeşitliliği bu yöntemin genellikle kullanılan bir immobilizasyon yöntemi olmasını sağlamaktadır (14). Enzimlerin kovalent bağlanmasında dikkat edilmesi gereken önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için esansiyel olan amino asitler üzerinden gerçekleşmemesi ve bu grupların bağlanma sırasında sterik olarak rahatsız edilmemesidir. Kovalent bağlanma enzim molekülü üzerindeki Çizelge 1.1’de verilen amino asitlerin reaktif fonksiyonel grupları üzerinden gerçekleştirilir.

Çizelge 1.1 Enzimlerin kovalent bağlama ile immobilizasyonunda bağ oluşumuna katılan amino asitlerin reaktif grupları



1.5.2. Çapraz Bağlama

Bu metot, bi- veya multi- fonksiyonel gruplar kullanılarak, enzim molekülleri arasında kovalent bağlanma esasına dayanır. En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri glutaraldehit, karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler vb. maddelerdir (17, 18). Şekil 1.9'da çapraz bağlama şematik olarak gösterilmiştir.



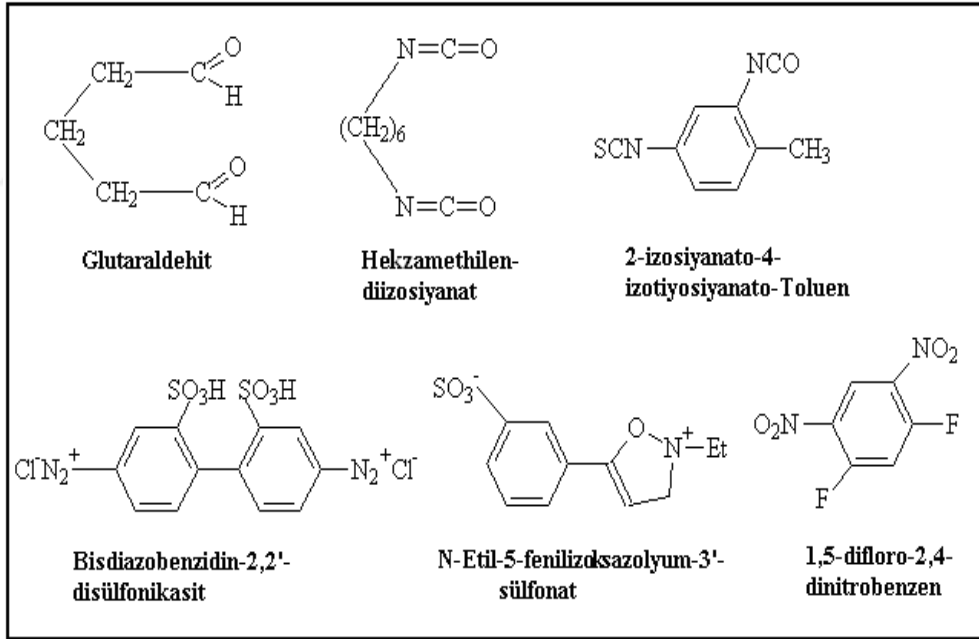
Şekil 1.9 Çapraz bağlamanın şematik gösterimi

Bu yöntemde enzim kuvvetli bir şekilde bağlandığından desorpsiyon çok düşüktür. Çapraz bağlama diğer metotlardan birisiyle konjugasyonda kullanılır. Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu farklı şekillerde yapılır:

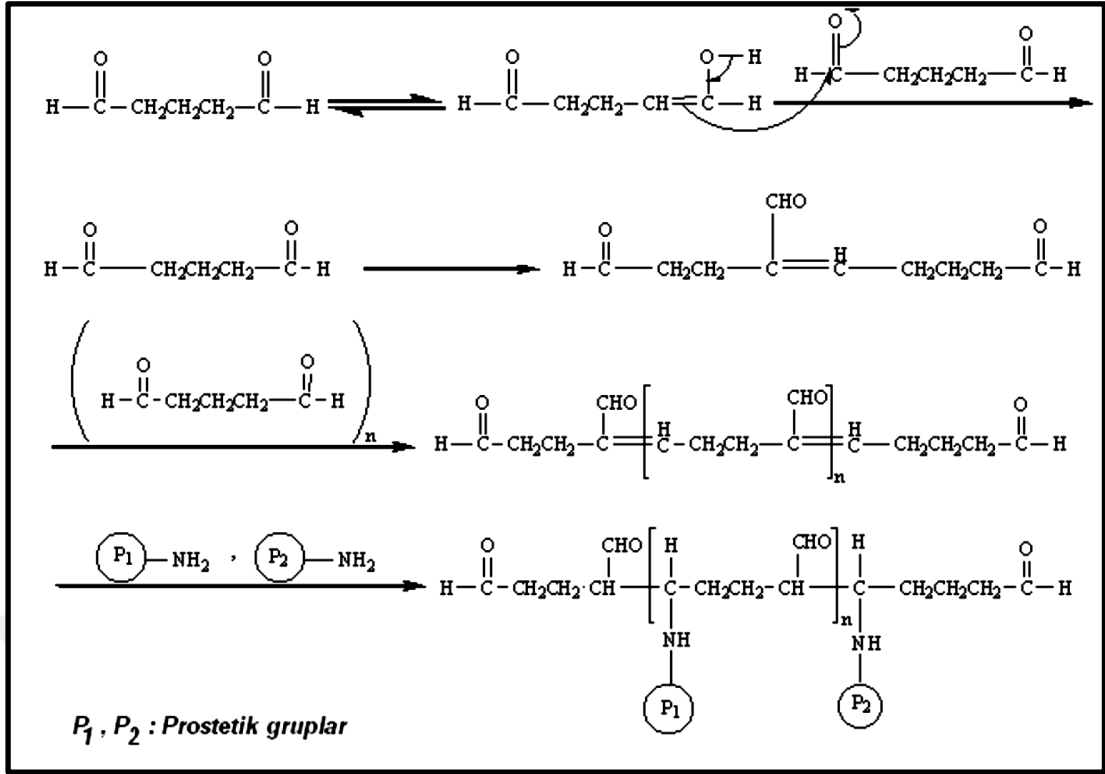
- Enzimin yalnız bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu
- Enzimin ikinci bir protein varlığında bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu
- Enzimin suda çözünen bir taşıyıcıda adsorbsiyonundan sonra bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu
- Enzimin bifonksiyonel reaktif tarafından aktive edilmiş polimer taşıyıcı ile reaksiyonu

Çapraz bağlama reaksiyonu nisbeten sert koşullarda gerçekleştiğinden bazı durumlarda, enzimin aktif sitesinde önemli bir şekilde değişikliklere sebep olur. Çizelge 1.2’de bazı bifonksiyonel reaktiflerin kimyasal formülleri verilmiştir (18).

Çizelge 1.2 Bazı bifonksiyonel reaktiflerin kimyasal formülleri



Kovalent bağlama ile enzim veya protein yapısındaki diğer biyoaktif bileşenlerin önemli immobilizasyon reaksiyonlarından birisi olan glutaraldehit ile çapraz bağlama reaksiyonu aşağıda görülmektedir;



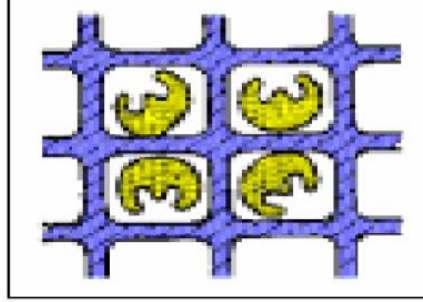
1.5.3. Hapsetme Yöntemi

Bu yöntemin esası protein molekülünü belirli bir ortamda durmaya zorlamaktır. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Hapsetme yöntemi, mikrokapsülleme ve polimer matriks içine kafesleme olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilir. Bu yöntemi kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik, enzim molekülünün fiziksel ya da kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır (18).

1.5.3.1. Kafes Tipi (Polimer Matriks İçine Tutuklama)

Bu yöntem yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerde protein (örn,enzim) moleküllerinin çapraz bağ arasında tutuklanması esasına dayanır (Şekil 1.10). Polimer matriks içerisine tutuklama yöntemi, çok kolay uygulanması, gerçek bir fiziksel yöntem oluşu ve çok az miktarda enzim ile gerçekleştirilmesi yönünden avantajlı bir yöntemdir. Ayrıca kimyasal bir bağlanma olmadığından yüklü taşıyıcıya gerek duyulmamaktadır. İmmobilizasyon işlemi sırasında inaktivasyonun deney

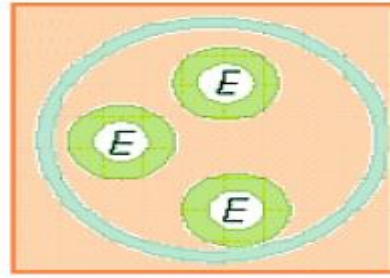
koşullarına çok sıkı bağımlı oluşu ve immobilize enzimin ancak küçük moleküllü substratlara karşı iyi aktivite göstermesi bu yöntemin dezavantajıdır (18).



Şekil 1.10 Kafes tipi tutuklama yönteminin şematik gösterimi.

1.5.3.2. Mikrokapsül Tipi

Bu yöntem enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanması esasına dayanır. Mikrokapsüllerin çapı 1-100 μ arasında değişmektedir. Şekil 1.11’de enzimin bir kapsül içinde tutuklanması görülmektedir.



Şekil 1.11 Enzimin bir kapsül içerisinde tutuklanması

Bu yöntemle immobilize edilmiş enzimler çift seçimlilik gösterebilirler. Seçimliliğin biri doğal olarak enzimin kendisinden gelirken diğeri çevreyi oluşturan yarı geçirgen membrandan gelebilir. Bununla beraber, bu yöntemde mikrokapsülleme işlemi esnasında enzim inaktif olabilir ve ayrıca kullanılan enzim konsantrasyonunun oldukça yüksek olması gerekmektedir (18).

1.6. İmmobilize Enzimlerin Doğal (Serbest) Enzimlere Göre Üstünlükleri

➤ Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme vb.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem oluşturmaz.

- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık vb.) karşı daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığı azalır.
- Uygun biyoaktif materyal ve sensör seçildikten sonra bunların birbirine bağlanması aşılması gereken en önemli sorundur. Bu bağlama işlemi biyosensörlerin immobilizasyonu olarak tanımlanmaktadır (19).

1.7. İletim ve Ölçüm Sistemlerine Göre Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Tablo 1.3'de iletim ve ölçüm sistemlerine göre biyosensörlerin sınıflandırılması görülmektedir.

Tablo 1.3 İletim ve ölçüm sistemlerine göre biyosensörlerin sınıflandırılması

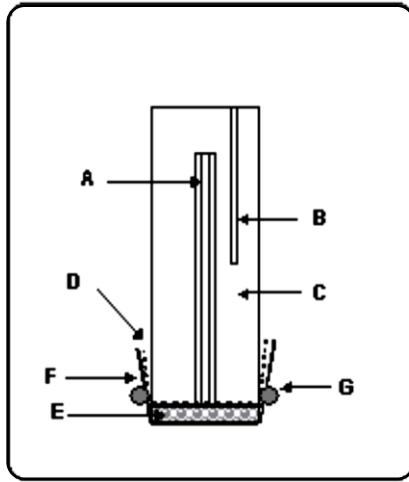
Elektrokimyasal	Kalorimetrik	Optik	Piezoelektrik
Amperometri	Termistörler	Fotometri	Piezoelektrik kristaller
Potansiyometri		Fluorometri	
Yarı iletken		Biyoluminesans	

1.7.1. Elektrokimyasal Esaslı Biyosensörler

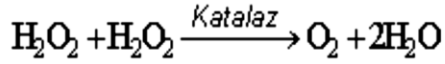
1.7.1.1. Amperometri Esaslı Biyosensörler

Amperometri genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. Söz konusu akım yoğunluğu çalışma elektrodunda yükseltgenen ya da indirgenen elektroaktif türlerin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak tanımlanır. İkinci elektrot referans elektrot olarak iş görür. Kalibrasyondan sonra, akım yoğunluklarından ilgili türlerin konsantrasyonlarının belirlenmesinde

yararlanılır. Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi Şekil 1.12’de verilmiştir (20).



- A: Çalışma Elektrodu [Pt]
B: Referans Elektrot [Ag/AgCl]
C: Elektrolit Çözelti [KCl]
D: İç gaz geçirgen membran [Teflon]
E: İmmobilize enzimi içeren biyoaktif tabaka
F: Dış koruyucu membran [Selüloz asetat v.b.]
G: O-ring

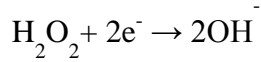
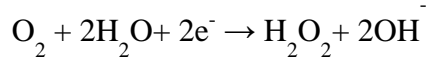


Şekil 1.12 Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi

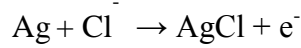
İletici sistem olarak bir amperometrik sensörün kullanılması durumunda potansiyometrik sensörlerden en büyük fark, ürünlerden sinyal oluşturan türün elektrot yüzeyinde tüketilmesidir.

Oksijen tüketimine ilişkin reaksiyonlar aşağıda verilmiştir;

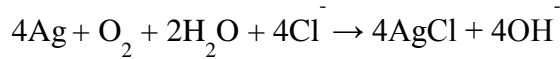
Katodik reaksiyon;



Anodik reaksiyon;



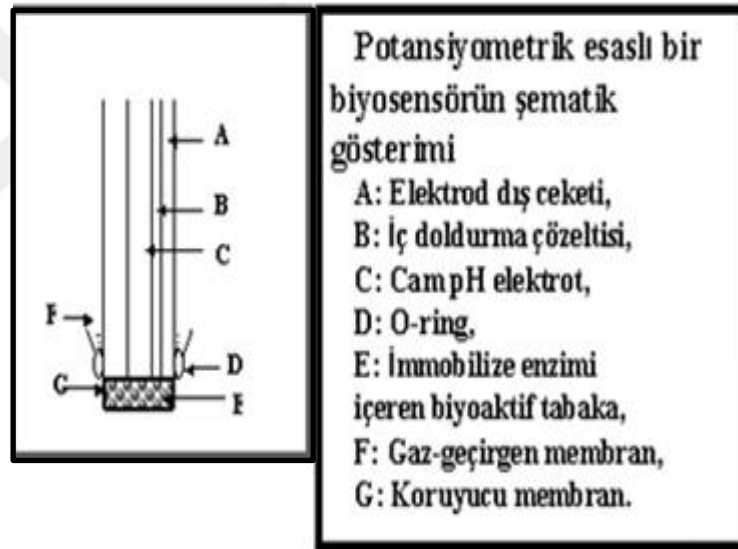
Toplam reaksiyon;



1.7.1.2. Potansiyometri Temelli Biyosensörler

Potansiyometri bilindiği gibi en genel anlamda bir çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümünü temel almaktadır. Elektrot potansiyelinin belirlenmesi doğrudan analit konsantrasyonunu belirler.

Potansiyometrik biyosensörler temel tabakasını iyon seçici elektrotlar veya gaz duyarlı elektrotların üzerine bir veya daha fazla enzimin immobilizasyonu ile yapılmaktadır. Potansiyometrik enzim sensörler, iyon seçici elektrotlar ve gaz seçici elektrot temellidirler. Bunlar pH, amonyum, iyot, siyanür, amonyak ve karbondioksit duyarlı enzim sensörlerdir. Potansiyometrik biyosensörlerin şematik gösterimi Şekil 1.13'de verilmiştir (20).



Şekil 1.13 Potansiyometrik biyosensörlerin şematik gösterimi

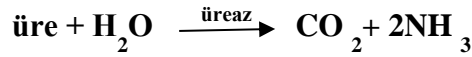
❖ pH Temelli Biyosensörler

H_3O^+ iyonu konsantrasyonundaki değişmeyi belirlemek amacıyla tasarlanan bu tür enzim elektrotlarında temel sensör olarak en yaygın bir şekilde klasik cam elektrotları kullanılır. Ayrıca H_3O^+ iyonlarına duyarlı maddelerin (DOS, PVC-NH₂) kullanılmasıyla hazırlanan pH duyarlı iyon seçici elektrotlar ve antimon elektrotunda olduğu gibi H_3O^+ iyonlarına duyarlı bazı metalik elektrotlarında kullanılması mümkündür. Temel ilke proton konsantrasyonundaki küçük farkların belirlenmesidir.

pH duyar potansiyometrik biyosensörlere verilebilecek en klasik örnekler; üre, glukoz ve penisilin tayinine yönelik biyosensörlerdir (3).

➤ **Üre**

Potansiyometrik sensörler ile 1987’de Guilbault ve Kuan tarafından ilk ölçülen biyolojik madde üredir. pH elektrot yüzeyine üreazın immobilizasyonu ile üre biyosensör hazırlanır.



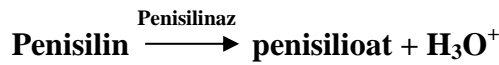
➤ **Glukoz**

Glukoz oksidaz enziminin glikozu katalizlemesi sonucu glukonik asitin açığa çıkmasıyla pH’ta değişikliğe neden olur ve bu değişiklik pH sensörle ölçülebilmektedir.



➤ **Penisilin**

pH elektrot yüzeyine penisilinaz enziminin immobilizasyonu ile biyosensör elde edilir. Penisilinaz enzimin katalizlemesi ile oluşan H_3O^+ pH elektrot tarafından ölçülerek penisilin miktarı tayin edilir.



❖ **NH_4^+ Seçici Sensör Temelli Biyosensörler**

NH_4^+ seçici potansiyometrik bir biyosensör, amonyum iyonlarına seçici temel sensör ile enzimin immobilize edildiği membranın birleştirilmesiyle hazırlanmaktadır. Bu tür biyosensörler genelde NH_4^+ iyonu yanında H_3O^+ , K^+ ve Na^+ gibi tek değerlikli katyonlara da duyarlılık gösterirler. Bu yüzden, ölçüm ortamlarında benzer iyonların bulunması durumunda girişim problemleri ortaya çıkmaktadır. Bu

nedenlerden dolayı elektrot kalibrasyonunda fosfat tamponları kullanılmazken Tris-HCl benzeri tamponlardan yararlanılabilir.

Analiz yapılacak örneğin bazı iyon değişim reçineleriyle işleme tabi tutulması yoluyla girişim yapabilecek iyonların uzaklaştırılabilmesi mümkünse de özellikle biyolojik örneklerde bu sorunla başa çıkılabilmesi kolay değildir. Bu sorunun önüne geçebilmek için çift membran teknolojisinden yararlanılarak daha seçici biyosensörler hazırlanabilir (3).

❖ **NH₃ Seçici Sensör Temelli Biyosensörler**

Amonyak seçici bir gaz sensörün temel sensör olarak kullanıldığı bu tür enzim sensörlerinde amonyağın genel özelliklerinden yararlanır. Temel sensör elektrolit olarak NaHCO₃ içerir.

Amonyak seçici sensörlerde enzim (ürezaz), temel sensörü çevreleyen gaz geçirgen bir hidrofobik membran üzerine uygun immobilizasyon yöntemleriyle monte edilir. Hidrofobik membranın yalnızca gaz geçirgen olması kan gibi karmaşık biyolojik örneklerde bile ön işleme gerek olmaksızın spesifik analizler yapılabilmesini imkan verir.

❖ **CO₂ Seçici Sensör Temelli Biyosensörler**

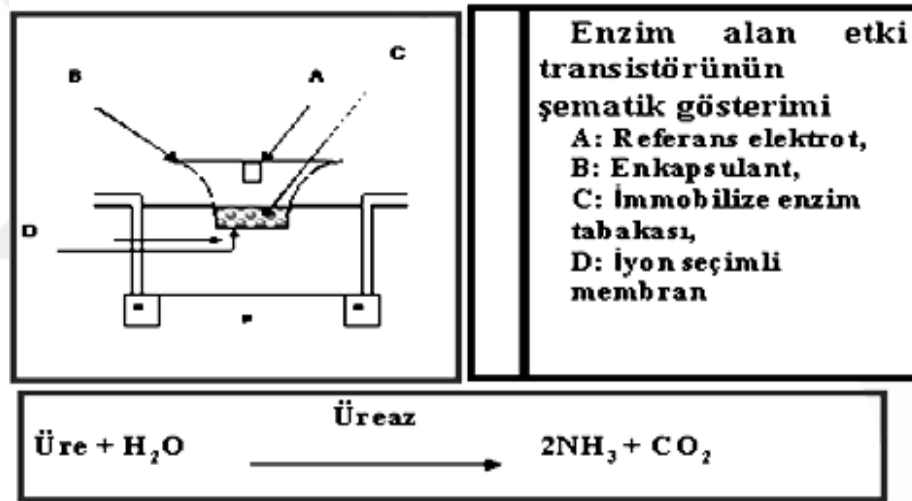
Karbondioksit duyar bir enzim elektrotunda ölçüm ilkesinin temeli, enzimatik reaksiyon uyarınca oluşan karbondioksitin suyla etkileşmesi sonucu açığa çıkan H₃O⁺ iyonlarının neden olduğu asidik ortamdır. Kullanılan temel sensör NaHCO₃ ve NaCl içeren bir cam elektrottur. NaHCO₃ doğrusal elektrot cevabı alınmasını desteklerken, NaCl, Ag/AgCl referans elektrotunu stabilize eder.

Enzim, temel sensörü çevreleyen hidrofobik membran üzerine immobilize edilir. Bu sayede çözeltideki iyonik etkilerden korunabilir. Ancak uçucu asidik ve bazik türlerin girişim etkilerinin gözden uzak tutulmaması gerekir (3).

1.7.1.3. Yarı İletkenleri Esas Alan Biyosensörler

Temel sensör olarak metal oksit yarı iletken alan etki transistörlerini (MOSFET) ya da iyon duyar alan etki transistörlerini (ISFET) esas alan bu tür enzim sensörleri, enzim ile alan etki transistörlerinin birleştirilmesini ifade edecek şekilde enzim alan etki transistörleridirler (ENFET).

MOSFET'lerin, gazların ölçümüne uygun hale getirilmesiyle oluşan gaz duyar sensörlerde (GASFET) adsorblanan gaz moleküllerinin disosiyasyonu ve oluşan yükün oksit tabakasına transferi temel ilkedir. Bu durum tabakanın dielektrik sabitini değiştirerek ve geçen akımda bir modifikasyona yol açarak ölçüme olanak sağlar. Enzim alan etki transistörü Şekil 1.14'te verilmiştir (18, 20).

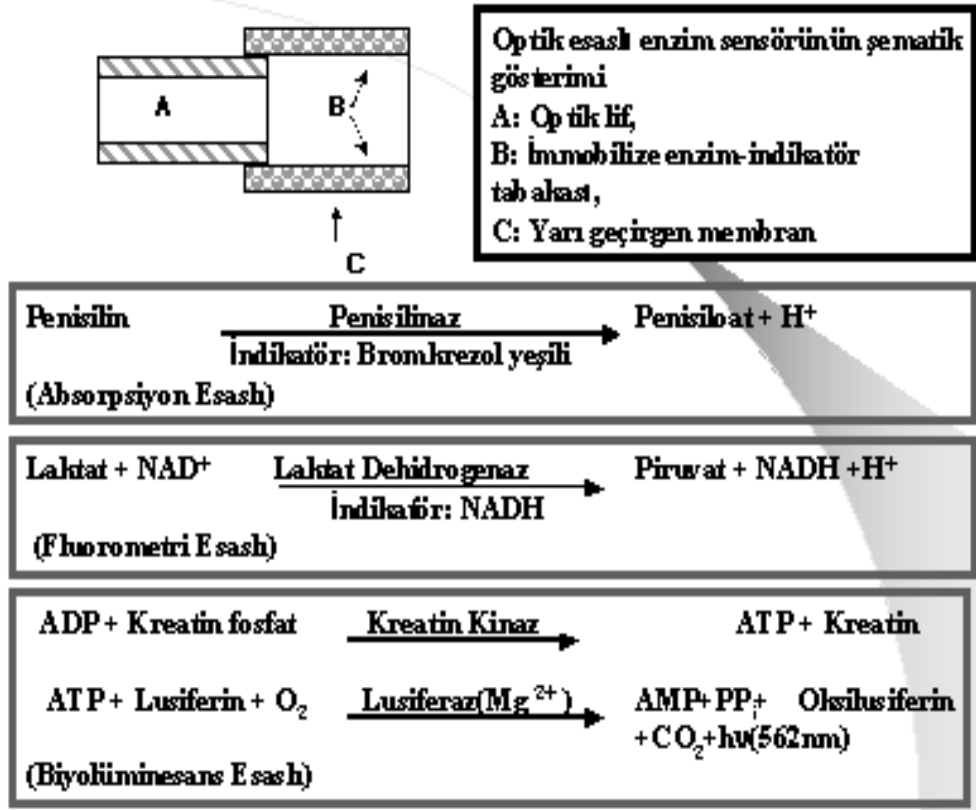


Şekil 1.14 Enzim alan etki transistörü

1.7.2. Optik Esaslı Biyosensörler

Optik biyosensörler iletici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle uygun bir biyomolekülün immobilize edilerek hazırlanan ölçüm cihazlarıdır. Etkileşim sonucu meydana gelen kimyasal ya da fizikokimyasal bir değişimin ölçümünü temel almaktadırlar. Sinyal, ışık yansımaları, saçılımı ya da yayımı sonucu oluşur. Örneğin optik lifin üzerine enzim immobilizasyonu ile hazırlanan optik esaslı enzim sensörleri temelde absorpsiyon, fluoresans,

biyoluminesans gibi temel ilkeler çerçevesinde çalışırlar. Optik esaslı biyosensörlerin şematik gösterimi Şekil 1.15'te verilmiştir (18).



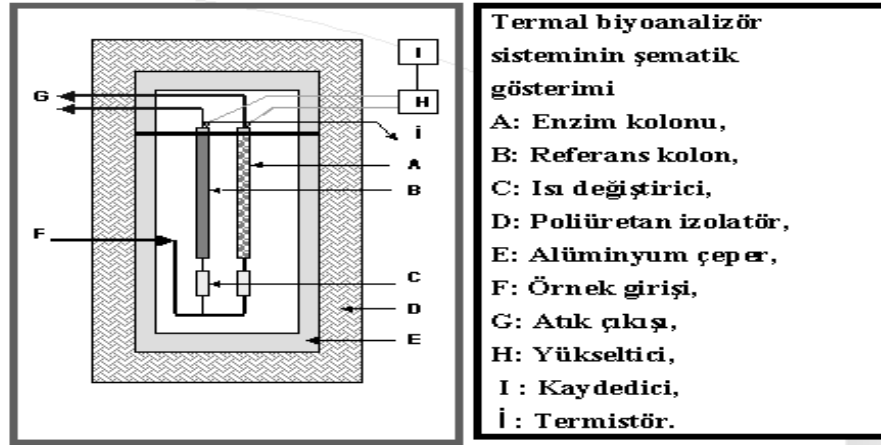
Şekil 1.15 Optik esaslı biyosensörlerin şematik gösterimi

1.7.3. Kalorimetri Esaslı Biyosensörler

Kalorimetri esaslı enzim sensörleri, termal enzim sensörleri, enzim termistörleri ya da entalpi metrik enzim sensörleri gibi değişik isimlerle adlandırılırlar. Temel ilkeleri bir enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanarak substrat konsantrasyonunu belirlemekten oluşur. Genel olarak enzimatik reaksiyonların ekzotermik doğasından faydalanılır. Enzimatik reaksiyon sonucu meydana gelen sıcaklık değişimi ile substrat konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişki den sonuca varılır. 0 °C'ye yakın küçük sıcaklık değişimleri termal olarak yalıtılmış ortamlarda termistör veya termofiller yardımıyla takip edilir.

Kalorimetri esaslı termal biyoanalizör ile termal enzim sensörleri arasında biyosensör kavramı açısından önemli farklar vardır. Termal biyoanalizörler,

yalıtılmış bir sistemde genelde biri referans olmak üzere iki immobilize enzim kolonu içerirler. Pompalar yardımıyla bir sürekli akış olayı görülür. Enzimatik reaksiyon uyarınca substrat konsantrasyonuna bağlı sıcaklık değişimi termofiller yardımıyla gözlenir. Kalorimetri esaslı biyosensörlerin şematik gösterimi Şekil 1.16'da verilmiştir.

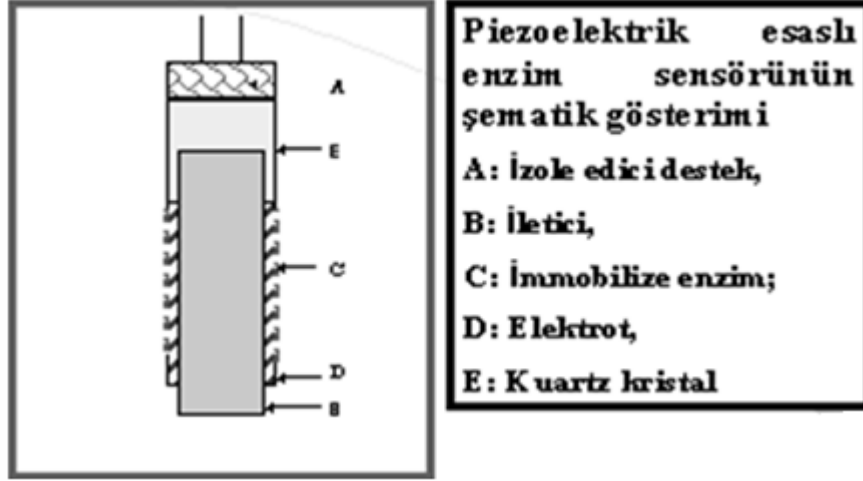


Şekil 1.16 Kalorimetri esaslı biyosensörlerin şematik gösterimi

1.7.4. Piezoelektrik Esaslı Biyosensörler

Piezoelektrik sensörler en genel anlamda karakteristik rezonans frekansındaki farklanmayı belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlesinin ölçülmesi esasına göre çalışan gravimetrik cihazlardır. Sensör seçimliliği, kristal yüzeyindeki madde ile spesifik bir etkileşime sahip analitin birikimiyle alakalıdır. Sensör yüzeyinde bir madde adsorblandığı veya biriktiği zaman piezoelektrik kristalin rezonans frekansındaki farklanmanın ölçülmesiyle sonuca varılır.

Bir piezoelektrik sensörün üzerinde enzim immobilizasyonu ile gerçekteştirilen piezoelektrik enzim sensörlerinde, enzim moleküllerine substratların bağlanmasından dolayı meydana gelen kütle değişimlerinin, piezoelektrik kuartz diskin vibrasyonunda sebep oldukları farklanmadan yararlanılarak madde miktarı tespit edilir. Piezoelektrik esaslı biyosensörlerin şematik gösterimi Şekil 1.17'de verilmiştir (18, 21).



Şekil 1.17 Piezoelektrik esaslı biyosensörlerin şematik gösterimi

1.8. Biyosensörlerin Uygulama Alanları

Biyosensörlerin, klinik teşhis, tıbbi uygulamalar, süreç denetleme, biyoreaktörler, gıdalarda kalite kontrol, tarım ve veterinerlikte tanı ve kalite kontrolü, bakteriyel ve viral teşhis kitlerinin hazırlanması, ilaç üretimi, endüstriyel atık su denetimi, madencilik, askeri savunma sanayi gibi alanlarda yaygın olarak kullanımı söz konusudur. Biyosensörlerin en yoğun olarak kullanıldıkları alan bugün için medikal tanı ve teşhis alanıdır. Hiç kuşkusuz biyomedikal sektör biyosensörler için en iyi pazardır. Bu alanda uygulama olanağı bulan ilk biyosensörler enzim sensörleridir. Ticari olarak üretilen ilk biyosensör ise diyabet hastalığının teşhisi için kan ve idrarda glukoz tayinini mümkün kılan glikoz oksidaz elektrodudur. Bu alanda gerek vücuttaki glukoz, üre, şeker gibi biyolojik ürünlerin takibi yanı sıra kanserlerin izlenmesi ve mikrobiyal ajanların tespiti amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır (22-24).

Çevre takibinde biyosensörler gerek suların gerekse havanın çevresel atıklar, mikroorganizmalar ve toksinler yönünden takibi amacıyla kullanılmaktadır (25). Gıda sektöründe biyosensörlerin kullanımı gerek gıdaların üretimi gerekse paketlenmesi ile markete sunulması aşamalarında gıdaların kalite ve kontaminasyon kontrolleri için tercih edilmektedir. Biyoteknoloji ve gıda endüstrisinde başta glikoz olmak üzere bir çok monosakkarit, amino asitler, organik asitler (laktik asit) üre ve alkol tayinlerinde enzim sensörleri kullanılmaktadır.

Ayrıca gıdalardaki yabancı maddeler (peptisitler, toksitler ve yabancı hormonlar vb.) yanında aroma ve tazelik gibi kompleks parametreler içinde biyosensörler hazırlanabilir (8, 26). Savunma alanında biyosensörlerin kullanımı ve geliştirilmesi çalışmalarına özellikle “11 Eylül” saldırısından sonra hız verilmiştir. Bu alanda biyosensörler gerek biyolojik savaş ajanlarının gerek belirlenmesinde gerekse takibinde kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin, bu yaklaşımla şarbonlu bir mektubun kısa sürede belirlenmesi mümkündür (27).

Kara mayınlarının yapımında yoğun olarak kullanılan trinitrotoluen (TNT) nitroredüktaz ihtiva eden bakterilerin enzimlerini taşıyan biyosensörler de yine savunma alanında kullanım bulmuş olan ürünlerdir. Bugüne kadar yüzlerce biyosensör hazırlanmış olup bunların birçoğu da ticari olarak üretilmektedir.

Biyosensörlerin, ilaçların vücuttaki düzeylerinin ayarlanması ve kontrolünde kullanılması yakın bir gelecekte gerçekleştirilebilecektir. Yapay pankreas çalışmaları biyosensörlerle ilgili devam ettirilmekte olan ve yakın gelecekte sonuç alınacağı düşünülen biyosensörlerin geleceğine dair güzel bir örnektir. Son yıllarda analizatörlere enzim elektrotları monte edilmiş ve yoğun bakım ünitelerinde kullanılmaya başlanmıştır. Biyosensörlerin gelecekte önemli uygulamalarından biri süperoksit ve nitrik oksit gibi kısa ömürlü ve hormonlar ve nörotransmitterler gibi düşük konsantrasyonlu maddelerin in vivo tayinidir. Ayrıca biyoproseslerin nükleik asit düzeyinde izlenmesi, ilaçların reseptörlere etkisi ve özellikle transmitter-reseptör etkileşimi de biyosensörlerin gelecekteki önemli tıbbi uygulamaları olacaktır.

Aynı zamanda biyolojik mekanizmaların, proteinler arası ilişkilerin anlaşılmasında ve insan genom projesinin devamı olan proteomik çalışmalarında da biyosensörlerin daha da geliştirilmesinde ve çeşitlendirilmesinde büyük katkı sağlayacaktır. İnsan genom projesi, patojenik bakteri ve mikroorganizmaların genetik kodların ilaç geliştirme çabaları için belirlenmesi yanı sıra bazı kötü niyetli ilaçların ilaç yerine zehir yapmasına da sebep olabilecektir (28).

Modern zaman biyosensörleri olarak da adlandırılan nanoteknolojik veya chip teknolojisi kullanılarak geliştirilmeye başlanılan yeni nesil biyosensörler sonuçların

daha kolay izlenmesi ve değerlendirilmesini sağlamaktadır. Örneğin, bu teknik kullanılarak biyoçip yerleştirilen bir bireyde değişimler bireyin hastaneye gitmeden de takibini sağlayacak bir özelliğe sahiptir. Ayrıca, nükleotit çoğaltma ve görüntüleme metotlarının hızla gelişmesi, bunların nanoteknolojiyle birlikte değerlendirilmesi, nükleotit temelli biyosensörlerin kullanım alanlarının daha da yaygınlaşmasını sağlayacaktır (29,30).

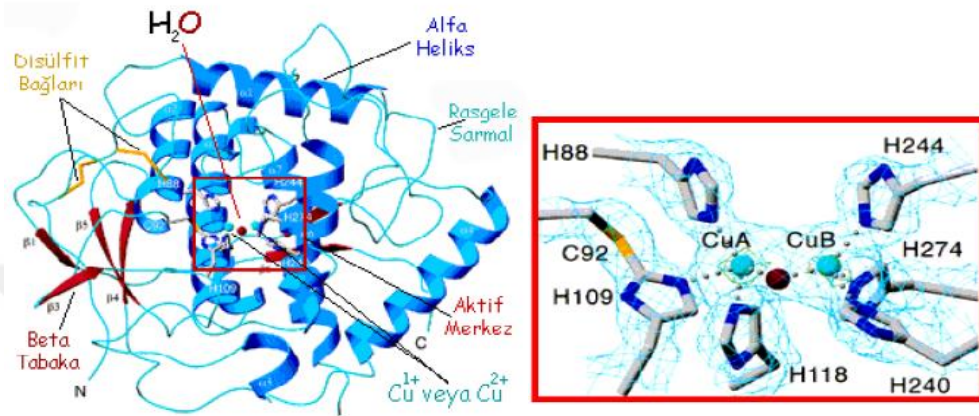
Yukarıda da belirtildiği gibi, günümüzde birçok biyosensör geliştirilmiş ve bunların bazılarının ise kullanım izinleri alınmıştır ve ticari olarak yaygın olarak birçok farklı alanlarda kullanılmaktadır. Ancak halen daha farklı biyosensörlerin geliştirilme çalışmaları özel laboratuvarlarda devam ettirilmekte ve bunların geliştirilmesi için özellikle gelişmiş ülkeler önemli kaynaklar aktarmaktadırlar (31,32).

1.9. Polifenol Oksidazlar

Meyve ve sebzelerin endüstriyel hazırlanmaları sırasında gözlenen en önemli sorun esmerleşmedir. Bu reaksiyona yol açan enzimler substratlarına bağlı olarak krezolaz, kateşol oksidaz, kateşolaz, polifenol oksidaz ve fenolaz olarak adlandırılır. 1981 yılından itibaren bunların tümü fenolazlar veya polifenol oksidazlar adı altında toplanmıştır. Bu enzimler canlılarda bakterilerden memelilere kadar uzanan geniş bir skalada dağılım gösterirler. Polifenol oksidazlar doğada hemen hemen tüm bitkilerde, bazı hayvansal dokularda ve birçok mikroorganizmada bulunur. Bitkilerdeki PFO miktarı; bitkinin türüne, yaşına, olgunluk durumuna ve yetiştirilmesine bağlıdır. Aynı zamanda bu enzimin bitki hücrelerinde bulunduğu yer her bitki türü için farklılık gösterir (33).

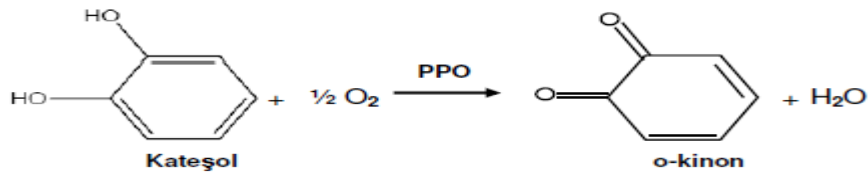
Biyosensör ile tayin yöntemlerinde prensip, tayin edilecek madde yani substratın etkileşebileceği bir enzimle dönüşüme uğratılması sonucu oluşan değişimlerin ölçülmesidir. Biyosensör ile fenolik bileşiklerin tayin edilmelerinde enzim olarak, substrat olan fenolik bileşiği moleküler oksijeni kullanarak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

Bu enzimler, oksidoredüktazlar grubuna girer ve enzim terminolojisinde (E.C. 1.14.18.1, PPO) olarak belirtilir (34). Kofaktör olarak Şekil 1.18’de görüldüğü gibi iki adet kompleksleşmiş Cu^{+2} içerirler. Aktif merkezde substratın bağlanabileceği bir boşluk vardır ve bu merkezdeki histidin kalıntıları bakır bağlamada görev yaparlar (35).



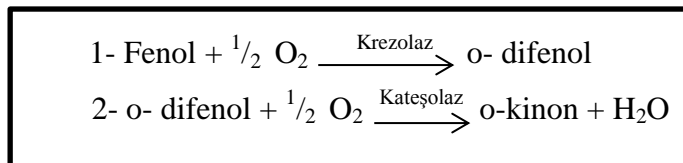
Şekil 1.18 Polifenol oksidaz enziminin 3 boyutlu yapısı ve aktif merkezi

Polifenol oksidaz enzimi kateşolün ortokinon’a yükseltgenme reaksiyonunu katalizler. Biyosensör temelli tayin yöntemlerinde de bu reaksiyon esas alınarak reaksiyon ortamındaki çözünmüş oksijen tüketiminin neden olduğu fiziksel değişimler ölçülmektedir (34).



Polifenol oksidazlar (PFO) reaksiyonları iki adımda katalizlerler (36).

1. Adım; monofenollerin o-difenollere o-hidroksilasyonu (krezolaz aktivitesi)
2. Adım; o-difenollerin o-kinonlara tamamen oksidasyonudur. (kateşolaz aktivitesi)



Meyvelerin, sebzelerin ve kabuklu deniz hayvanlarının endüstriyel hazırlanmaları sırasında, PFO'nun katalitik etkisi sonucunda enzimatik kararmalara sebep olur. Polifenol aktivitesi sonucu oluşan o-kinonlar diğer bileşiklerle reaksiyon vererek renk koyulaşmasına ve istenmeyen lezzetlere sebep olurlar. Polifenol oksidazlar plastidlerde lokalize olmuştur, bunların fenolik substratları yoğun olarak vakuollerde bulunur. Bu nedenle hücre içi bölünmeler bozulduğu zaman enzimatik kararma ortaya çıkar. Bu yüzden bitkisel ürünlerin toplanması ve depolanması sırasında bitkilerin mekanik bir etki (basınç, yaralanma, donma, preslenme v.b.) ile zarar görmemesi istenir (37).

Polifenol oksidazlar, her birim için bir bakır atomu içeren tetramer yapıları proteinlerdir ve fenolik substratları olan aromatik bileşikler için bağlanma bölgesi vardır. Enzim 128.000 Dalton moleküler ağırlığa sahiptir (36). Polifenol oksidazların aktivite için kofaktörlere ihtiyacı yoktur, ancak spektroskopik çalışmalar bakır içeren aktif bölgelerinin varlığını göstermiştir. Bunun dışında grup spesifikliği gösteren enzimlerdir ve bilinen tüm fenolik bileşikleri substrat olarak kullanırlar (37). Aktivite gösterdikleri optimum pH bölgesi 6,0-7,0 civarındadır (1). Ancak pH:4,5'un altında da aktivite gösterebilirler. pH:3,5'un altında polifenol oksidazların geri dönüşümsüz inaktivasyonu gerçekleşir. Optimum pH, genetik özellikler, fenolik substratların doğası ve enzimin ekstraksiyon metoduna bağlı olarak değişebilmektedir (38).

1.9.1. Polifenol Oksidaz Enzimlerinin Keşfi

Schoenbein 1856 yılında, oksijenin oksitleyici ajan olarak kullanılarak bazı bitkilerde aerobik oksidasyonun gerçekleştiğine dikkati çekmesiyle; kimyada ilk olarak oksidazlarla ilgilenilmiştir. Oksidazlar hakkındaki bilgilerimizi geliştirmedeki bir sonraki aşama ise; Yoshida'nın yaptığı çalışmada lak ağacının lateksinde lakkazın varlığını gözlemlemesidir. Bir kaç yıl sonra Bertrand, Yoshida'nın lakkaz üzerine yaptığı çalışmayı geliştirmiş ve bazı mantar türlerinde lakkaz enziminin var olduğunu bulmuştur. Bourquelot ve Bertrand birlikte yaptıkları araştırmada *Russula fortens* ve *R. nigricans* gibi bazı mantar türlerinin ekstraktlarının renginin bekleme sırasında önce kırmızı daha sonra da koyu kahverengi veya siyah olduğunu

gözelemişlerdir. Bourguelot ve Bertrand *R. nigricans* mantarının ekstraktından kristal halinde bir madde ayırmışlardır. Bu kristal maddenin çözeltisinin mantar ekstraktı ile temas ettirilmesi sonucunda, aerobik oksidasyonun başladığı ve ilk olarak kırmızı renkli çözeltinin ve daha sonra da melanine benzer siyah bir ürün oluştuğu bildirilmiştir. Kristal madde daha sonra Bertrand tarafından tirozin amino asidi olarak tanımlanmıştır.

Lakkazın tirozinin üzerinde aktif olmadığı bulunması Bertrand'ı adı "tirozinaz" olan yeni bir oksidazı keşfettiğini anlamasına yol açmıştır. Bertrand tirozinazın p-hidroksifenil etil amin, p-hidroksifenil metil amin, p-hidroksifenil amin, p-hidroksifenil propiyonik asit, p-hidroksifenil asetik asit, p-krezol ve fenol gibi (tirozinden başka) diğer bazı aromatik monohidroksi fenollerin oksidasyonunu katalizlediğini de bulmuştur. Diğer taraftan bu bahsedilen bileşiklerde hidroksi grubu olmadığına, bu enzim ile herhangi bir oksidasyonun olmadığı bildirilmiştir. Bu ilk enzim çalışmalarını takip eden sonraki çalışmalarda tirozin üzerine enzimin etkisi ve bitki ve hayvan pigmentasyonu ile ilgili olarak melanin oluşumu incelenmiştir. Ayrıca biyolojik ürünlerde tirozinin bulunup bulunmadığının belirlenmesinde bu enzimin kullanılabileceği saptanmıştır (39). Bertrand'ın tirozinaz ve lakkaz ile ilgili yaptığı araştırmaların ardından, polifenol oksidazlar üzerine yapılan çalışmalar oldukça artmıştır. Tirozinaz afinite kromatografisi ile saflaştırılan ilk enzimdir ve oksijeni organik bir molekülün (fenol) yapısına doğrudan katabilme özelliğine sahip enzimler arasında da ilk tanımlanan enzimdir (40).

1.9.2. Fenolik Bileşiklerin Tayin Yöntemleri

Fenolik bileşiklerin tayininde; kromatografik, spektrofotometrik, enzimatik ve biyosensörük yöntemler kullanılmaktadır. Son yıllarda da biyosensörlere dayalı analizler, araştırmaların yoğunlaştığı bir alandır. Fenolik bileşiklerin günümüzde en çok kullanıldığı tayin yöntemleri aşağıda kısaca açıklanacaktır:

1.9.2.1. Kromatografik yöntemler

Fenolik bileşiklerin tayininde kullanılan kromatografik yöntemlerin başlıcaları, yüksek basınç sıvı kromatografisi, gaz kromatografisi, kapiler elektroforez gibi yöntemlerdir.

➤ **Yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC)**

Yüksek performans sıvı kromatografisi birçok fenolik bileşiğin tayininde kullanılan analitik bir yöntemdir. Esası, polar çözücülerde çözünebilen fenolik bileşik sınıfı üyeleri HPLC ile tayin edilirler.

Yapılan bir çalışmada uygulanan metot, fenolik bileşiklerin (25 tane seçilmiş fenolik bileşiğin) tek tek ayrılmasına ve elektrokimyasal olarak maksimum duyarlı bir şekilde tayinlerine dayanmaktadır (41).

➤ **Gaz kromatografisi (GC)**

Gaz kromatografisi; kimya alanında gazların ve uçucu hale getirilebilen maddelerin ayrılmasında uygun bir metot olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Bir çalışmada; tosilat türevli fenollerin iyon-eşleşme destekli ekstraksiyon ve mikro ekstraksiyon türevlendirme teknikleri reaksiyonlarıyla işbirliği içindedir. Aynı zamanda gaz kromatografisi yüksek seçicilik ve duyarlılık göstermektedir (42).

➤ **Kapiler elektroforez**

Elektroforez, iletken bir çözelti içindeki yüklü-yüksüz parçacıkların veya moleküllerin bir elektriksel alan varlığında göç etmesine dayanan bir ayırma ve tayin yöntemidir. Kapiler elektroforezin kısa analiz süresi, küçük numune hacmi, az miktarda çözelti harcanması, ucuz olması, tekrarlanabilir olması ve kullanım alanının geniş olması gibi avantajları vardır.

Kapiler elektroforezin uygulandığı bir çalışmada g zamanı, sıcaklık, voltaj, elektrolit cinsi, organik materyalin içeriği gibi kullanılacak materyaller lignin benzeri fenolik bileşikler için Kapiler Bölge Elektroforezi' nde (CZE) optimize edilmiştir (43).

1.9.2.2. Spektrofotometrik yöntemler

➤ Folin-ciocalteu yöntemi

Bu yöntemde, numune içindeki toplam fenol miktarı folin reaktifi kullanarak kolorimetrik olarak tayin edilir. Değişen renklerin absorbansı 750nm'de spektrofotometre de okunarak tayin edilmiştir (44).

➤ 1,10-Fenantrolin yöntemi

Gıda maddelerindeki antioksidanların tayini besin maddelerinin kalitesini ortaya koyarken insan kan plazmasındaki antioksidan kapasitesinin lulmesi de çeşitli hastalıkların saptanması, kontrolü ve tedavisi için önemlidir. Toplam antioksidan tayini, bunların katıldıkları çeşitli reaksiyonların dönüşüm verimine veya hızlarına ya da her ikisine bağlı olarak yapılır. Literatürde verilen antioksidan tayinlerinde temel sınıflandırma reaksiyon tipidir. Antioksidan tayinleri elektron transferine (ET) veya hidrojen atomu transferine (HAT) dayanır (45).

1.9.2.3. Enzimatik yöntemler

Fenolik bileşiklerin tayininde genelde enzimlerin immobilize formların kullanıldığı enzimatik yöntemler denenmiştir. Buna yönelik yapılan bir çalışmada saf olarak izole edilmiş polifenol oksidaz enzimi kullanılarak kırmızı şarap içerisindeki toplam fenol miktarı tayin edilmiştir.

Enzimatik yöntemin kullanıldığı başka bir çalışmada, ayvadan izole edilen polifenol oksidaz enziminin kateşole karşı aktivitesi enzimatik yöntemle tayin edilmiştir (46).

1.9.2.4. Biyosensörük yöntemler

Fenolik bileşiklerin belirlenmesinde genelde saf enzim, doku ve mikroorganizma temelli sensörler geliştirilmiştir. Biyosensörler, uzun depo kararlılığı, kısa analiz süresi, substrat spesifikliği gibi konularda birçok avantajlara sahiptir ve tüm laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilecek yöntemlerdir. Analizlerin tekrarlanabilirliği oldukça yüksektir. Ayrıca yöntem zaman alıcı değildir, pahalı cihazlara ve kimyasallara gerek duymaz (47).

1.9.3. Bitkilerde Doğal Olarak Bulunan Fenolik Maddeler

Bugüne kadar en az 5000 tane fenolik madde tanımlanmış olup bunların 2000'den fazlası doğal flavonoidlerdir. Genelde bitkilerin yaprak, çiçek, meyve gibi canlı dokularında glikozitler şeklinde, odunsu dokularında aglikonlar şeklinde, çekirdeklerinde ise her iki formda da bulunabilmektedirler (48). Bitkiler aleminde fenolik madde içeriği en zengin olan bitkinin *Camellia sinensis* olduğu bildirilmektedir (49). Fenolik maddeler açısından meyvelerin sebzelerden daha zengin olduğu bilinmektedir. Ancak fenolik maddeler bitkiler aleminde o kadar yaygındır ki hemen her meyve ve sebze az ya da çok miktarda bulunmaktadır. Fenolik maddeler gıdaların besin değeri ve duyu kalitesi ile de yakından ilişkilidir. Düşük konsantrasyonlarda bulunmalarına rağmen gıdaları oksidatif bozulmalardan korurken yüksek konsantrasyonlarda çökerek ürünün rengini bozmaktadırlar.

Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Flavonoidler, bitkisel çayların, meyve ve sebzelerin doğal yapılarında bulunan polifenolik antioksidanlardır. Fenolik bileşiklerin bir kısmı meyve ve sebzelerin lezzetinin oluşmasında, özellikle ağızda acılık ve burukluk gibi iki önemli tat unsurunun oluşmasında etkilidirler. Bir kısmı ise meyve ve sebzelerin sarı, sarı-esmer, kırmızı-mavi tonlardaki renklerinin oluşmasını sağlamaktadırlar. Meyve ve

sebzelerin işlenmelerinde enzimatik esmerleşme gibi değişik sorunlara da neden olmaktadır. Bu özellikler meyve ve sebzeler ile bunlardan elde edilen ürünler için son derece önemlidir (48).

1.9.4. Fenolik Bileşiklerin Tayin Edilmelerinin Önemi

Bitkiler aleminde en yaygın ve en çok bulunan bileşik sınıfıdır. Bitkilerde, çiçek, yaprak, meyve renkleri, bazı bitkisel kokulardan sorumlu olmaları yanında; bitkileri haşere ve mikroorganizma saldırılarına karşı koruma görevleri de vardır. Ayrıca fenolik bileşikler bitkilerde selülozla birlikte destek dokusunu oluşturan lignin ve tannin polimerlerinin temel monomeridir (50).

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

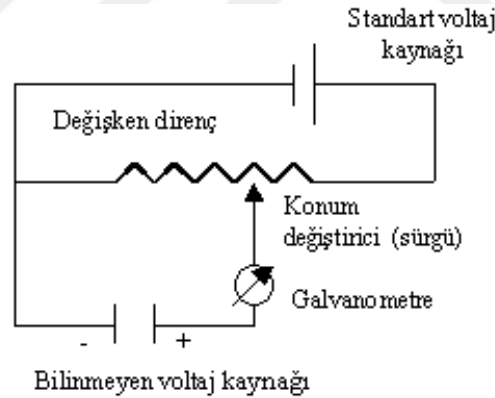
Fenolik bileşikler organik kirleticilerin büyük bir grubudurlar. Bunlar patlayıcı madde, farmasötik, plastik, kağıt, boya, ilaç, pestisit ve antioksidanların üretimi gibi birçok endüstriyel süreçte kullanılırlar (51).

Doğada 8.000'e yakın fenolik bileşik bilinmektedir. Bunlardan bazıları fenol, rezorsinol, pirogallol, orsinol, kateşol gibi basit fenoller, gallik asit, şiringik asit gibi hidroksi benzoik asitler, flavonoidler ve diğer komplike fenol ürünleridir. Bu kadar geniş bir sınıfa sahip olan fenolik bileşiklerin tayin edilmelerinde bir fenolik bileşik standart olarak kullanılmaktadır. Biyosensör yöntemi başta olmak üzere fenolik bileşiklerin tayin edilmelerinde tayinler genelde kateşol standardı kullanılarak yapılır (52).

Kateşol bitkilerde doğal olarak bulunan doğal bir fenolik bileşiktir. Gerek kimya endüstrisi gerekse medikal açıdan geniş bir yelpazede kullanım alanı bulmuştur. Deri ve kürk boyamada, kozmetikte parfümlerde ve saç boyalarında, fotoğrafçılıkta geniş bir kullanım alanına sahiptir. Ayrıca pek çok farmosötiğin aktif bileşeni olmakla birlikte önemli antioksidan maddedir (53).

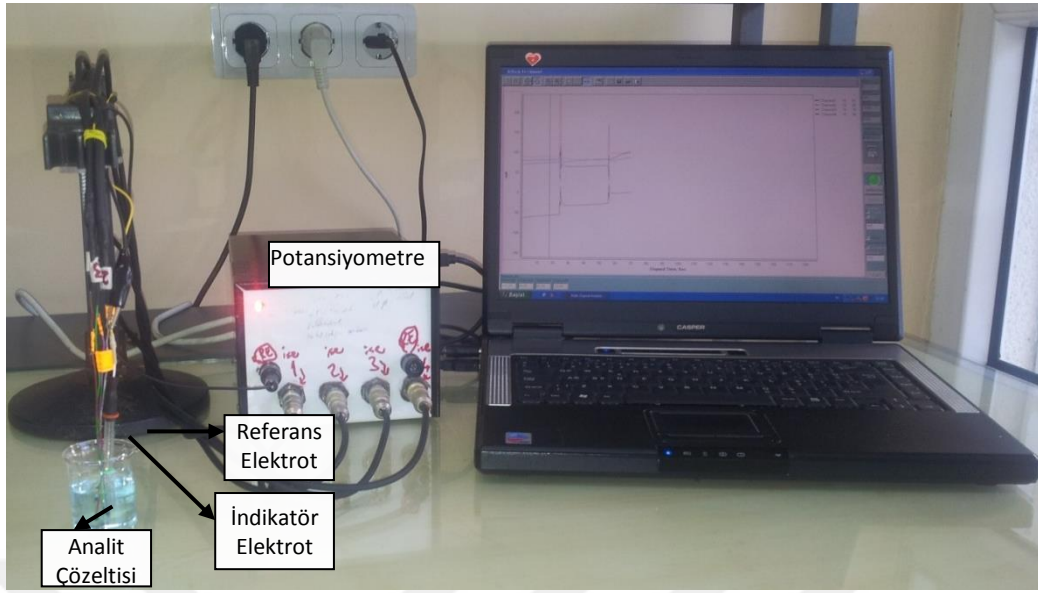
1.10. Potansiyometri

Akımın çok az geçtiği veya hiç geçmediği sistemlerde, indikatör elektrodun referans elektrota karşı gösterdiği, derişim değişimine bağlı olarak değişen potansiyelin ölçüldüğü tayin yöntemine “**potansiyometri**” ve kullanılan cihaza ise “**potansiyometre**” adı verilir. Şekil 1.19’da bir potansiyometrenin çalışma prensibi şematik olarak gösterilmiştir. Değişken direncin ayarlanması ile, standart voltajın bilinen kısmı bilinmeyen voltaja karşı işaretlenir. İki voltaj eşit olduğu an, galvanometreden herhangi bir akım geçmez. Böylelikle bilinmeyen voltaj, değişken direncin pozisyonundan okunabilir (54).



Şekil 1.19 Potansiyometrenin çalışma prensibinin şematik olarak gösterimi

Potansiyometrik sistem; bir test hücresi (analit çözeltisi), buna bağlantılı olan indikatör elektrot (değişken potansiyel) ve referans elektrot (sabit potansiyel) ile kararlı bir potansiyometreden oluşur. Bunlara “**potansiyometrik hücre elemanları**” da denir. Şekil 1.20’de bilgisayar kontrollü bir potansiyometrik ölçüm sistemi görülmektedir. Analit çözeltisine daldırılan indikatör elektrotta, mevcut iyon veya iyonların konsantrasyonuna bağlı olan bir potansiyel değişimi meydana gelir. Dolayısıyla potansiyel değişimi ölçülerek iyonların konsantrasyonları tayin edilebilir.

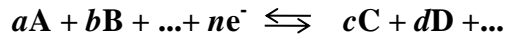


Şekil 1.20 Bilgisayar kontrollü potansiyometrik ölçüm sistemi

1.11. Potansiyometrik Tayin İlkesi

Modern bir iyon seçici elektrotta, iyon-seçici membran iç standart ve test çözeltisindeki iyonları birbirinden ayırır. Elektronlar, basit iyonlar veya test edilen iyonun yüklü ya da nötral kompleksleri, membranın iç kısımlarına doğru iç standart çözeltinin kompozisyonuyla orantılı olarak taşınırlar. Böylece oluşan elektrostatik motor kuvveti (EMK), standart referans elektrot yarı hücresiyle membran elektrot yarı hücresi birleştirilerek ölçülür (55).

Konsantrasyon ile elektrot potansiyeli arasındaki ilişki aşağıdaki gibidir.



tersinir yarı reaksiyonu ele alındığında, bir elektrodun potansiyel farkı (E), Nernst (Nernstian) Eşitliğiyle verilmiştir (56).

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[C]^c [D]^d \dots}{[A]^a [B]^b \dots}$$

E: İndikatör elektrot potansiyeli

E°: Standart elektrot potansiyeli

R: Gaz sabiti, 8,314 J.mol⁻¹.K⁻¹

T: Sıcaklık, kelvin (0 °C için 273,15 K)

F: Faraday sabiti = 96486 J.volt⁻¹

[A], [B], [C] ve [D]: Elektrotta hissedilen iyon aktiviteleri

a, b, c ve d : Yarı reaksiyonda yer alan her bir türün mol sayısı

n: Alınır-verilen elektron sayısı veya membrandaki aktif iyon yüküdür.

a_i İyon aktivitesi olmak üzere, eşitlik tek bir iyon için yazılırsa, aşağıdaki gibi olur.

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln a_i$$

Eğer iyon aktivitesi a₁'den a₂'ye değişirse potansiyel değişimi aşağıdaki gibi olur.

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_2}{a_1}$$

Eşitliğe göre; çözeltilerde iyon aktivitesinin artması sonucu elektrodun cevabı logaritmik olarak gözlenir.

$$E = E^0 - \frac{2,303 \cdot RT}{nF} \log \frac{a_2}{a_1}$$

Eğer ölçümler 25 °C'de alınırsa, sabit sayılar yerine yazıldığında Nernst Eşitliği aşağıdaki gibi olur.

$$E = E^0 - \frac{0,0592}{n} \log \frac{a_2}{a_1}$$

Buna göre 25 °C'de her Logaritmik birim başına teorik değişim n yüklü iyonlar için 59,2/n mV'dur. Bu değişim genel olarak katyonlar için pozitif anyonlar için negatiftir. Dolayısıyla ±1 yüklü, ±2 yüklü ve ±3 yüklü iyonlar için bu değer sırasıyla 59,2 mV, 29,6 mV ve 19,8 mV olur (55).

1.12. Referans Elektrotlar

Bir hücrede kullanımı sırasında potansiyeli değişmeden kalabilen elektrotlara “referans elektrotlar” denir. Bu elektrotlara “standart elektrotlar” da denir. Diğer bir deyişle elektrot potansiyeli tam olarak bilinen bir yarı hücredir. Referans elektrotların potansiyeli, üzerinde çalışma yapılan çözeltiliye bağlı değildir. İncelenen çözeltilide bulunan analitin veya diğer iyonların konsantrasyonundan etkilenmez. Fakat sıcaklık değişimlerinde referans elektrotların potansiyelleri bir miktar değişir. En yaygın kullanılan referans elektrotlar, kalomel elektrot ve gümüş/gümüş klorür elektrotlardır (55).

1.12.1. Standart Hidrojen Elektrodu

Yaygın bir şekilde kullanılacak ve faydalı olacak bağıl elektrot potansiyeli verilerini elde edebilmek için, bütün diğer elektrotlarla karşılaştırabileceğimiz uygun bir referans yarı-hücreye sahip olmalıyız. Böyle bir elektrot kolayca yapılabilir, tersinir olmalı ve yüksek tekrarlanabilirliğe sahip olmalıdır. Standart hidrojen elektrot (SHE) bu özelliklere sahiptir ve yıllardır dünyanın her yerinde uluslararası referans elektrot olarak kabul edilmektedir. Hidrojen elektrot tipik bir gaz elektrotudur.

Metal iletken, ince öğütülmüş platin (platin siyahı) ile kaplanmış veya platinlenmiş bir platin parçasıdır. Bu elektrot, bilinen ve sabit hidrojen iyonu aktivitesine sahip sulu bir asit çözeltisine daldırılır. Elektrot yüzeyine sabit basınçta hidrojen gazı gönderilerek çözelti hidrojen ile doymun tutulur. Platin, elektrokimyasal reaksiyonlara katılmaz, sadece elektronların aktarılmasına yardımcı olur. Bu elektrotta gelişen potansiyel için yarı-reaksiyon şöyledir:

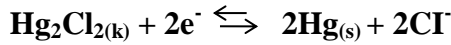


Bir hidrojen elektrodun potansiyeli, sıcaklığa ve çözeltildeki hidrojen iyonunun ve moleküler hidrojenin aktivitesine bağlıdır. Moleküler hidrojenin aktivitesi ise, çözeltiliye hidrojenle doymun tutmak için kullanılan gazın basıncıyla orantılıdır. SHE için, hidrojen iyonu aktivitesi tam bir olup gazın kısmi basıncı bir

atmosferdir. Geleneksel olarak, standart hidrojen elektrodun potansiyeli bütün sıcaklıklarda sıfır kabul edilir. Bu tanımın sonucu olarak, standart hidrojen elektrot ve bir başka elektrot içeren bir galvanik hücrenin potansiyeli, diğer elektrodun potansiyeli olarak kabul edilir (55).

1.12.2. Kalomel Elektrot

Kalomel elektrot referans olarak çok kullanılan bir elektrottur. Elektrotta gerçekleşen reaksiyon şu şekildedir;



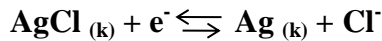
Reaksiyonda potansiyel, klor iyonu derişimine bağlıdır.

$$E = E^0 - \frac{0,0592}{n} \log[\text{Cl}^-]^2$$

Yukarıdaki tepkimeye göre elektrotta oluşan klorür ortamda bulunan Hg(I) iyonu ile tepkimeye girer ve klorür derişiminin sabit kalmasını sağlar. Bunun sonucu olarak da Nernst Eşitliğine göre potansiyelinin ($E = 0,2444 \text{ V}$) sabit kalması sağlanmış olur. KCl ile doymuş kalomel elektroda, “**doymuş** veya **doymun kalomel elektrot (DKE)**” denir.

1.12.3. Gümüş/Gümüş Klorür Elektrot

Gümüş/gümüş klorür elektrot, genellikle bir gümüş veya platin tel yüzeyine gümüş klorür kaplanmasıyla hazırlanır. Elektrot reaksiyonu şu şekildedir;



$$E = E^0_{\text{AgCl/Ag}} - 0,059 \log [\text{Cl}^-]$$

Elektrot potansiyeli görüldüğü gibi klorür derişimine bağlıdır. Elektrotta indirgenme veya yükseltgenme tepkimeleri sonucu oluşabilecek potansiyel

değişimine karşı, ortamda bulunan potasyum klorür tampon görevi yapar. Bu elektrodun potansiyeli 25 °C’de 0,1990 V’dir.

1.13. İyon-Seçici Elektrotlar

Birçok iyon yanında sadece tek bir iyonla cevap sergileyen elektrotlara “**iyon-seçici elektrotlar (ISE)**” denir. İyon-seçici elektrotlar, serbest iyonun aktifliğine duyarlıdır. İyonik şiddet sabit tutulursa konsantrasyon aktiflikle doğru orantılı olduğundan ISE ile konsantrasyonlar ölçülmüş olur. Hiçbir elektrot sadece tek bir iyon çeşidine cevap vermez, fakat bir iyonla karşı bilinen bir seçicilik gösterir (55).

1.13.1. İyon-Seçici Elektrotların Sınıflandırılması

1. Cam iyon-seçici elektrotlar
2. Metalik (katı-hal) iyon-seçici membran elektrotlar (I., II. ve III. Sınıf)
3. Kaplama tel elektrotlar
4. Sıvı-hal iyon-seçici elektrotlar
5. Gaz ve enzim elektrotlar
6. İyon-seçici alan etki transistörleri (ISFET)
7. Kompozit elektrotlar
8. Sıvı-membran iyon-seçici elektrotlar (polimer-membran elektrotlar)

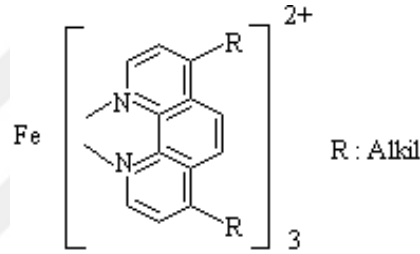
1.13.1.1. Sıvı-Membran İyon-Seçici Elektrotlar

Sıvı esaslı iyon-seçici elektrotların çalışma prensibi katı-hal ve cam elektrotları ile aynıdır. İyona bağlı bir membran potansiyelinin oluşabilmesi için, membranın her iki yüzeyinde bir iyon değişim dengesi mevcut olmalıdır ve potansiyelin ölçülebilmesi için membrandan çok küçük bir elektrik akımının herhangi bir şekilde geçebilmesi gerekir. Cam elektrotta bu akım, cam içerisindeki hareketli H_3O^+ iyonları ile olur. Sıvı membranlarda ise, membran içinde hareketli anyon veya katyonlar vasıtasıyla akım taşınır (56). Sıvı-membran elektrotlarda, membran hidrofobik bir iyon değiştirici emdirilmiş sıvıdır. İyon değiştiricilerin genel özelliği zıt işaretli yüklü bölgelerinden ve organik nötral bölümlerinden küçük

iyonları bağlama yeteneğine sahip olmalarıdır. Membran yüzeyinde iyon-değişim işlemi daha hızlıdır. Elektrodun seçiciliği özellikle bu iyon değişim işlemi sırasında oluşan kompleksin kararlılığına bağlıdır.

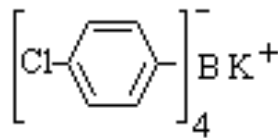
Genellikle membran içerisinde iyon değişimini sağlayan aktif maddeler; organik iyon-değiştiriciler, şelat halkalı yapılar ve iyonofor özellikteki maddelerdir (55). Bu maddeler yüklerine göre üç grupta toplanırlar;

Pozitif yüklü iyon-değiştiriciler: Anyon duyarlı maddelerdir. Örneğin; Cl^- , NO_3^- , CO_3^{2-} gibi anyonlar için tetraalkilamonyum tuzları iyon-değiştirici olarak kullanılır. Yine ClO_4^- , NO_3^- gibi anyonlar için Şekil 1.21’de yapısı gösterilen o-fenantrolin tuzları iyon-değiştirici olarak kullanılır.



Şekil 1.21 o-fenantrolin’in yapısı

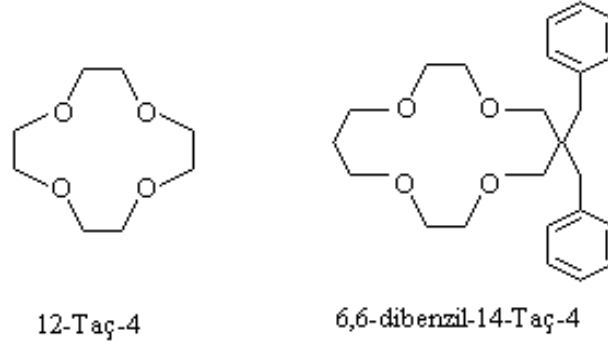
Negatif yüklü iyon-değiştiriciler: Katyon duyarlı maddelerdir. Örneğin; K^+ için Şekil 1.22’de yapısı gösterilen potasyum tetrakis (p-klorofenil) borat (KTpClPB) tuzu iyon-değiştirici olarak kullanılır.



Şekil 1.22 Potasyum tetrakis (p-klorofenil) borat’ın yapısı

Nötral taşıyıcı iyon-değiştiriciler: Katyon duyarlı maddelerdir. Örneğin; K^+ ve NH_4^+ için makrosiklik yapıdaki valinomisin ve nonaktin, Na^+ ve K^+ için polisiklik eterler (taç eterler), Ca^{2+} ve Li^+ için sentetik bazı iyonoforlar iyon-

değiştirici olarak kullanılır. Şekil 1.23’de lityum iyonu için kullanılan bazı iyonofor maddeler görülmektedir.

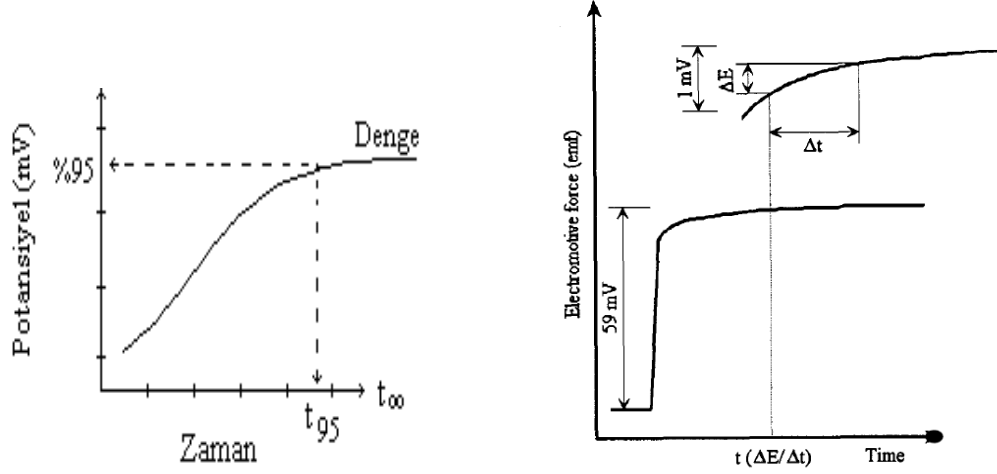


Şekil 1.23 Bazı lityum iyonoforların yapısı

1.13.2. İyon-Seçici Elektrotların Performansına Etki Eden Faktörler

1.13.2.1. Cevap Zamanı

İyon-seçici elektrotlarda cevap zamanı genel olarak membranın duyarlı kısmıyla çözültideki iyonun dengeye gelmesi için geçen zaman olarak bilinir. Uluslararası Kuramsal ve Uygulamalı Kimya Birliği’ne (IUPAC) göre (56) ise; dengeye gelme zamanının % 95’i olarak alınır ve t_{95} olarak gösterilir (denge potansiyelinin de %95’ine t_{95} karşılık gelir). Ayrıca deneysel koşullar veya gereksinimleri temeline bağlı olarak belirlenen $\Delta E/\Delta t$ oranına karşılık gelen zaman değeri olarak da kabul edilebilir. Şekil 1.24’de IUPAC’a göre cevap zamanının belirlenmesi grafiksel olarak gösterilmiştir.

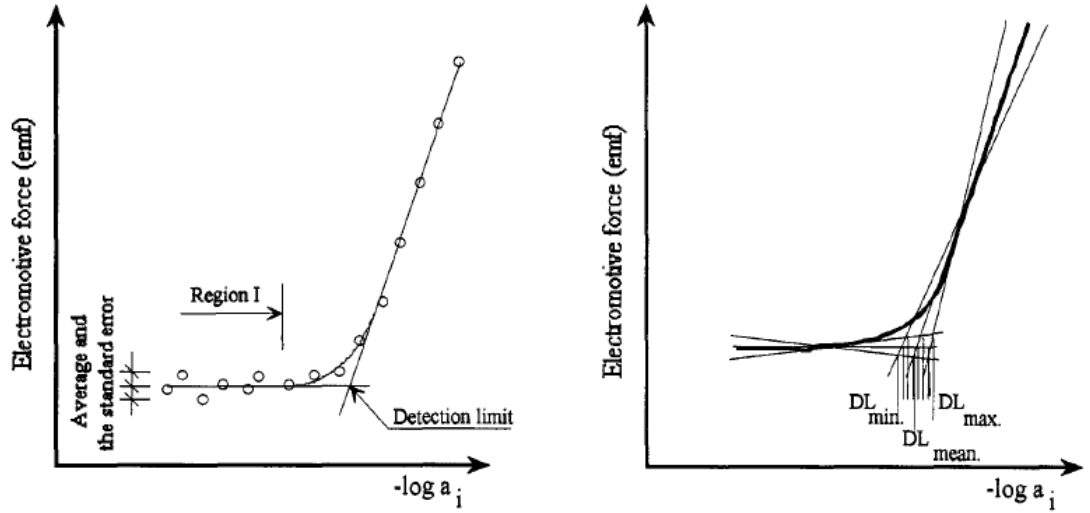


Şekil 1.24 IUPAC'a göre cevap zamanı

Girişim yapan iyonlar, bir Nernst potansiyel farkı oluşması için taşınması gereken iyonların aktif elektrot yüzeyine ulaşmalarını geciktirir ve cevap zamanını etkiler.

1.13.2.2. Tayin Limiti

İyon-seçici elektrotların tayin limiti, membran ara fazında ölçülebilir bir potansiyel farkı meydana getiren en düşük iyon aktivitesi (veya konsantrasyonu) olarak tanımlanır. IUPAC'a göre (57) çoğunlukla tayin limiti, anyon ve katyonlara duyarlı elektrotlarda, elektrodun doğrusal değişim sergilediği aralığın ekstrapolasyonu ve cevap sergilediği en düşük aktivite (veya konsantrasyon) bölgesinin ekstrapole edilmesi sonucu kesişen noktaya karşılık gelen madde miktarı olarak kabul edilmiştir. Bu limit minimum ve maksimum limitler olarak da ifade edilebilir. Şekil 1.25'de IUPAC'a göre tayin limiti grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.25 IUPAC'a göre tayin limiti

Çoğu iyon-seçici elektrot için tayin limiti 10^{-6} mol.L⁻¹ civarındadır. Bazılarında ise 10^{-8} mol.L⁻¹'e kadar düşebilir. Bu limitler, ortamda bulunan girişim yapan iyonlar ve moleküller ile ters yönde etkilenebilir (derişik sulu çözeltilerde su molekülleri iyonların hidrofobik membrana girişini önler ve tayin limiti ters yönde etkilenir).

1.13.2.3. Seçicilik

Seçicilik ilk kez Nicolsky tarafından aşağıdaki eşitlikle verilmiştir. Pek çok ISE çoğunlukla aşağıdaki eşitliğe uygun davranır (57).

$$E = E^0 + \frac{0,0592}{n} \log a_x + \sum k_{x,y}^{pot} a_y^{n_x/n_y}$$

a_x = Ölçülecek iyonun aktivitesi

a_y = Girişim yapan iyonun aktivitesi

n_x, n_y = Herbir türün yükü

$k_{x,y}^{pot}$ = Seçicilik katsayısı

Denklem, bir elektrodun ölçülecek iyonu X 'e ve bütün girişim yapan iyonlara cevabını gösterir. Elektrodun farklı iyonik türlere karşı (Y) duyarlılığı seçicilik katsayısı ile belirlenir.

Seçicilik katsayısı ($k_{x,y}^{pot}$) büyüdükçe elektrodun ölçülecek iyondu duyarlılığı azalır ve log ax-potansiyel grafiği yataya doğru gider. Girişim yapan iyonun yokluğunda Nernst değişimi gözlenir. Seçicilik katsayısı;

1. Ayrı çözelti metodu,
 2. Ana iyonun girişim yapan iyon çözeltisine ilavesi metodu,
 3. Girişim yapan iyonun ana iyon çözeltisine ilavesi metodu ile hesaplanabilir
- (55). Seçicilik katsayısının hesaplanmasında metotlardan herhangi birisi kullanılabilir.

1.13.3. İyon-Seçici Elektrotların Uygulamaları

İyon-seçici elektrotlar genellikle dört farklı analitik uygulamada yaygın olarak kullanılır. Bunlar;

1. Doğrudan ölçümlerde,
2. Potansiyometrik titrasyonların dönüm noktalarının tayininde,
3. Denge sabiti ve buna bağlı fiziksel sabitlerin hesaplanmasında,
4. Hareketli ortamlarda dedektörler olarak kullanılırlar.

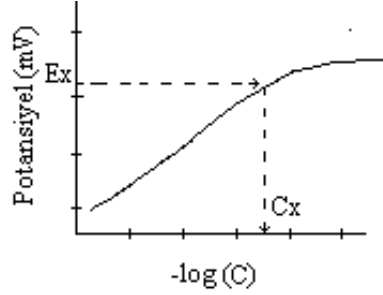
1.13.3.1. Doğrudan Ölçümler

İyon-seçici elektrotlar analit konsantrasyonlarını doğrudan ve seçimli olarak ölçmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (56). Doğrudan ölçüm yöntemlerinden en sık kullanılanı, ölçümü yapılan bir iyonun konsantrasyonuna karşı ölçülen potansiyelin grafiğe geçirilmesiyle alınan kalibrasyon eğrisini içerir.

Kalibrasyon eğrisi yöntemi oldukça doğru sonuç verir. Fakat yorucudur, fazlaca ölçüm gerektirir. Kalibrasyon almak için kullanılan standart çözeltilerin konsantrasyonlarının, test çözeltilerinde ölçümü yapılan iyonun konsantrasyonuna

yakın olması doğruluğu daha da artırabilir. Şekil 1.26'da basit bir kalibrasyon grafiği görülmektedir.

Bu yöntemle iyon-seçici elektrot ile doğrudan ölçülen analit potansiyeline (E_x) karşılık gelen bilinmeyen konsantrasyon (C_x) kalibrasyon grafiği ile tayin edilebilir.



Şekil 1.26 Basit bir kalibrasyon grafiği

Doğrudan ölçüm yöntemlerinden bir diğeri de standart ekleme metodudur. Bu metod, bilinen hacimdeki bir analit çözeltisine standart çözeltinin bilinen hacimde ilavesinden önce ve sonra elektrot sisteminin potansiyelinin tayinine dayanır.

Standart ekleme yönteminin kalibrasyon yöntemine göre avantajı; matriks etkisinden kaynaklanabilecek girişimlerin en aza indirgenmiş olmasıdır. Numune ihtivası kalibrasyonda birbirinden farklı iken, standart eklemede aynı ortam şartları sağlanır.

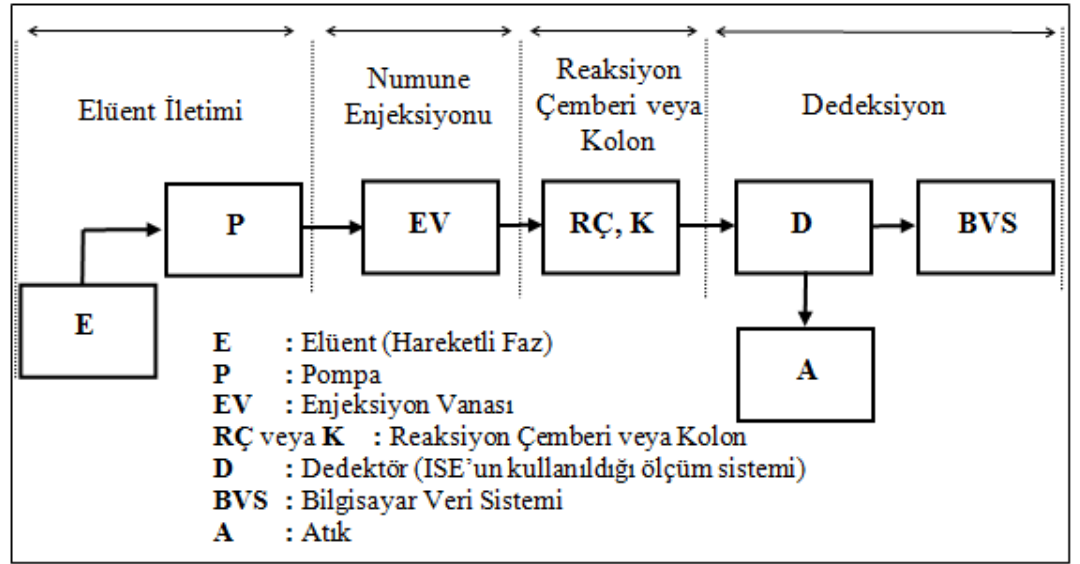
1.13.3.2. Potansiyometrik Titrasyonların Dönüm Noktalarının Tayini

Potansiyometrik titrasyonlar, titrant hacminin fonksiyonu olarak uygun bir iyon-seçici elektrot ile potansiyel değişiminin ölçülmesi olayı olarak bilinir. Kimyasal indikatörlerin kullanıldığı titrasyonlardan elde edilen verilerden daha makul sonuçlar verirler ve özellikle renkli veya bulanık çözeltilere de uygulanabilirler. Bu yolla;

1. Potansiyometrik çöktürme titrasyonları
2. Kompleks oluşum titrasyonları
3. Nötralleşme titrasyonları
4. Redoks titrasyonlarının dönüm noktaları tayin edilebilmektedir (56).

1.13.3.3. İyon-Seçici Elektrotların Hareketli Ortamlarda Kullanılması

Elektrotların potansiyometrik bir dedektör olarak hareketli ortamlarda kullanımı yaygınlaşmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, PVC’de temel teşkil eden ve iç referans çözeltinin kullanılmadığı katı-hal kontakt tipi sıvı-membran iyon seçici elektrotların yaygınlık kazandığı gözlenmektedir. İyon kromatografisi ve akış yolu-enjeksiyonu yöntemleri ile potansiyometrik tayinlerde en fazla iyon-seçici elektrotlar kullanılmaktadır (58). İyon seçici elektrotların dedektör olarak kullanıldığı bir hareketli ortam ölçüm sistemi Şekil 1.27’de görülmektedir.



Şekil 1.27 Hareketli ortamda ölçüm sistemi

Genel olarak, ISE akış yolu üzerine ya bir kromatografik kolondan hemen sonra veya reaksiyon çemberinden hemen sonra yerleştirilerek seçici olarak tayin amaçlanır (58).

1.14. Çalışmanın Amacı

Biyosensörler genel olarak, biyolojik yapıdaki analitleri hisseden sensörler veya reseptör birimi biyomoleküler yapıda olan sensörlerdir. Genellikle biyolojik analitlerin tayinlerinde yaygın olarak kullanılan biyoanalitik cihazlardır. Yüksek seçiciliklerinden dolayı biyoloji, kimya, biyokimya, mühendislik gibi pek çok bilim

alanında tercih edilmektedirler. Son yıllarda bilim ve teknolojiadaki hızlı gelişmeler farklı yapı ve performanslara sahip yeni biyosensör tasarımlarının ortaya çıkmasına neden olmuştur. Biyosensörler sayesinde normalde uzun süren işlemler gerektiren analizler daha kısa sürede yapılabilmektedir. Örneğin glikoz biyosensörleri kandaki glikoz seviyesini kısa sürede ölçebilmektedir. Aynı ölçüm normalde geleneksel yöntemlerle daha uzun sürede yapılabilmektedir. Kısa sürede sonuca ulaştırması ve uygulama kolaylığı biyosensörlerin en önemli avantajlarından (1-4).

Biyosensör tasarımında genellikle seçici materyal olarak analite doğrudan veya dolaylı olarak yüksek seçicilik sergileyen enzimler tercih edilmektedir. Tasarlanmak istenen biyosensör için öncelikle uygun bir substrat seçilir. Bu substratın kendine özgü enzim ile verdiği özel reaksiyon sırasındaki fiziksel ve/veya kimyasal değişimlerden yararlanılarak uygun bir sensör tasarımı yapılır. Bu reaksiyon sırasında oluşan değişimlere (elektron transferi, oluşan ürünler v.b.) ait enstrümental sinyaller ölçülerek analizler gerçekleştirilir. Bu tür analizler genellikle dolaylıdır. Örneğin ürüne seçici kimyasal sensör kullanılarak ilgili substratın miktarı tayin edilebilir (1, 6).

Literatürde ve ticari olarak çoğunlukla biyosensörler amperometrik ölçüme dayalı tasarlanmaktadır. Amperometrik biyosensörlerin kısa kullanım ömürleri (genellikle kullan at tipi), dar çalışma ve doğrusal aralıkları, yüksek tayin limitleri gibi bazı dezavantajlara sahip olması alternatif diğer yöntemlerin de sıklıkla kullanılmasına ihtiyaç oluşturmuştur (20). Bu yöntemlerden birisi olan potansiyometrik yöntem uygulanabilirliği oldukça kolay, hızlı, hassas ve ekonomik bir yöntemdir. Potansiyometrik yöntemler sulu çözeltilerdeki iyonik türlerin tayinlerinde iyon-seçici elektrotların kullanımıyla yaygın olarak uygulanmaktadır (57).

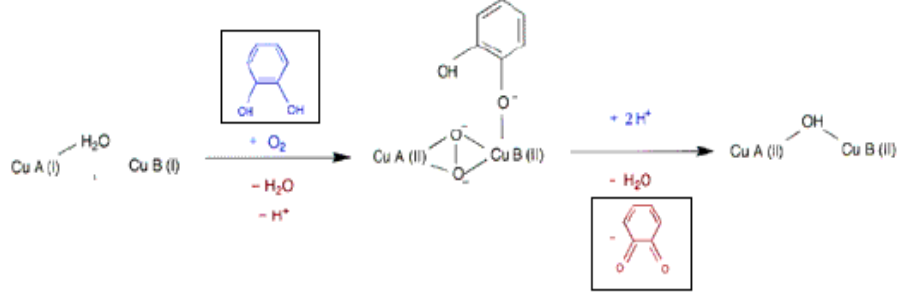
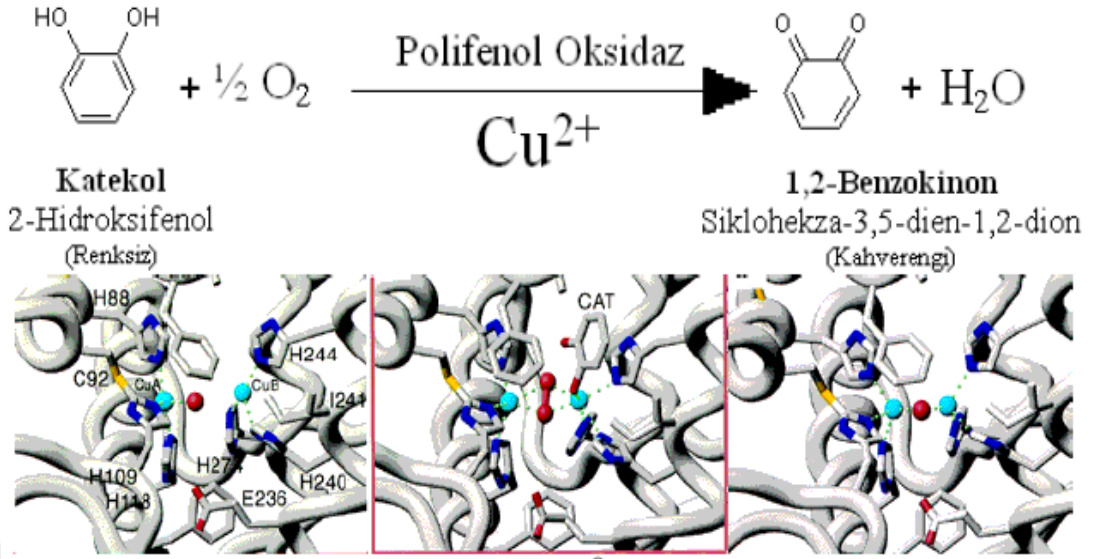
Moleküler ya da iyonik türlerin çok çeşitli çevre, endüstriyel ve biyolojik numunelerde doğru, hassas ve hızlı tayinleri önem arz etmektedir. Son yıllarda yeni tür iyonofor özellikteki bileşiklerin sentezlenmesi sonucunda potansiyometrik iyon seçici sensörlerin analitik alanında kullanımı çok hızlı bir şekilde gelişim göstermiştir. Sensörler ile ilgili çalışmalar, hazırlanmaları daha kolay olan iyon-seçici polimer membran elektrotların ortaya çıkmasıyla çeşitlilik kazanmıştır. Bu tür

sensörler biyosensörlerin alt yapısını oluşturmak üzere yaygın şekilde kullanılmaya başlanmıştır (1-5).

İyon seçici elektrotlar biyosensör tasarımında dolaylı ölçüm için oldukça avantaj sağlayan konumdadırlar. İyon-seçici elektrotlarla ilgili yapılan araştırmaların önemli bir bölümü bir çok iyon yanında sadece bir iyon seçicilik gösteren elektrotlar üzerinedir. Dolayısıyla bugün çok sayıda anyon ve katyona duyarlı iyon-seçici membran elektrotlar geliştirilmiştir. Son yıllarda elektrot teknolojisinin gelişmesiyle birlikte, PVC temelli sıvı-membran iyon-seçici elektrotlar kullanılarak, oldukça seçici, tekrarlanabilir sonuçlar veren metotlar geliştirilmiştir (57).

Laboratuvarlarımızda hazırladığımız PVC-membran elektrotlar bilinen yöntemlerden farklılık göstermektedir. Elektrotlar, membran kokteylinin bir katı kontak yüzeyine yerleştirilmesi ile hazırlanmaktadır. Hazırlanan elektrotlar bütünüyle katı-hal olduklarından (iç referans elektrot ve iç referans çözelti bulundurmamakta) istenilen küçüklükte ve tipte hazırlanmaya izin vermektedir. Bu şekilde çok daha basit ve ekonomik iyon-seçici elektrotlar hazırlamak mümkün olmaktadır (57).

Fenolik bileşiklerin toksik özelliklerinden dolayı çok düşük konsantrasyon seviyelerinde tayin edilmesi önem arz etmektedir. Polifenol oksidaz enzimi fenolik türler için genel spesifik bir enzim olarak bilinmektedir. Fenolik bileşiklerin tayin edilmelerinde enzim olarak, substrat olan fenolik bileşiği moleküler oksijeni kullanarak dönüşüme uğratan polifenol oksidazlar kullanılmaktadır. Fenolik bileşiklerden biri olan kateşolün polifenol oksidaz katalizörlüğünde benzokinona dönüşüm reaksiyonu aşağıda görülmektedir. Reaksiyon sırasında açığa çıkan hidronyum iyonlarından dolayı ortamın pH değeri değişmektedir. Reaksiyondan önce ve sonra pH değişimi izlenirse kateşol miktarı dolaylı olarak tayin edilebilir (33,34, 35).



Çalışmamızda laboratuvarımızda tasarladığımız potansiyometrik katı-hal mikro pH sensörlerin (Quinhidron, PVC ve PVC-NH₂ temelli) yüzeyine glutaraldehitte çapraz bağlama metodu ile polifenol oksidaz enzimi immobilize edilerek fenol duyarlı biyosensörlerin tasarlanması ve potansiyometrik performanslarının araştırılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasallar

Tetrahidrofuran (THF), yüksek molekül ağırlıklı polivinilklorür (PVC), o-nitrofeniloktiletler (NPOE), potasyumtetrakis(p-kloro)fenilborat (KTpCIPB) ve grafit, Fluka firmasından, 1,4 -diaminobütan, trietilamin, metil alkol, polimetilmetakrilat, dioktilsebatat (DOS), akrilik asit, quinhidron ve potasyumdihidrojenfosfat, dipotasyummonohidrojenfosfat Merck firmasından, glutaraldehit, polifenol oksidaz, kateşol, fenol, o-krezol, p-krezol ve m-krezol Sigma Aldrich firmasından sağlandı.

2.1.2. Cihaz ve Ekipmanlar

Potansiyel ölçümleri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ömer ANDAÇ'ın desteği ve sensör araştırma laboratuvarımız ortak projesi (Giresun Üniversitesi FEN-BAP-A-160512-36 nolu) ile tasarlanan ve bilgisayar programı ile desteklenmiş çok kanallı potansiyometre cihazıyla gerçekleştirildi. Referans elektrot olarak Basi-MF-2079-RE-5B marka Ag/AgCl elektrot kullanıldı. Tartım işlemleri için Shimadzu (model AUX220) marka analitik terazi kullanıldı. Deiyonize su Sartorius Stedim (Arium*611UV) marka ultra deiyonize su cihazından temin edildi. Tampon çözeltilerin pH değerlerinin ayarlanmasında Hanna pH 211 marka pH-metre ve Sentex marka cam elektrot kullanıldı.

2.2. Metot

2.2.1. Çalışma Yöntemi

İlk olarak biosensörlerin alt yapısını oluşturan pH sensörler hazırlandı ve karakterize edildi. Daha sonra pH sensörler yüzeyine enzim immobilizasyonu

gerçekleştirilerek mikro biyosensörler hazırlandı. Hazırlanan mikro biyosensörlerin potansiyometrik davranışları (doğrusal değişim aralıkları, cevap zamanları, kullanım ömürleri, tayin limitleri, sıcaklık, tampon ve pH çalışma aralıkları) araştırıldı. Bütün biyosensörler kullanılacağı zamana kadar fosfat tampon (1 mM, pH=7,0) içerisinde ve 4 °C sıcaklıkta saklandı. Alınan ölçümlerde biyosensörlerde meydana gelen potansiyel değişimleri, biyosensör ve referans elektrodun bir hücrede 5 mL'lik çözeltiliye aynı derinlikte daldırılmasıyla gerçekleştirildi. Her ölçümden önce biyosensörler ve referans elektrot deiyonize su ile yıkandı. Ölçümler çoğunlukla 10^{-2} - 10^{-5} mol.L⁻¹ derişim aralığındaki çözeltiler kullanılarak yapıldı.

2.2.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Standart pH çözeltileri olarak fosfat tamponları tercih edildi. Fosfat tamponları, 1 mM olacak şekilde fosfatın potasyum tuzlarından hazırlandı ve istenilen pH'ya pH-metre yardımıyla ayarlandı. Değişik pH'lardaki 1 mM fosfat tamponu içerisinde konsantrasyonları 0,1'er M olacak şekilde kateşol, fenol, p-krezol, o-krezol, m-krezolun stok çözeltileri hazırlandı. Daha sonra stok çözeltilerden istenilen konsantrasyonlara aynı tampon çözelti kullanılarak seyreltildi.

2.2.3. PVC- NH₂ Sentezi

250 mL'lik bir balona 1,43 gram PVC alındı ve üzerine 11,5 mL 1,4-diamino bütan ve 3,5 mL trietilamin ilave edildi. Bu karışım üzerine 35 mL metil alkol ilave edilerek geri soğutucu altında 3,5 saat reflaks işlemi yapıldı. Bu işlemden sonra oluşan sarı renkli madde ilk önce metanol ile sonra sırası ile su, derişik HCl ve su ile yıkandıktan sonra son olarak metanol ile yıkanarak kurutuldu. Elde edilen sarı renkli polimer madde PVC-NH₂ olarak kullanıldı (59).

2.2.4. Mikro Katı-Hal Kompozit pH Sensörlerin Hazırlanması

Tablo 2.1'de katı-hal kompozit pH sensör hazırlamak için uygulanan oranlar verilmiştir (60).

Tablo 2.1 Mikro katı-hal pH sensörler için kullanılan kompozit oranları

Bileşenler	Kompozit İçindeki Oranları (% a/a)			
	pH-1	pH-2	pH-3	pH-4
Polimetilmetakrilat (PMMA)	40	40	-	-
Grafit	40	40	40	40
Quinhidron	20	10	-	-
PVC-NH ₂	-	10	-	-
Membran sıvısı A (%30 PVC-NH ₂ + %70 NPOE)	-	-	59	-
Membran sıvısı B (%30 PVC-NH ₂ + %70 DOS)	-	-	-	59
KTpClPB	-	-	1	1

Tablo 2.1’de pH-1 ve pH-2 olarak adlandırılan sensörlerin hazırlanmasında, gerekli miktarlarda tartılan bileşenler akrilik asit içerisinde viskoz hale gelene kadar karıştırıldı. pH-3 ve pH-4 olarak adlandırılan sensörlerin hazırlanmasında gerekli miktarlarda tartılan bileşenler THF içerisinde çözülerek membran sıvıları hazırlandı. Gerekli miktardaki grafit üzerine membran sıvısı ilave edildi ve homojen karışım elde edilinceye kadar karıştırıldı. Dış kısımları polimerik izolasyona sahip bakır kabloların (0,5–1,0 mm çapında ve 5–10 cm uzunluğundaki) uçlarındaki metalik mikro açıklığa yukarıda bahsedilen homojen karışımlar kaplandı. Karanlıkta ve oda sıcaklığında 2 gün süreyle kurumaya bırakıldı. Bu şekilde hazırlanan katı-hal kompozit pH sensörlerin potansiyometrik davranışları standart fosfat tampon (1 mM, pH= 2–11) çözeltileriyle test edildi.

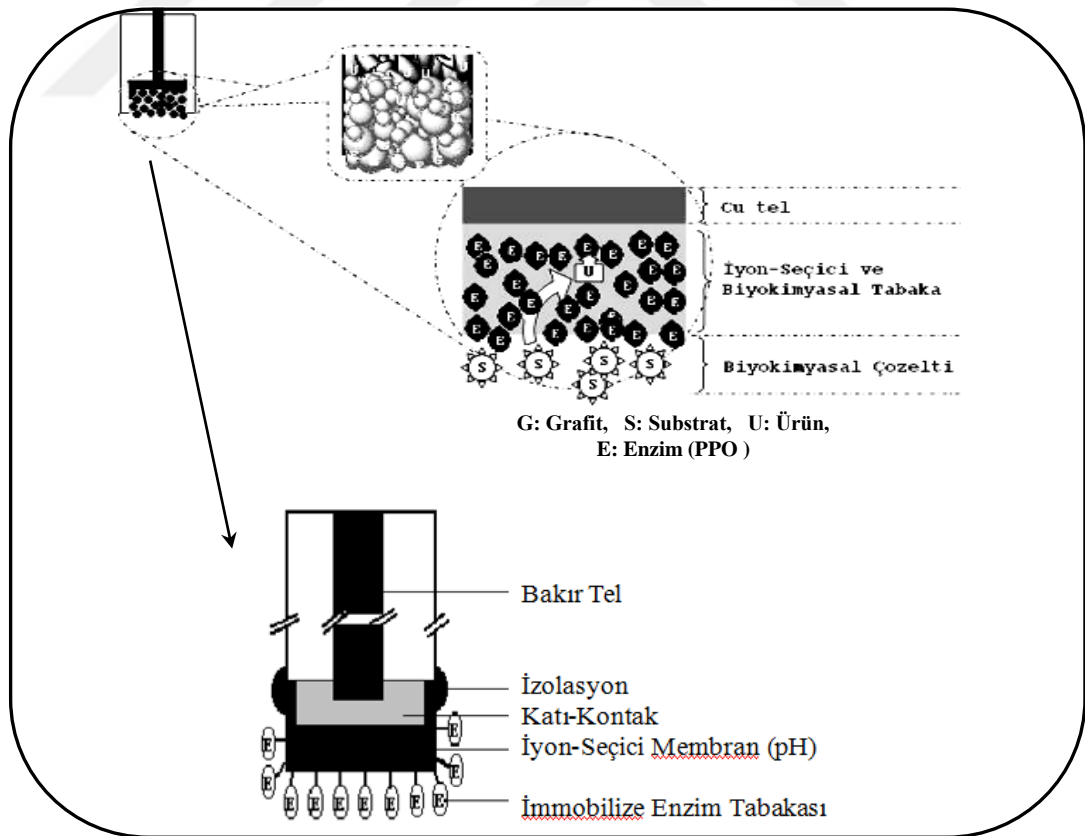
2.2.5. Fenollere Duyarlı Mikro Biyosensörlerin Hazırlanması

Geliştirilen katı-hal kompozit pH sensörlerin yüzeyine polifenol oksidaz (PFO) enzimi immobilize edildi (tutuklandı). Tablo 2.2’de hazırlanan fenol duyarlı mikro biyosensörlerin içerikleri verilmiştir.

Tablo 2.2 Hazırlanan fenol duyarlı mikro biyosensörlerin içerikleri

Çalışmada Verilen Ad	Sahip olduğu pH Sensör türü
Biyosensör A	pH-1 tipi (PMMA+Grafit+Quinhidron)
Biyosensör B	pH-2 tipi (PMMA+Grafit+Quinhidron+PVC-NH ₂)
Biyosensör C	pH-3 tipi (Grafit+ PVC-NH ₂ +NPOE)

2,3 mg PFO, 500 µL fosfat tamponunda (1 mM, pH=7,00) çözülerek enzim çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan enzim çözeltisinin 20 µL'si ile 7 µL glutaraldehit çözeltisi (%2,5 (a/a)) karıştırılarak tutuklama ortamı hazırlandı. Mikro katı-hal kompozit pH sensörler bu çözelti içerisinde beklemeye bırakıldı (karanlıkta ve 4 °C sıcaklıkta 24 saat süreyle). Son olarak, katı-hal fenol duyarlı mikro biyosensörler fosfat tamponuyla yıkanarak ölçüme hazır hale getirildi. Şekil 2.1'de PFO immobilize edilmiş fenol duyarlı mikro biyosensörün genel yapısı verilmiştir (61).



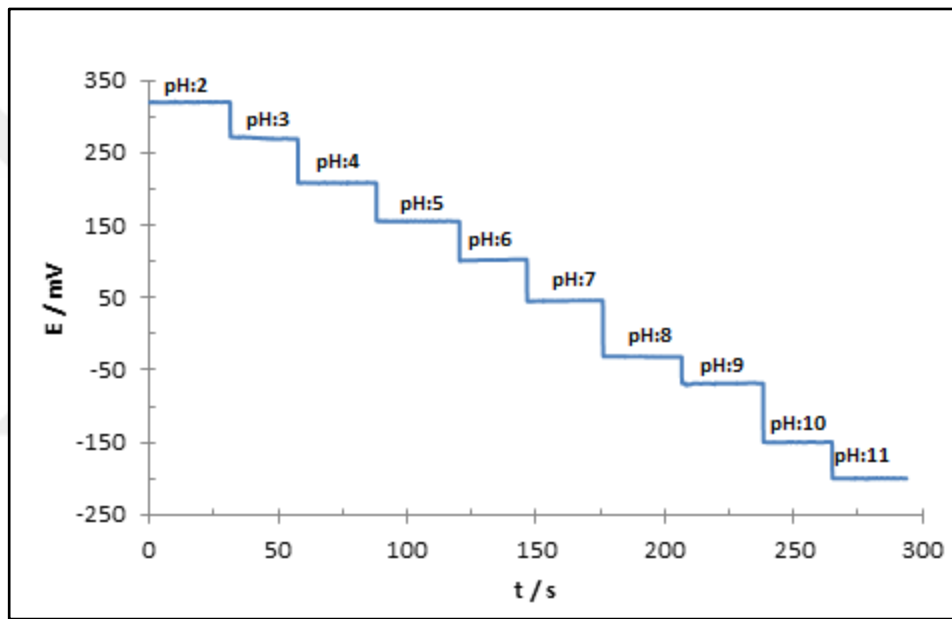
Şekil 2.1 PFO immobilize edilmiş fenol duyarlı biyosensörün genel yapısı

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

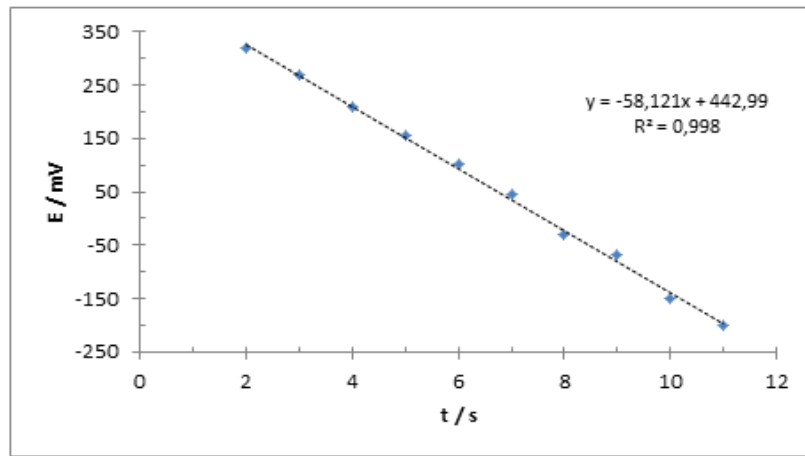
3.1. pH Sensörlerin Potansiyometrik Davranışları

3.1.1. Quinhidron Temelli pH-1 Sensörün Potansiyometrik Davranışı

Şekil 3.1’de pH=2-11 aralığındaki fosfat tampon çözeltilerine daldırılan quinhidron temelli pH sensöre (pH-1) ait potansiyel zaman değişimi ve Şekil 3.2’de bu sensörün kalibrasyon grafiği görülmektedir.



Şekil 3.1 Quinhidron temelli pH-1 sensörün potansiyometrik davranışı

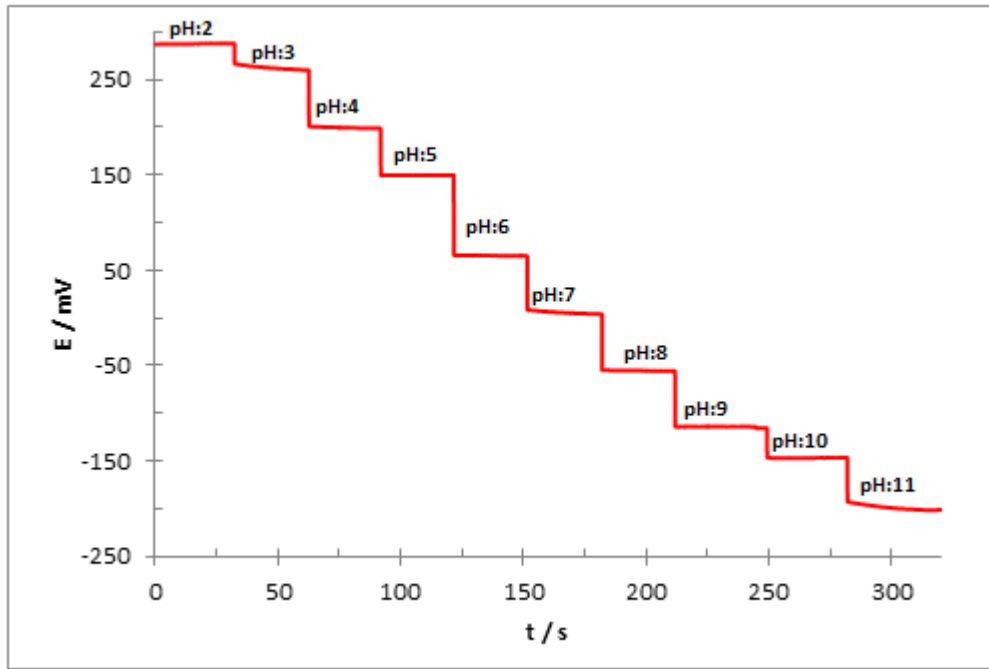


Şekil 3.2 Quinhidron temelli pH-1 sensöre ait kalibrasyon grafiği

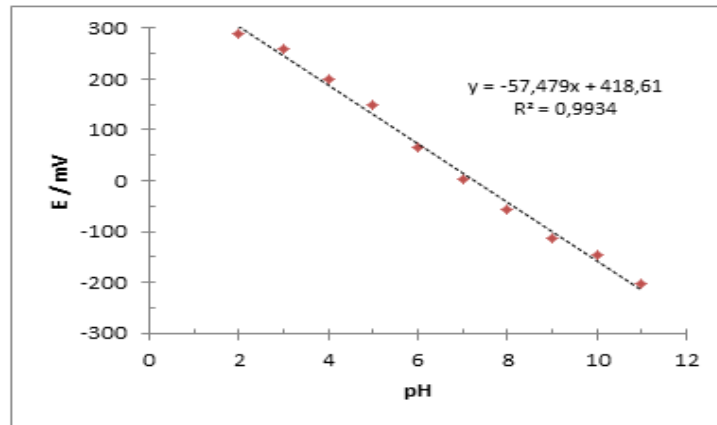
Şekil 3.1 ve 3.2’de incelendiğinde hazırlanan pH-1 sensörün pH=2-11 aralığında doğrusal değişim ($58,1 \pm 2,1$ mV/ her pH, 22 °C’de) sergilediği, kısa cevap zamanına (<10 s) sahip olduğu ve tekrarlanabilir sonuçlar sergilediği görülmektedir.

3.1.2. PVC-NH₂ Temelli pH-2 Sensörün Potansiyometrik Davranışı

Şekil 3.3’te pH=2-11 aralığındaki fosfat tampon çözeltilerine daldırılan PVC-NH₂ temelli pH sensöre (pH-2) ait potansiyel zaman değişimi ve Şekil 3.4’te bu sensörün kalibrasyon grafiği görülmektedir.



Şekil 3.3 PVC-NH₂ temelli pH-2 sensörün potansiyometrik davranışı

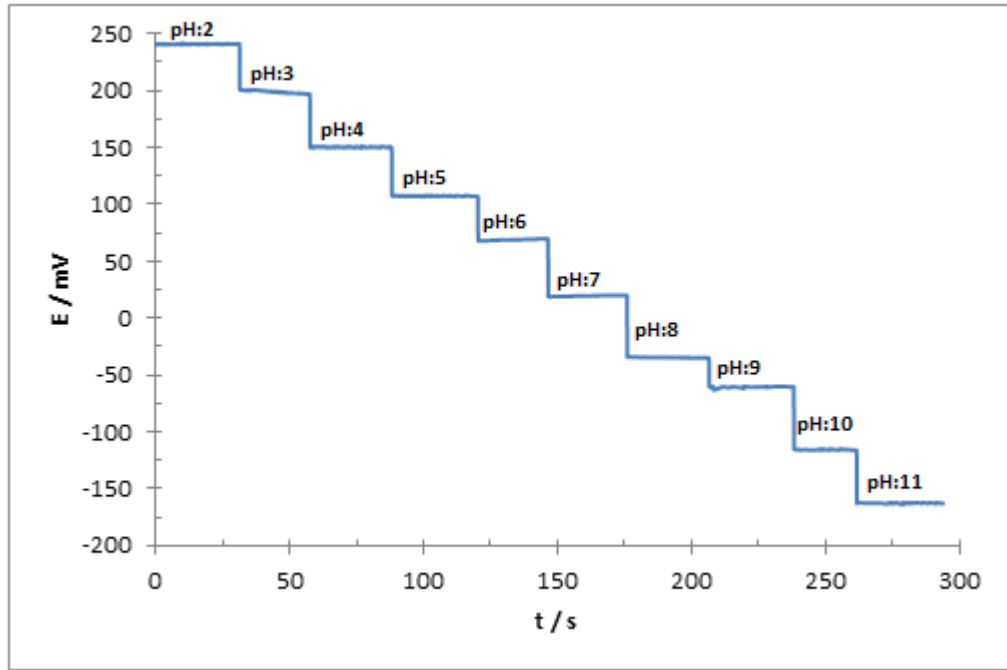


Şekil 3.4 PVC-NH₂ temelli pH-2 sensöre ait kalibrasyon grafiği

Şekil 3.3 ve 3.4’de incelendiğinde hazırlanan pH-2 sensörün pH=2-11 aralığında doğrusal değişim ($57,3 \pm 2,2$ mV/ her pH, 22 °C’de) sergilediği, kısa cevap zamanına (<10 s) sahip olduğu ve tekrarlanabilir sonuçlar sergilediği görülmektedir.

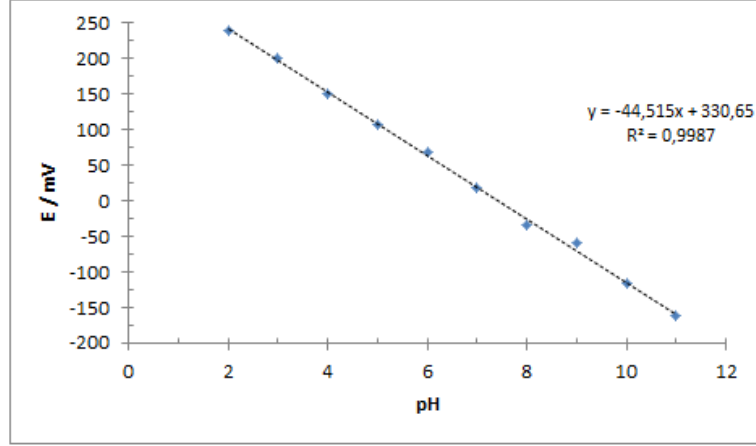
3.1.3. PVC-NH₂ Temelli pH-3 Sensörün Potansiyometrik Davranışı

Şekil 3.5’de pH = 2-11 aralığındaki fosfat tampon çözeltilerinde PVC- NH₂ temelli pH-3 sensörün potansiyel-zaman değişimi ve Şekil 3.6’de bu sensörün kalibrasyon grafiği görülmektedir.



Şekil 3.5 PVC-NH₂ temelli pH-3 sensörün potansiyometrik davranışı

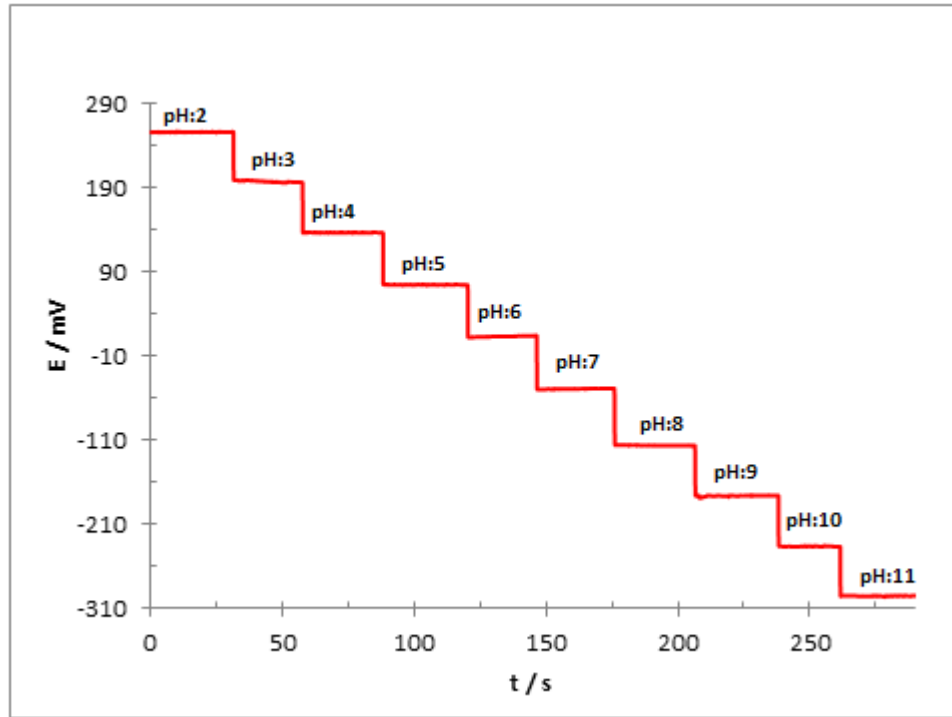
Şekil 3.5 ve 3.6’da incelendiğinde hazırlanan pH-3 sensörün pH= 2-11 aralığında doğrusal değişim ($45,1 \pm 2,3$ mV/ her pH, 22 °C’de) sergilediği, kısa cevap zamanına (<10 s) sahip olduğu ve tekrarlanabilir sonuçlar sergilediği görülmektedir.



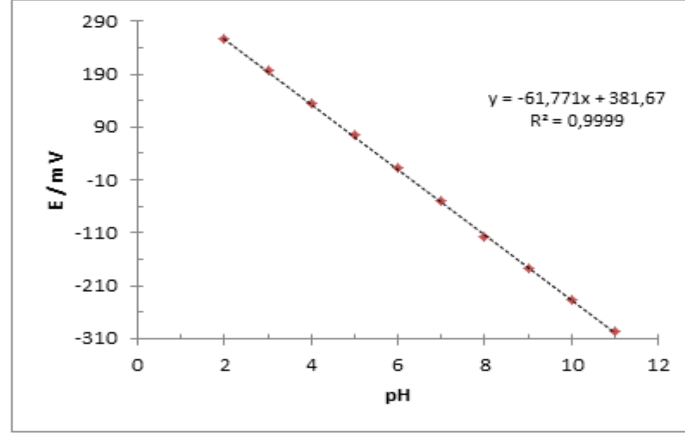
Şekil 3.6 PVC-NH₂ temelli pH-3 sensöre ait kalibrasyon grafiği

3.1.4. Cam Elektrodun Potansiyometrik Davranışı

Hazırlanan pH sensörlerin ticari bir pH sensörle karşılaştırılması için, ticari bir pH sensör (cam elektrot) kullanılarak pH= 2–11 aralığındaki standart fosfat tampon çözeltilerine karşı elde edilen potansiyometrik sonuçlar Şekil 3.7’de ve Şekil 3.8’de cam elektrodun kalibrasyon grafiği görülmektedir.



Şekil 3.7 Cam elektrodun potansiyometrik davranışı



Şekil 3.8 Cam elektrotta ait kalibrasyon grafiği

pH sensörler için elde edilen tüm veriler sonuçlar incelendiğinde hazırlanan bütün katı-hal kompozit pH sensörlerin normal bir ticari pH sensör (cam elektrot) ile benzer davranışlar sergiledikleri görülmektedir. Katı-hal kompozit fenol duyarlı mikro biyosensör hazırlamak için daha iyi performans sergilediğini düşündüğümüz pH-2 tipi sensör tercih edilmiştir.

Tablo 3.1’de pH sensörlerin performans karakteristikleri verilmiştir.

Tablo 3.1 pH sensörlerin performans karakteristikleri

	pH-1 Sensör	pH-2 Sensör	pH-3 Sensör	Cam Elektrot
Çalışma Aralığı, pH	2-11	2-11	2-11	2-11
mV değişimi*	58,1±2,1	57,3±2,2	45,1±2,3	61,5±2,0
Cevap Zamanı, s	8-10	8-10	8-10	8-10
Doğru Denklemi	y=-58,121x+442,99	y=-57,479x +418,61	y=-44,515x+330,65	y=-61,771x+381,67

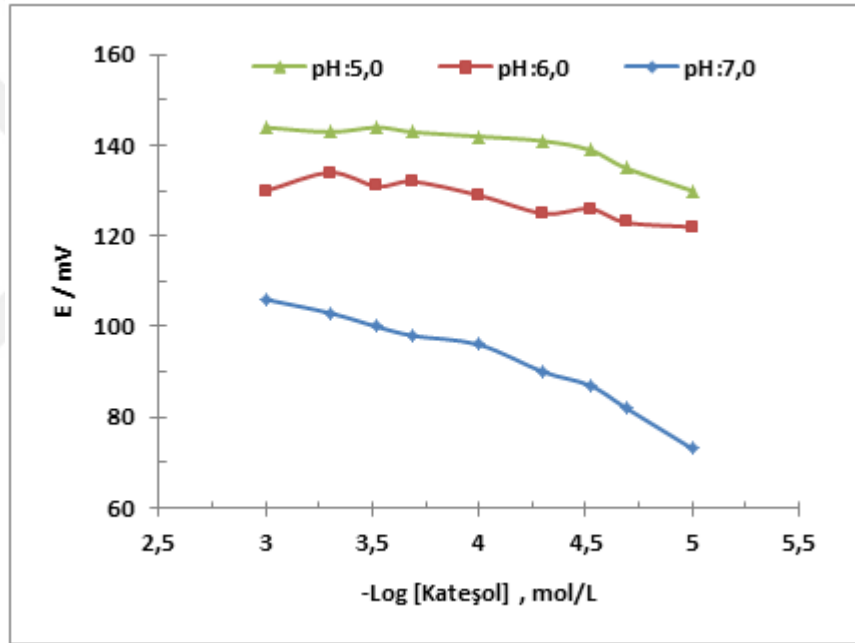
*n:3 ölçüm için ortalama standart sapması ile birlikte verilmiştir.

3.2. Fenol Duyarlı Mikro Biyosensörün Cevabına Etki Eden Parametrelerin Optimizasyonu

3.2.1. pH Etkisi

Enzim aktivitesi yüksek oranda ortamın pH’sına bağlıdır. Bu nedenle her enzimin optimum aktivite gösterdiği pH’nın belirlenmesi gerekmektedir. Aynı durum

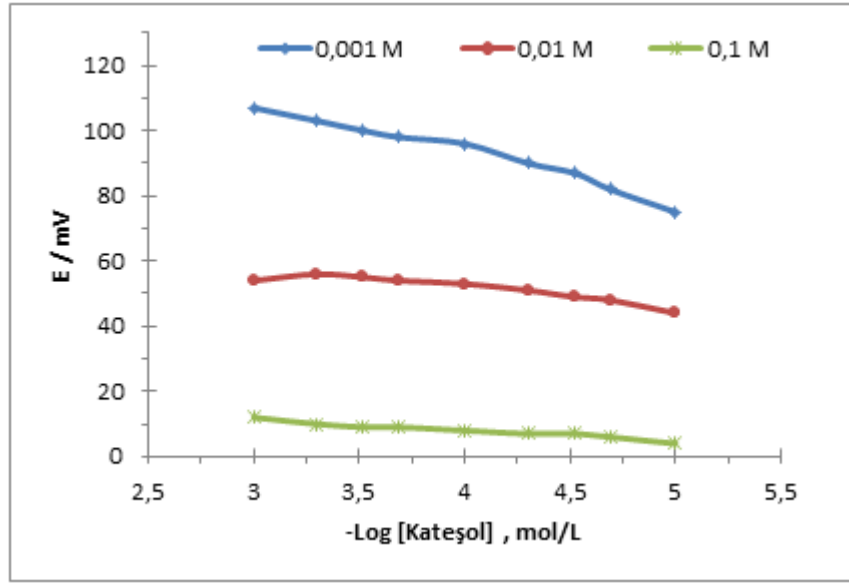
immobilize enzimler için de geçerlidir (62). Hazırlanan fenol duyarlı mikro biyosensörün optimum tampon pH'sının belirlenmesi amacıyla farklı pH değerlerinde hazırlanan 1 mM fosfat tamponlarında biyosensörün bir fenol türevi olan kateşole karşı potansiyometrik davranışı incelendi (Şekil 3.9). Grafik incelendiğinde optimum çalışma aralığının pH 7,0'de elde edildiği görülmektedir. Hazırlanan mikro biyosensör için belirlenen optimum pH değeri serbest polifenol oksidaz enzimi için belirtilen pH aralığının (5,0–8,0) içindedir. Bu durum, immobilizasyon işleminin polifenol oksidazın optimum pH değerini değiştirmedini göstermektedir (62,63). Bundan dolayı çalışmamızda tampon pH'sı 7,0 olarak seçildi ve daha sonraki ölçümler pH=7,0'de gerçekleştirildi.



Şekil 3.9 Fenol duyarlı mikro biyosensörün cevabına pH'nın etkisi

3.2.2. Tampon Derişiminin Etkisi

Fenol duyarlı mikro biyosensörün cevabına tampon derişiminin etkisinin belirlenmesi amacıyla, farklı fosfat derişimine sahip tamponlarda biyosensörün kateşole karşı potansiyometrik davranışı incelendi (Şekil 3.10).

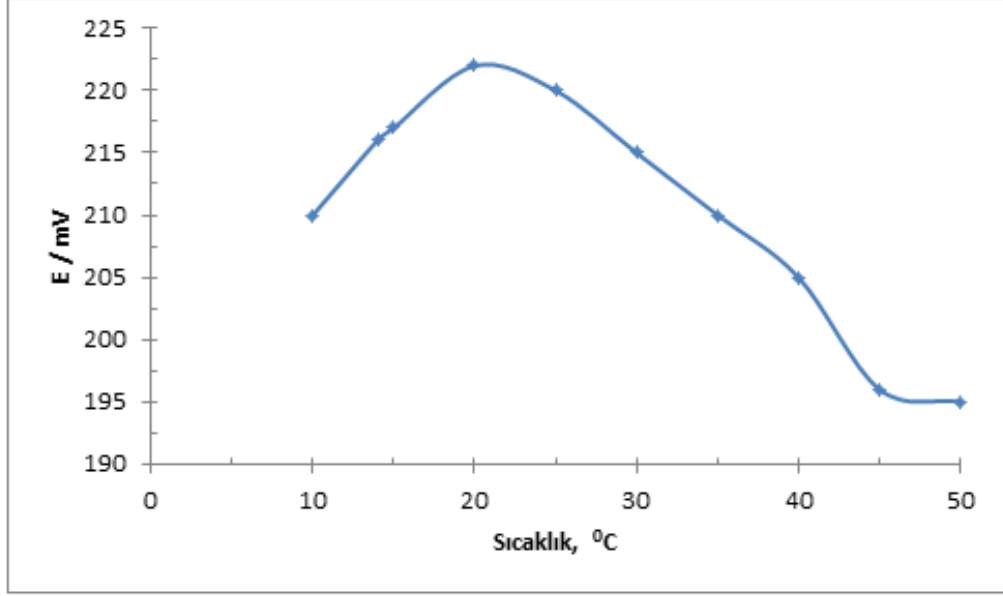


Şekil 3.10 Fenol duyarlı biyosensörün cevabına tampon derişiminin etkisi

Şekil 3.10 incelendiğinde optimum tampon derişiminin 1 mM olduğu görülmektedir. Dolayısıyla çalışmamızda tampon derişimi olarak 1 mM seçildi ve daha sonraki ölçümler 1 mM tampon ortamında gerçekleştirildi.

3.2.3. Sıcaklık Etkisi

Fenol duyarlı mikro biyosensörün cevabına sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla 10–50 °C sıcaklık aralığındaki belli sıcaklıklarda biyosensörün 1 mM kateşol çözeltisine karşı potansiyometrik davranışı incelendi (Şekil 3.11). Şekil 3.11 incelendiğinde 20 °C'ye kadar potansiyelin arttığı, 20 °C civarında en yüksek potansiyel değerlerine ulaştığı ve bu sıcaklığın üstünde potansiyelin düştüğü görülmektedir. Bundan dolayı enzimin denatürasyonunu önlemek ve çalışmaların daha pratik yürütülmesi amacıyla ölçümlerin oda sıcaklığında yapılmasına karar verildi.

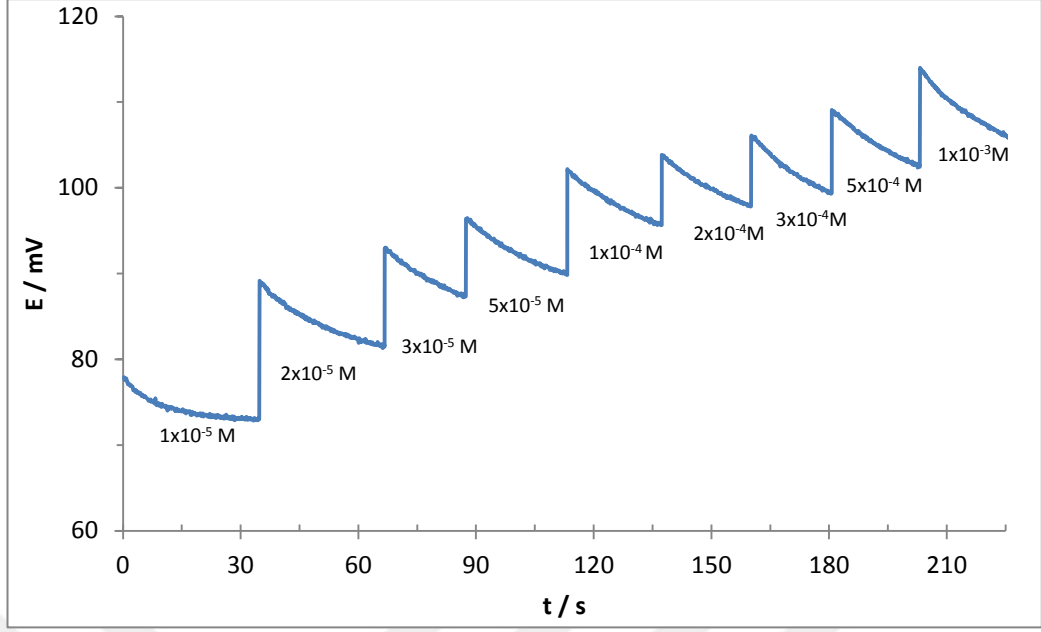


Şekil 3.11 Fenol duyarlı biyosensörün cevabına sıcaklığın etkisi

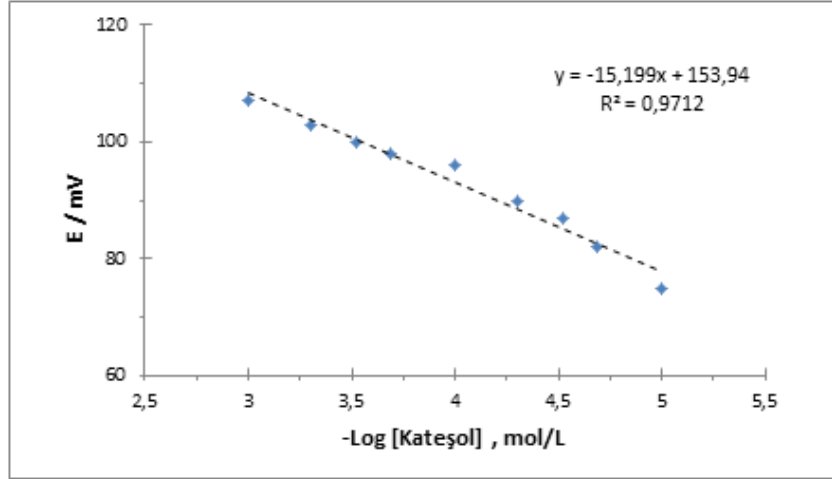
3.3. Fenol Duyarlı Mikro Biyosensörlerin Potansiyometrik Davranışı

3.3.1. Quinhidron Temelli Fenol Duyarlı Mikro Biyosensörün (Biyosensör A) Potansiyometrik Davranışı

Şekil 3.12’de 10^{-2} - 10^{-5} M aralığındaki kateşol çözeltilerinde *Biyosensör A* tipi fenol duyarlı mikro biyosensörün potansiyel zaman değişimi ve Şekil 3.13’de bu biyosensöre ait kalibrasyon grafiği görülmektedir.



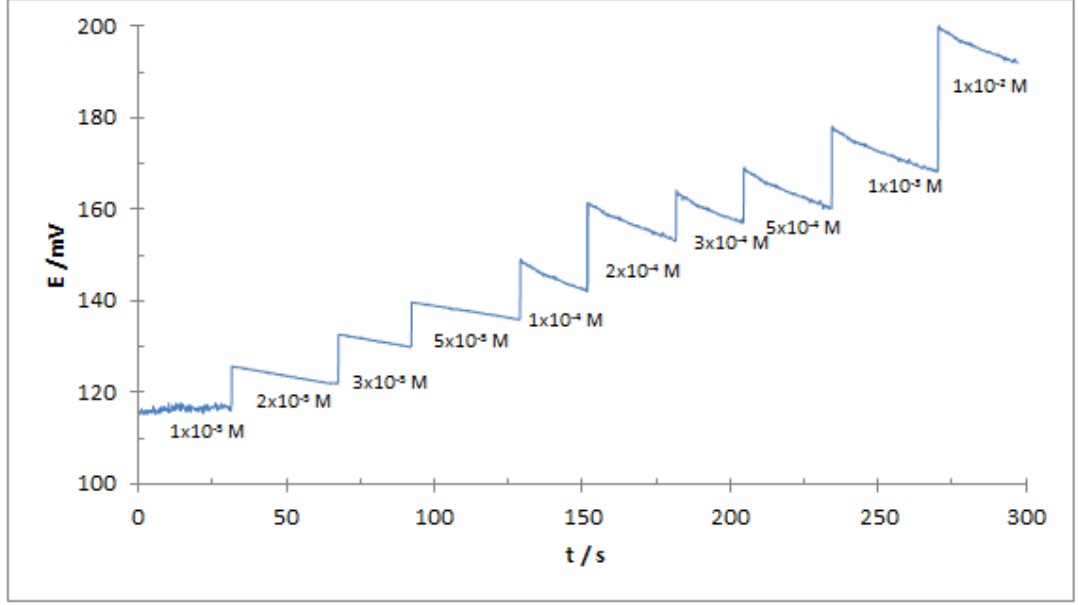
Şekil 3.12 Biyosensör A'nın kateşol çözeltilerine karşı potansiyometrik davranışı



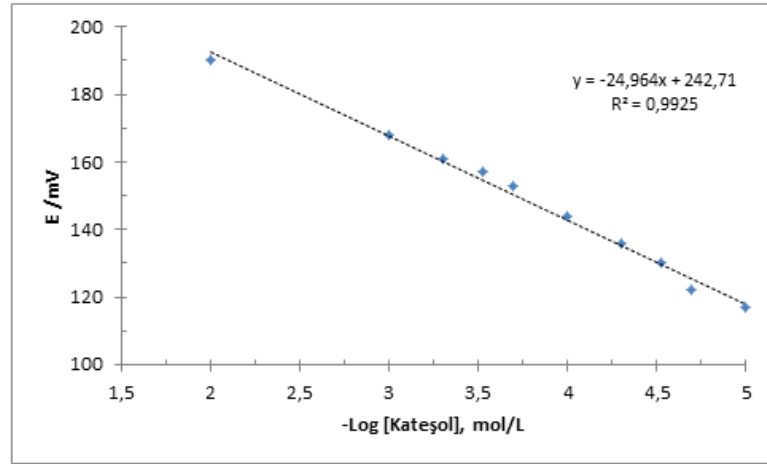
Şekil 3.13 Biyosensör A'nın ait kateşol çözeltilerinde kalibrasyon grafiği

3.3.2. PVC-NH₂ Temelli Fenol Duyarlı Mikro Biyosensörün (Biyosensör B) Potansiyometrik Davranışı

Şekil 3.14'de 10^{-2} - 10^{-5} M aralığındaki kateşol çözeltilerinde **Biyosensör B** fenol duyarlı mikro biyosensörün potansiyometrik davranışı ve bu sensöre ait Şekil 3.15'te biyosensörün kalibrasyon grafiği görülmektedir.



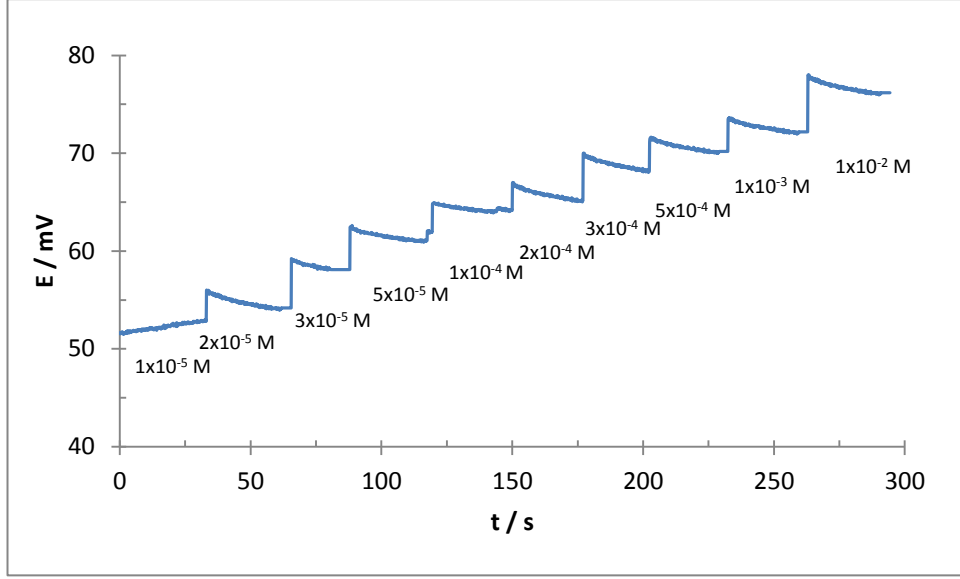
Şekil 3.14 Biyosensör B'nin kateşol çözeltilerine karşı potansiyometrik davranışı



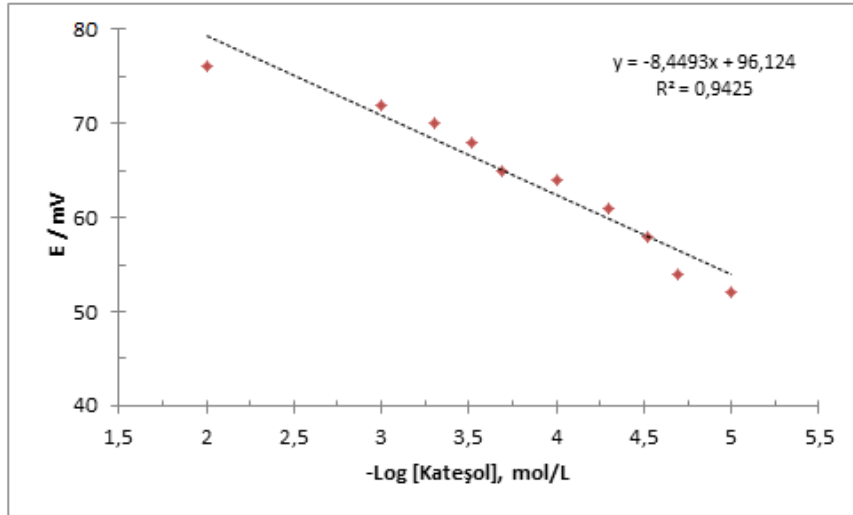
Şekil 3.15 Biyosensör B'nin kateşol çözeltilerinde kalibrasyon grafiği

3.3.3. PVC-NH₂ Temelli Fenol Duyarlı Mikro Biyosensörün (Biyosensör C) Potansiyometrik Davranışı

Şekil 3.16'da 10^{-2} - 10^{-5} M aralığındaki kateşol çözeltilerinde **Biyosensör C**'nin potansiyometrik davranışı ve bu sensörün Şekil 3.17'de kalibrasyon grafiği görülmektedir.



Şekil 3.16 Biyosensör C'nin kateşol çözeltilerine karşı potansiyometrik davranışı



Şekil 3.17 Biyosensör C'nin kateşol çözeltilerinde kalibrasyon grafiği

Hazırlanan farklı yapılarıdaki fenol duyarlı mikro biyosensörlerin kateşole karşı sergilemiş oldukları bazı potansiyometrik performans karakteristikleri Tablo 3.2'de özetlenmiştir.

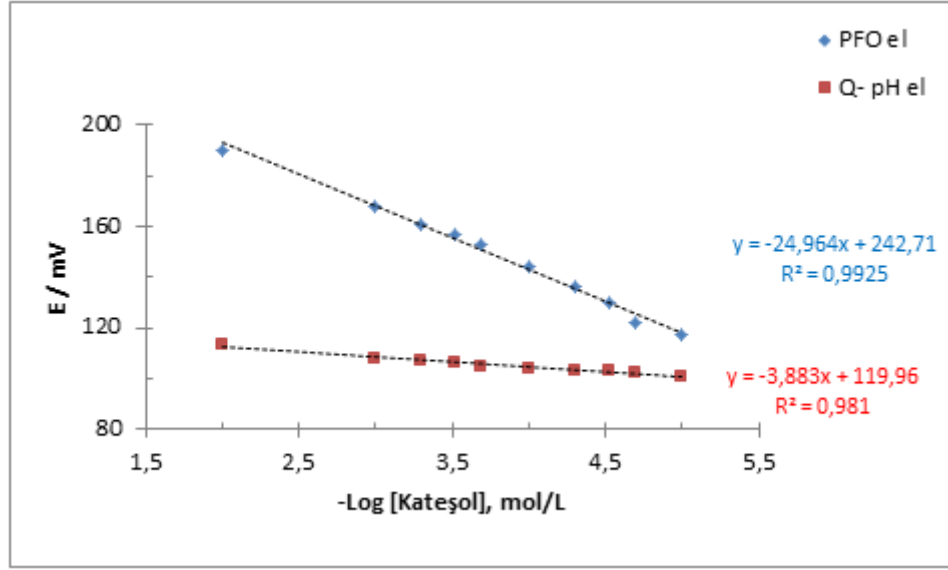
Tablo 3.2 Fenol duyarlı mikro biyosensörlerin performans karakteristikleri

	Biyosensör A	Biyosensör B	Biyosensör C
Doğrusal Çalışma Aralığı, mol.L⁻¹	1x10 ⁻³ - 2x10 ⁻⁵	1x10 ⁻² – 3,2x10 ⁻⁵	1x10 ⁻³ – 3,2x10 ⁻⁵
mV Değişimi*	15,12 ± 1,73	24,28 ± 1,14	8,45 ± 1,04
Cevap Zamanı, s	10-15	10-15	10-15
Tayin Limiti, mol.L⁻¹	1x10 ⁻⁵	3x10 ⁻⁶	1x10 ⁻⁵
Kullanım ömrü, hafta	3-4	3-4	3-4
Optimum pH	7,0	7,0	7,0
Sıcaklık Çalışma Aralığı, °C	20-25	20-25	20-25
Tampon tipi	Fosfat	Fosfat	Fosfat
Tampon Derişimi, mol.L⁻¹	1x10 ⁻³	1x10 ⁻³	1x10 ⁻³

(* Her 10 kat derişim ve n=3 için ortalama standart sapması ile birlikte verilmiştir.)

Tablo 3.2 incelendiğinde hazırlanan tüm fenol duyarlı mikro biyosensörlerin geniş bir doğrusal aralığa, düşük tayin limitlerine ve kısa cevap zamanlarına sahip oldukları, ayrıca biyosensörlerin oda koşullarında yaklaşık 1 ay boyunca performans sergiledikleri görülmektedir.

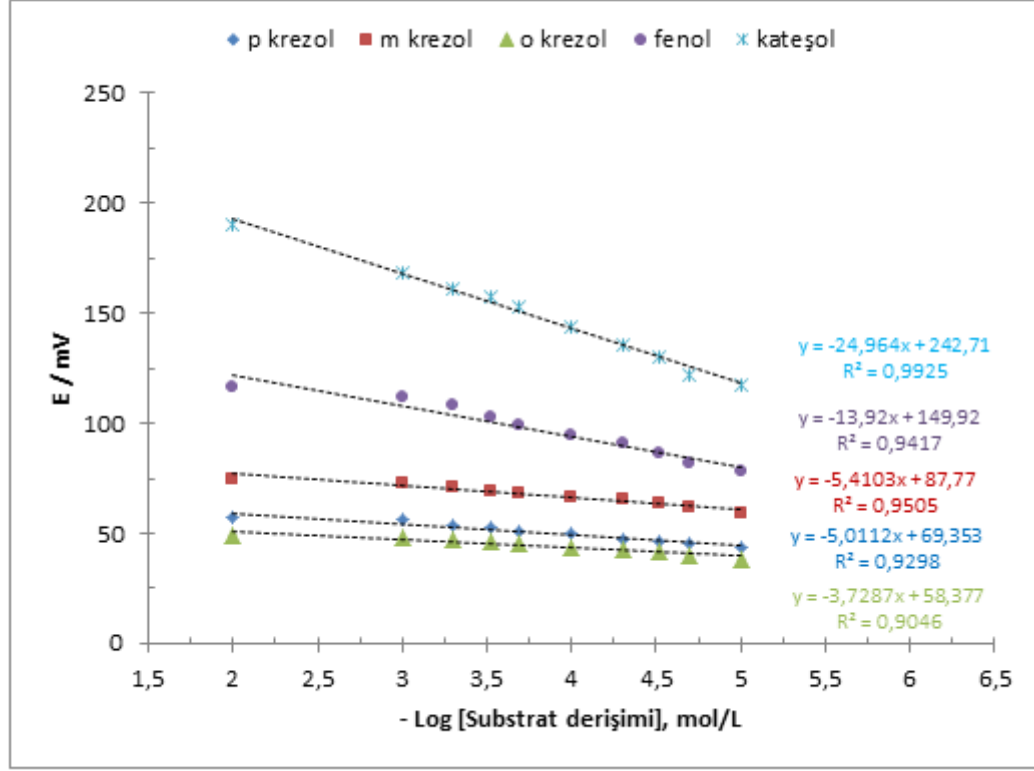
Şekil 3.18'de PVC-NH₂ temelli fenol duyarlı mikro biyosensör ile pH-1 sensörün kateşol çözeltilerindeki potansiyometrik davranışları karşılaştırmalı olarak görülmektedir. Grafik incelendiğinde farklı konsantrasyonlardaki kateşole karşı biyosensörün cevap sergilediği ancak pH sensörün cevabının oldukça az olduğu görülmektedir. Bu durum biyosensör yapısı içine immobilize olan PFO enziminin kateşol ile etkileşerek sinyalin yükselmesine neden olduğunun bir göstergesidir.



Şekil 3.18 Biyosensör B ve pH-1 sensörlerin kateşol için kalibrasyon grafikleri

3.4. Fenol Duyarlı Mikro Biyosensörün Diğer Fenolik Bileşiklere Duyarlılığı

Fenol duyarlı mikro biyosensörün diğer bazı fenolik bileşiklere (fenol, o-krezol, m-krezol ve p-krezol) duyarlılıklarını belirlemek amacıyla ilgili türlerin standart çözeltilerine karşı biyosensörün potansiyometrik cevabı incelendi ve kalibrasyon grafikleri çizildi. Elde edilen grafikler Şekil 3.19'da görülmektedir. Şekil 3.19'daki grafik incelendiğinde, sensörün fenol türlerine karşı duyarlı olduğu söylenebilir. Bu duyarlılığın kateşole karşı daha fazla olduğu görülmektedir. Yapılan pek çok çalışmada kateşole duyarlılık diğer fenolik bileşiklere karşı elde edilen duyarlılık değerlerinden daha yüksek olduğu belirtilmiştir (63-66).



Şekil 3.19 Fenol duyarlı biyosensörün diğer fenolik bileşiklere karşı cevabı

3.5. Fenollere Duyarlı Mikro Biyosensör İle Gerçek Numune Analizi

Geliştirilen fenol duyarlı mikro biyosensör ile siyah çay numunesindeki kateşol miktarı belirlenmeye çalışıldı. Bu amaçla ilk olarak standart kateşol çözeltileri için kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Daha sonra numune çözeltilisinin ölçümleri alındı. Numunelerin içerdiği kateşol miktarı çizilen kalibrasyon grafiklerinden faydalanarak hesaplandı. Kalibrasyon grafiklerinden oluşturulan doğru denklemleri kullanıldı ve numuneler için ölçülen potansiyel değerlerine karşılık gelen kateşol miktarı hesaplandı (Tablo 3.3).

Yöntemin duyarlılığını test etmek amacıyla UV Spektrofotometresi ile standart kateşol çözeltileri ve çay numunesi için 260-300 nm aralığında ölçüm alındı. Kateşol için maksimum dalga boyu aralığı ~278-282 nm'dir. Geliştirilen sensör ile elde edilen sonuçlar UV Spektrofotometre sonuçları ile karşılaştırıldı. İki yöntem arasındaki duyarlılığın belirlenmesi amacıyla istatistiksel f-testi uygulandı.

Tablo 3.3 Siyah ay numunesinde bulunan kateşol miktarları

Ölçüm No	Bulunan Kateşol Miktarları (mg / 1 g ay)*	
	Potansiyometri	UV
1	8,05	9,53
2	7,31	8,81
3	6,90	8,15
4	6,30	7,94
Ortalama	7,14	8,61
Standart sapma	0,73	0,72

$$f_{deneysel} = \frac{(s_{pot})^2}{(s_{UV})^2}$$
 eşitliğinden hesaplanan f değeri %95 güven aralığında

(P=0,05) serbestlik derecesi (n-1)=3 için tablodan bulunan kritik f değeri (9,277) ile kıyaslandı. $f_{kritik} > f_{deneysel}$ olduğundan Potansiyometrik metot ve UV Spektrofotometrik metot arasında önemli derecede duyarlılık farkının olmadığı sonucuna varıldı.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma kapsamında bütünüyle katı-hal mikro pH sensörlerin yüzeyine polifenol oksidaz enzimi çapraz bağlama yöntemiyle immobilize edilerek fenollere duyarlı mikro biyosensörler hazırlanmıştır. Hazırlanan biyosensörlerin potansiyometrik davranışları araştırılmıştır. Geliştirilen biyosensörler siyah çay numunesinde kateşol analizi için uygulanmıştır.

Geliştirilen fenol duyarlı mikro biyosensörler kolay hazırlanabilir, ekonomik, basit ölçüm sistemi gerektiren duyarlı sensörlerdir. Elde edilen olumlu sonuçlar biyosensörlerin hareketli ortamlarda kullanılabilir akış enjeksiyon analiz hücrelerinin de hazırlanarak kromatografi gibi sistemlerde dedektör olarak başarı ile uygulanabileceğini göstermektedir.

İleriki çalışmalarımızda çok çeşitli çevresel ve biyolojik numunelerde bulunması muhtemel fenolik türlerin kromatografik sistemlerde ayımlarının yapılarak, ardından geliştirdiğimiz fenol duyarlı mikro biyosensörler ile tayinlerinin gerçekleştirilmesini hedeflemekteyiz.

Bu tez çalışması Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Biriminin **FEN-BAP-C-220413-12 Nolu Araştırma Projesi** kapsamında desteklenmiştir.

5. KAYNAKLAR

1. Coulet, P. R. , "What is a Biosensor?" Chapter 1; " Biosensor principles and applications, " Ed: Blum, L. J. Coulet, P. R. (1991), Marcel Dekker Inc. New York.
2. Turner, A. P. F. , "Biosensors: Fundamentals and Applications", Ed: Turner, A. P. F. , Karube, I. and Wilson, G. S. ; Oxford University Press, (1987), Oxford, pp. 5-7
3. Sarıboğa, B. 2008. Fenilketonüri (PKU) Teşhisinde Potansiyometrik Biyosensörlerin Geliştirilmesi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, pp. 53-54, Samsun.
4. Dinçkaya, E. , 1999. Biyosensörler, (Telefoncu,A. ,ed.), Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, pp. 81-142, İzmir
5. Gooding JJ, *Analytica Chimica Acta*, 559, 2006; p. 137
6. Mehrvar M. , Bis C. , Scharer J. M. , Moo-Young M. , Luong, J. H. , 2000, Fiber-Optic Biosensors-Trends and Advances, *Analytical Science* July, (16), 677-692.
7. Mello L. D. ve Kubota L. T., 2002, Review of the Use of Biosensors as Analytical Tools in the Food and Drink Industries, *Food Chemistry*, 77, 237-256.
8. Aykut U. ve Temiz H., 2006, Biyosensörler ve Gıdalarda Kullanımı, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, (3), 51-59.
9. F. Gardies, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet and H. Perrot, Micro-enzyme field effect transistor sensor using direct covalent bonding of urease, *Anal. Chim. Acta.*, 231 (1990) 305-308.
10. J. M. Kauffmann and G. Guilbault, Enzyme electrode biosensors: theory and applications, *Method. Biochem. Anal.*, 36 (1992) 63-113.

11. Andreescu, S., Sadik, O.A., Trends and Challenges in Biochemical Sensors for Clinical and Environment Monitoring., *Pure Appl. Chem.*, Vol. 76, 2004, No. 4, pp. 861-878
12. Uhlig, H., 1998. *Industrial Enzymes and Their Applications*, John Wiley & Sons, USA.
13. Krajewska, B., 2003. Application of Chitin -and Chitosan- Based Materials for Enzyme Immobilizations: A Review, *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 126-139.
14. Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., and Deshpande, V.V., 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(3), 597- 635
15. Lei, C., Shin, Y., Liu, J., and Ackerman, E.J., 2002. Entrapping Enzyme in a Functionalized Nanoporous Support, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 11242-11243.
16. Bickerstaff, G.F., 1997. *Immobilization of Enzymes and Cells*, Humana Pres, New Jersey.
17. Kim, Seung-Wook, Development of Enzyme Immobilization Technique, Laboratory of Bioprocess Engineering, Department of Chemical and Biological Engineering, Korea University
18. Telefoncu, A., *Enzimoloji*, Ege Üniversitesi, İzmir, Bölüm 9, İmmobilize Enzimler, pp 193-243
19. Arslan, F., (2004). Ksantin Tayini İçin Polipirol Filme Ksantin Oksidaz Enziminin İmmobilizasyonu ile Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
20. Spichiger-Keller, U.E., 1998. *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, Verlag Chemie, Weinheim, 455 p

- 21.** Eggins, B. R. 1996. *Biosensors: An Introduction*, John Wiley and Sons Ltd. and B.G. Teubner, West Sussex, 210 s.
- 22.** Von Lucadou I, Luft G, Preidel W, Richter GJ. The electrocatalytic glucose sensor. *Horm Metab Res Suppl.* 1988; 20: 41-3.
- 23.** Turner AP., Pickup JC. Diabetes mellitus: biosensors for research and management. *Biosensors.* 1985; 1: 85-115.
- 24.** Pan Y, Sonn GA, Sin ML, Mach KE, Shih MC, Gau V, Wong PK, Liao JC. Electrochemical immunosensor detection of urinary lactoferrin in clinical samples for urinary tract infection diagnosis. *Biosens Bioelectron.* 2010; 26:649-54.
- 25.** Turner AP., *Biosensors.* *Curr Opin Biotechnol.* 1994; 5: 49-53.
- 26.** Richter ER. Biosensors: applications for dairy food industry. *J Dairy Sci.* 1993; 76: 3114-7.
- 27.** Naimushin AN, Soelberg SD, Nguyen DK, Dunlap L, Bartholomew D, Elkind J, Melendez J, Furlong CE. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B at femtomolar levels with a miniature integrated two-channel surface plasmon resonance (SPR) sensor. *Biosens Bioelectron.* 2002 ; 17: 573-84.
- 28.** Zhang S, Wright G, Yang Y. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. *Biosens Bioelectron.* 2000; 15: 273-82.
- 29.** Noh J, Park S, Boo H, Kim HC, Chung TD. Nanoporous platinum solid-state reference electrode with layer-by-layer polyelectrolyte junction for pH sensing chip. *Lab Chip.* 2011; 11: 664-71.
- 30.** Arlett JL, Myers EB, Roukes ML. Comparative advantages of mechanical biosensors. *Nat Nanotechnol.* 2011; 6:203-15.

- 31.** Nice EC, Catimel B. Instrumental biosensors: new perspectives for the analysis of biomolecular interactions. *Bioessays*. 1999; 21: 339-52.
- 32.** Mulchandani A, Bassi AS. Principles and applications of biosensors for bioprocess monitoring and control. *Crit Rev Biotechnol*. 1995; 15: 105-24
- 33.** Pekyardımcı, Ş. , 1992, Polifenol oksidaz enzimi ve esmerleşme reaksiyonlarının Gıda endüstrisi uygulamaları, Gıda Teknolojisi Derneği (GTD) Yayın Organı, 17, 3, 182
- 34.** Duran N., Rose A. M., D'Annibale A., Gianfreda C., 2002, Applications of Laccases and Tyrosinases (Polyphenoloxidases) Immobilized on Different Supports: a Review, *Enzyme and Microbial Technology*, (31), 907-931.
- 35.** Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Laboratuvarı Föyü, s 27-28
- 36.** Climent P.V. ; Serralheiro M.L.M. ve Rebelo M.J.F. , 2001, Development of a new amperometric biosensor based on polyphenoloxidase and polyethersulphone membrane, *Pure Applied Chemistry*, 73(12),1993-1999
- 37.** Chevalier, T. , Rigal, D. , Didier, M. , Frederic, G. , Forget, F.R. ve Fils-Lycaon, B.R. , 1999, Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase, *Plant Physiol.* , 119(4), 1261-1270
- 38.** Duran, N. ve Esposito, E. , Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compound in wastewater and soil treatment:a review, *Applied Catalysis B:Environmental*, 28, 83-99.
- 39.** Gomez-Lopez, V.M. , 2002, Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two varieties of avocado, *Food Chemistry*, 77, 163-169.
- 40.** Nelson, J. M. and Dawson, C. R., "Tyrosinase" *Adv. Enzymol.*, 4: 99 – 152 (1944).

- 41.** Çiçek, H., “Beyaz – çürükçül fungus kültürlerinde tirozinaz enziminin sentezinin taranması ve optimizasyonu”. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara 5-6-7 (2000).
- 42.** Kahoun D. v.d. , 2008, Determination of phenolic compounds and hydroxymethylfurfural in meads using high performance liquid chromatography with coulometric-array and UV detection, *Journal of Chromatography A*, 1202, 19-33
- 43.** Fiamegos Y.C. ; Kefala A.P. ve Stalikas C.D., 2008, Ion-pair single-drop microextraction versus phase-transfer catalytic extraction for the gas chromatographic determination of phenols as tosylated derivatives, *Journal of Chromatography A*, 1190, 44-51
- 44.** Lima L.D.L. , Duarte A.C. ve Esteves V.I. , 2007, Optimization of phenolic compounds analysis by capillary electrophoresis, *Talanta*, 72, 1404-1409
- 45.** Öztürk N. , Tunalıer Z. , Koşar M. Ve Başer K.H.C. , 2002, ‘Petroselinum crispus, Anethum graveolens ve Eruca sativa ‘nın antioksidan etki ve fenolik bileşikler yönünden incelenmesi, 14. Bitkisel İlaç Ham Maddeleri ve Bildirimleri-Eskişehir, ISBN 975-94077-2-8
- 46.** Apak R. , Güçlü K. , Özyürek M. and Karademir S. E. , 2004, "A Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols, Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 52, 7970-7981
- 47.** Yıldız, A. ; Genç, Ö. ve Bektaş, S. , 1997, Enstrümantal Analiz Yöntemleri, Hacettepe Üniversitesi Yayınları A-64, İkinci Baskı, sayfa-1
- 48.** Akyılmaz E. , 1996, Preparation of ascorbate oxidase enzyme electrode and its usage for L-ascorbic acid determination, Master Of Thesis, E.Ü. Faculty of science, 11p.

- 49.** Shahidi, F., Naczk, M., 1995. Food Phenolics, Chemistry, Effects, Applications. Technomic, USA.
- 50.** Willson, K.C., Clifford, M.N., 1995. Tea Cultivation to Consumption. Chapman & Hall, London.
- 51.** Harborneg J. B., 1973, Phytochemical Methods, A guide to Modern Techniques of plant analysis, (5), 25-28.
- 52.** Sokol W., 1998, Uptake Rate of Phenol by *Pseudomonas putida* Grown in Unsteady State, Biotechnology and Bioengineering, 32, 1097-1103
- 53.** Portaccia M., Di Martino S., Maiuri P., Durante D., De Luca P., Lepore M., Bencivenga U., Rossi S., De Maioc A., Mita D. G., 2006, Biosensors for Phenolic Compounds: The Catechol as a Substrate Model, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (41), 97-102.
- 54.** Screening assesment for 1,2-benzenediol, 2008, Chemical Abstract Service Registry Number 120-80-9.
- 55.** Covington A.K., 1974. Ion-Selective Electrodes, Anal. Chem., *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 355-406.
- 56.** Skoog D.A., West D.M. and Holler F.J., 1990. Fundamentals of Analytical Chemistry, Saunders College Publishing, Rinehart and Winston Inc., 496 p.
- 57.** IUPAC Analytical Chemistry Division, Commission on Electroanalytical Chemistry, 1994. Recomendations for nomen-clature of Ion-selective Electrodes, Pure Appl. Chem., 66, 2527-2536.
- 58.** YOLCU, M. 2008. Seçici Kondüktometrik Ve Potansiyometrik Mikro-Sensörlerin Ve Hareketli Ölçüm Sistemlerinin Çevre Örneklerine Uygulanması, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, FenBilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Samsun.

- 59.** Isildak I., Asan A. 1999. Simultaneous Detection of Monovalent Anions and Cations using all Solid-State Contact PVC Membrane Anion and Cation Selective Electrodes as Detectors in Single Column Ion Chromatography. *Talanta*. 48, 967-978
- 60.** Ma, S.C., Chaniotakis, N.A., and Meyerhoff, M.E., 1988. Response Properties of Ion-Selective Polymeric Membrane Electrodes Prepared with Aminated and Carboxylated Poly(Vinyl Chloride), *Anal. Chem.*, 60, 2293-2299
- 61.** Kahlert H., Pörksen J.R., Isildak I., Andac M., Yolcu M., Behnert J., Scholz F., "Application of a new pH-sensitive electrode as a detector in flow injection potentiometry", *Electroanalysis*, 17 (12), 1085-1090, (2005).
- 62.** Tinkilic, N., Cubuk, O., Isildak, I., 2002. Glucose and Urea Biosensors Based on All Solid-State PVC-NH₂ Membrane Electrodes, *Anal. Chim. Acta*, 452, 24-29.
- 63.** Shan, D., Zhu, M., Han, E., Xue, H. and Cosnier, S. (2007). Calcium carbonate nanoparticles: A host for the construction of highly sensitive amperometric phenol biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 23, 648-654.
- 64.** Tsai, Y.C. and Chiu, C.C. (2007). Amperometric biosensors based on multiwalled carbon nanotube-Nafion-tyrosinase nanobiocomposites for the determination of phenolic compounds. *Sensors and Actuators B*, 125, 10-16.
- 65.** Rajesh and Kaneto, K. (2005). A new tyrosinase biosensor based on covalent immobilization of enzyme on *N*-(3-aminopropyl) pyrrole polymer film. *Current Applied Physics*, 5, 178-183
- 66.** Verdine, C., Fabiano, S. and Tran-Minh, C. (2003). Amperometric tyrosinase based biosensor using an electrogenerated polythiophene film as an entrapment support. *Talanta*, 59, 535-54

6. ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Giresun'da doğdu. İlk ve orta öğretimini sırasıyla Şehit Hüseyin Tahmaz İlköğretim ve Süleyman Demirel İlköğretim Okulunda tamamladı. Lise öğrenimini 2005 yılında Giresun Lisesi'nde tamamladı. 2007 yılında girdiği Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden 2011 yılında mezun oldu. 2012 yılında Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek-Lisans programında öğrenimine başladı. Halen Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda öğrenimine devam etmektedir.

