



GIDALARDA TİRAMİN TAYİNİ İÇİN BİYONSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Hilal OKTAY

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

AĞUSTOS 2023

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Hilal OKTAY

14/ 08/ 2023

GIDALARDA TİRAMİN TAYİNİ İÇİN BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Hilal OKTAY

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ağustos 2023

ÖZET

Tiramin, tirozinin dekarboksilasyonu sonucu açığa çıkan bir biyojen amindir. Yüksek miktarda tiramin içeren yiyeceklerin tüketilmesi sonucu ciddi sağlık sorunlarının yaşandığı bilinmektedir. Ayrıca yüksek derişimlerde tiraminin varlığı, uzun saklama süresi nedeniyle gıda bozulmasına da işaret edebilir. Bu nedenle, gıda numunelerinde tiramin seviyesini belirlemek için pratik, hızlı ve doğru bir yöntemin geliştirilmesi önemlidir. Bu amaçla tiramin tayini için monoamin oksidaz enzimi kullanılarak yeni bir amperometrik biyosensör geliştirildi. Schiff bazı olan N-naftaliden-(1-kloro-2-formilvinil)ferrosen (vFc3A2N) ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrot yüzeyine monoamin oksidaz enzimi gluteraldehit ile çapraz bağlama yöntemi kullanılarak immobilize edildi. Tiramin tayini enzimatik tepkime sonucu oluşan H₂O₂'in +0,5 V'da Ag / AgCl'ye karşı yükseltgenmesi ile gerçekleştirildi. Hazırlanan biyosensörün en iyi çalışma koşulları, sıcaklık, pH ve substrat derişiminin etkisi incelendi. Ayrıca biyosensörün performansını etkileyen faktörler, vFc3A2N'nin miktarı, tekrarlanabilirlik, raf ömrü ve girişim etkisi incelendi. Son olarak, hazırlanan biyosensör ile peynir numunesinde tiramin tayini yapıldı.

Bilim Kodu : 20104
Anahtar Kelimeler : Tiramin, monoamin oksidaz, biyosensörler, karbon pasta elektrot
Sayfa Adedi : 53
Danışman : Prof. Dr. Fatma ARSLAN

DEVELOPMENT OF BIOSENSOR FOR THE DETERMINATION OF TYRAMINE IN FOODS

(M. Sc. Thesis)

Hilal OKTAY

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

August 2023

ABSTRACT

Tyramine is a biogenic amine produced by the decarboxylation of tyrosine. It is known that serious health problems occur as a result of consuming foods containing high amounts of tyramine. Also, the presence of high concentrations of tyramine may indicate food spoilage due to long storage time. Therefore, it is important to develop a practical, fast and accurate method to determine the level of tyramine in food samples. For this purpose, a new amperometric biosensor was developed for the determination of tyramine by using the enzyme monoamine oxidase. The carbon paste modified with N-naphthalidene-(1-chloro-2-formylvinyl)ferrocene (vFc3A2N), a schiff base, was immobilized on the electrode surface by cross-linking the monoamine oxidase enzyme with glutaraldehyde. Tyramine determination was carried out by oxidation of H₂O₂ formed as a result of enzymatic reaction against Ag / AgCl at +0.5 V. The effects of the best working conditions, temperature, pH and substrate concentration of the prepared biosensor were examined. In addition, the factors affecting the performance of the biosensor, the amount of vFc3A2N, reproducibility, shelf life and interference effect were examined. Finally, tyramine was determined in the cheese sample with the prepared biosensor.

Science Code : 20104

Key Words : Tyramine, monoamine oxidase, biosensors, carbon paste electrode

Page Number : 53

Supervisor : Prof. Dr. Fatma ARSLAN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim hayatım boyunca bilgi ve deneyimleri ile desteğini hiç esirgemeyen, yoluma ışık tutan kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Fatma ARSLAN'a çok teşekkür ederim. Beni biyokimya ile tanıştıran ve bu alanı sevmemi sağlayan hocam Prof. Dr. Servet ÇETE'ye çok teşekkür ederim. Çalışmalarına katkı sağlayan, destek ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Halit ARSLAN'a çok teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarında sahip olduğu deneyimi benimle paylaşan ,yol gösteren ve zaman ayıran Arş. Gör. Onur Can BODUR'a çok teşekkür ederim. Hayatımın her anında maddi manevi desteklerini hissettiğim kıymetli aileme sonsuz sevgim ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Biyosensörler.....	3
2.1.1. Biyosensörlerin yapısı	3
2.1.2. Biyosensörlerin sınıflandırılması.....	4
2.1.3. Biyosensörlerin kullanım alanları.....	4
2.2. Enzimler ve Enzim Temelli Sensörler	5
2.2.1. Elektrokimyasal esaslı sensörler.....	7
2.2.2. Optik esaslı sensörler.....	7
2.2.3. Kalorimetrik esaslı sensörler	8
2.2.4. Piezoelektrik esaslı sensörler	8
2.3. Biyosensörlerde Biyobileşen İmmobilizasyonu.....	8
2.4. Karbon Pasta	11
2.5. Biyojen Aminler.....	12
2.5.1. Biyojen aminlerin oluşum mekanizmaları.....	13
2.5.2. Biyojen aminlerin tayin yöntemleri.....	14
2.5.3. Biyojen amin tayininin önemi	15

	Sayfa
2.5.4. Tiramin metabolizması	15
2.6. Monoamin Oksidaz Enzimi.....	17
2.7. Kaynak Araştırması.....	18
2.7.1. Tiramin biyosensörlerine ait kaynak araştırmaları	18
3. DENEYSEL KISIM	23
3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	23
3.2. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler.....	23
3.3. Deneylerde Kullanılan Cihazlar	25
3.3.1. Elektrokimyasal analiz cihazı	25
3.3.2. Hücre ve elektrotlar	25
3.3.3. pH metre	25
3.3.4. Su banyosu.....	25
3.3.5. Mikro pipet	25
3.3.6. Saf su eldesi için cihaz.....	26
3.4. Tiramin Biyosensörünün Hazırlanması ve En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi.....	26
3.4.1. Çalışma elektrodun hazırlanması: Karbon pasta elektrot (CPE), modifiye karbon pasta elektrot (MCPE) hazırlanması.....	26
3.4.2. Karbon pasta elektrodun sabit akıma getirilmesi	27
3.4.3. CPE ve MCPE'nin H ₂ O ₂ 'e duyarlılığının belirlenmesi.....	27
3.4.4. Karıştırma süresinin belirlenmesi	28
3.4.5. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi.....	28
3.4.6. MCPE'nin H ₂ O ₂ duyarlılığına vFc3A2N miktarının etkisi.....	28
3.4.7. Enzimin MCPE'ye immobilizasyonu	29
3.4.8. Biyosensörün tiramin duyarlılığına gluteralehit miktarının etkisi.....	29
3.4.9. Enzim elektrodun en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi.....	29
3.4.10. Biyosensör üzerine girişim yapan türlerin etkisinin incelenmesi.....	31

	Sayfa
3.4.11. Peynirde tiramin tayini	31
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	33
4.1. CPE ve MCPE'nin H ₂ O ₂ 'e duyarlılığının belirlenmesi	33
4.2. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi	34
4.3. MCPE'nin H ₂ O ₂ duyarlılığına vFc3A2N miktarının etkisi	35
4.4. Karıştırma süresinin belirlenmesi	36
4.5. Biyosensörün tiramin duyarlılığına glutaraldehit miktarının etkisi	36
4.6. Optimum pH.....	38
4.7. Optimum sıcaklık	39
4.8. Substrat derişiminin etkisi.....	40
4.9. Tekrarlanabilirlik.....	42
4.10. Raf ömrünün belirlenmesi.....	43
4.11. Biyosensör cevabına girişim yapan türlerin etkisinin incelenmesi	44
4.12. Peynirde tiraminin tayin edilmesi	44
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	53

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	10
Çizelge 2.2. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması	10
Çizelge 3.1 Çalışma için kullanılan kimyasal madde isimleri ve üretici firmalar	23
Çizelge 4.1. Tiramin tayinine girişim yapan türler ve girişim etkileri.....	44
Çizelge 5.1. Çalışma sonuçlarının literatür ile karşılaştırılması	48

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Biyosensörlerin çalışma prensibi.....	4
Şekil 2.2. Biyosensörlerin kullanım alanları.....	4
Şekil 2.3. Enzim esaslı biyosensörlerin çalışma şeması	6
Şekil 2.4. Çarpraz bağlanma metodunun şematik gösterimi.....	9
Şekil 2.5. Grafit molekülünün yapısı	11
Şekil 2.6. Grafit tozu ve karbon pastaya uygulanması	12
Şekil 2.7. Biyojen amin çeşitleri	13
Şekil 2.8. Biyojen aminlerin oluşum mekanizması	14
Şekil 2.9. Biyojen aminlerin oksidasyon mekanizmaları	15
Şekil 2.10. Tiramin'in molekül yapısı	16
Şekil 2.11. Tiramin sentezi	16
Şekil 2.12. Tiramin'in enzimatik yıkımı.....	16
Şekil 2.13. MAO-A enzimi 3-D gösterimi.....	17
Şekil 2.14. MAO-B enzimi 3-D gösterimi.....	18
Şekil 3.1. MCPE hazırlanması ve çalışma hücresi şeması.....	26
Şekil 3.2. vFc3A2N bileşiği.....	27
Şekil 4.1. Tiramin tayini için tepkime şeması.....	33
Şekil 4.2. CPE ve MCPE'nin H ₂ O ₂ duyarlılığının belirlenmesi.....	34
Şekil 4.3. MCPE'un H ₂ O ₂ 'e duyarlılığı üzerine çalışma potansiyelinin etkisi	35
Şekil 4.4. MCPE'ta kullanılan vFc3A2N miktarının H ₂ O ₂ cevabına etkisi	36
Şekil 4.5. Tiramin duyarlılığına glutraldehit miktarının etkisi	38
Şekil 4.6. Tiramin duyarlılığına pH'ın etkisi	39
Şekil 4.7. Tiramin duyarlılığına sıcaklığın etkisi.....	40
Şekil 4.8. Biyosensörün amperometrik cevap akımına tiramin derişiminin etkisi	41

Şekil	Sayfa
Şekil 4.9. Biyosensörün amperometrik cevap akımına tiramin derişiminin etkisi, Lineweaver- Burk grafiğı.....	42
Şekil 4.10. Tiramin biyosensörü için kalibrasyon grafiğı.....	42
Şekil 4.11. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğıinin incelenmesi.....	43
Şekil 4.12. Biyosensörün raf ömrünün incelenmesi	43

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda verilmiştir.

Simgeler	Açıklamalar
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
%	Yüzde
mg	Miligram
g	Gram
mL	Mililitre
μL	Mikrolitre
M	Molar derişim
mM	Milimolar derişim
μM	Mikromolar derişim
V	Volt
mV	Milivolt
μA	Mikroamper
nA	Nanoamper
Δi	Akım farkı
R^2	Lineer regresyon katsayısı
s	Saniye
dk	Dakika

Kısaltmalar	Açıklamalar
BSA	Bovin serum albümin
CPE	Karbon pasta elektrot
CV	Dönüşümlü Voltametri
EC	Enzim Kodu
K_m	Michaelis-Menten sabiti
I_{max}	Maksimum akım farkı
MAO	Monoamin oksidaz

Kısaltmalar**Açıklamalar****MAOI**

Monoamin oksidaz inhibitörü

MCPE

Modifiye karbon pasta elektrot

vFc3A2N

N-naftaliden-(1-kloro-2-formilvinil)ferrosen

V_{max}

Maksimum hız

1. GİRİŞ

Biyojen aminler bitki, hayvan ve mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri sonucu oluşan küçük molekül, antibesleyici özellikleri olan, bazı amino asitlerin dekarboksilasyonuna ya da aldehit, ketonların transaminasyonu ile oluşan, gıdalarda yaygın olarak bulunabilen toksik etki gösterebilen, azotlu bileşiklerdir (Bardocz, ve diğerleri, 1995). Biyojen aminler, kimyasal molekül yapılarına bağlı olarak farklı olarak sınıflandırılabilirler. Alifatik biyojen aminler, putresin, kadaverin, spermin, spermidin ve agmatin gibi bileşiklerden oluşurken, aromatik biyojen aminler tiramin ve feniletilamin gibi bileşikler içerir. Heterosiklik biyojen aminler ise histamin ve triptamin gibi bileşiklerdir. Ayrıca, yapılarında bulunan azot sayısına göre biyojen aminler monoaminler, diaminler ve poliaminler olarak sınıflandırılabilir (Halasz, Barath, Sarkadi ve Holzapfel, 1994). Gıda bozulmasında bir gösterge olarak kabul edilen biyojen aminlerin tespiti gıda kontrol çalışmalarında büyük bir öneme sahiptir.

Tiramin, tirozin ve fenilalaninin dekarboksilasyonu sonucunda oluşan bir biyojen aminlerdir. Olgunlaşmış gıdalardaki protein parçalanmasıyla ortaya çıkar ve yaygın olarak hayvanlar ve bitkilerde bulunan monoamin oksidaz enzimi tarafından metabolize edilir (Batra , Lata, Devi, Yadav ve Pundir, 2012). Tiramin, çikolata, şarap, bira, peynir, fasulye, muz kabuğu, ketçap ve soya ürünleri gibi belirli gıdalarda yüksek miktarlarda bulunur. Yüksek miktarda alınan tiraminin baş ağrısına, çarpıntıya, bulantıya, kusmaya ve hipertansif krize neden olabildiği bilinmektedir (Batra ve diğerleri, 2012).

Tiramin, vücutta düşük seviyelerde bulunan ve özellikle nöronlardaki keseciklerde biriken ve çeşitli fizyolojik reaksiyonlara yol açabilen bir bileşiktir. Sindirildiğinde, kan basıncının artması, damarların daralması, kalp atış hızında artış ve noradrenalin salınımında artış gibi birçok etkisi olabilir. Gıda endüstrisinde tiramin tayini, zayıf sağlık koşullarına bağlı olarak bozuk gıda üretim süreçlerinin olası göstergelerini sunması nedeniyle büyük önem taşır (Lata, Yadav, Bhardwaj ve Pundir, 2011).

Biyojen aminlerin kalitatif ve kantitatif tayini için florimetri, kromatografi, kapiler elektroforez, elektrokimyasal yöntemler gibi farklı teknikler kullanılmaktadır. Bu teknikler arasında kromatografik yöntemler, biyojen amin analizlerinde yaygın olarak tercih edilen yöntemlerdir. İnce tabaka kromatografisi (TLC), gaz-sıvı kromatografisi (GLC) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), sık olarak kullanılan biyojen amin tayin

yöntemleridir. Bu yöntemler arasında HPLC, en yaygın olarak kullanılan yöntemdir (Özdestan ve Üren, 2005). Gıdalarda kalite kontrolü için kullanılan cihazların yüksek fiyatı ve işletim maliyeti, uzun analiz süresi ve bu cihazların kullanımı için iyi eğitilmiş operatörlere ihtiyaç duyulması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Buna karşılık, elektrokimyasal yöntemler kolay kullanılabilen, yüksek hassasiyete sahip ve düşük maliyetli avantajlara sahip olan tekniklerdir (Erdoğan, 2018).

Biyosensörler, fizikokimyasal analiz sistemleri ve biyolojik materyallerin bir araya getirilmesiyle oluşturulan analitik sistemlerdir. Biyosensör sisteminde biyolojik materyalin yüksek özgülülüğü ile fiziksel analiz parçasının tespit duyarlılığı birleştirilmiştir. Günümüzde biyosensör çalışmaları, özellikle sağlık sektörü başta olmak üzere çevre analizleri, askeri uygulamalar, gıda, farmasötik ve kimya endüstrileri gibi birçok alanda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. (Kökbaş, Kayrın ve Tuli, 2013).

Bu tez çalışmasında, monoamin oksidaz enzimi kullanılarak yeni bir amperometrik biyosensör geliştirildi. Bu amaçla ilk defa Araş. Gör. Selinsu Dikim ve Prof. Dr. Nurşen Sarı tarafından sentezlenen N-naftaliden-(1-kloro-2-formilvinil)ferrosen ($vFc3A2N$) bileşiği karbon pasta elektrotu modifiye edildi. Modifiye karbon pasta elektrot yüzeyine çapraz bağlama yöntemi kullanılarak monoamin oksidaz enzimi immobilize edildi.

Tiramin tayini, +0,5 V potansiyelde enzimatik olarak üretilen H_2O_2 'nin $Ag/AgCl$ 'ye karşı yükseltgenmesi ile gerçekleştirildi. Sonrasında tiramin biyosensörü için optimum çalışma şartları incelendi. Ayrıca biyosensör için doğrusal çalışma aralığı, alt tayin limiti, $K_m(göz)$ ve $I_{max(göz)}$ değerleri tespit edildi. Biyosensör performansını etkileyen faktörler olan tekrarlanabilirlik, raf ömrü, girişim etkisi çalışmaları yapıldı. Hazırlanan biyosensör peynir numunesinde tiramin tayini için uygulandı.

2. GENEL BİLGİLER

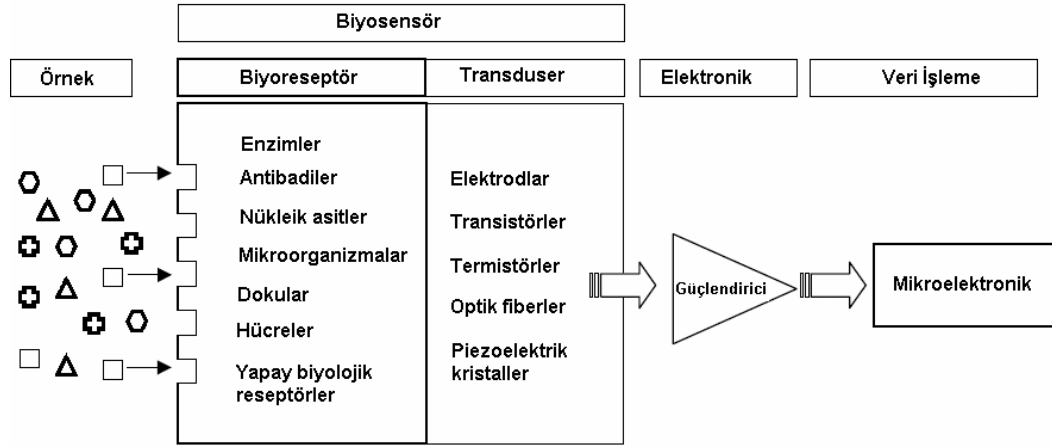
2.1. Biyosensörler

Biyosensörler, 1962 yılında Leland C. Clark adlı bir bilim insanının enzim elektrotlarını geliştirmesiyle başladı. Bu dönemden itibaren, çeşitli araştırma toplulukları, çok büyük ölçekli entegrasyon (VLSI), fizik, kimya ve malzeme bilimi gibi farklı alanlardan bir araya gelerek güvenilir ve olgun biyoalgılama cihazları geliştirmeye odaklandı. Bu cihazlar, tıp, tarım, biyoteknoloji gibi alanlarda uygulama potansiyeline sahip olmakla birlikte, askeri ve biyoterörizm tespiti ile önlenmesi gibi alanlarda da önemli bir rol oynamaktadır (Mohanty ve Kougianos, 2006).

Biyosensörler, biyolojik bir tanıma elemanı kullanarak kısa sürede bilgi sağlayabilen analitik cihazlar olarak tasarlanmıştır. Tespit edilecek bileşik, sensör üzerine immobilize edilmiş hedef molekülle (örneğin, bir alerjene karşı tepki veren antikor veya alerjene özgü bir DNA parçası) etkileşime girmelidir ve bu etkileşim sonucu açığa çıkan ürünün oluşturduğu sinyal nicel olarak ölçülebilir olmalıdır. Biyosensörler, uygulama kolaylığı, küçük boyutları, hızlı sonuç gibi avantajlar nedeniyle günden güne yaygınlaşmaktadır (Monaci ve Visconti, 2012).

2.1.1. Biyosensörlerin yapısı

Biyosensörler, analiz edilecek madde ve biyoaktif yapının etkileşimesi sonucu oluşan sinyali ileten bir iletken yapıyla birleştirilmiş ve ölçüm sistemlerinin kullanıldığı yapılardır. Biyosensör uygulamalarında, analiz edilecek maddeye analit, biyosensör yapısındaki unsurlara (enzimler, antikorlar, nükleik asitler, immuno ajanlar vs.) biyoreseptör adı verilir (Tüylek, 2017). Biyoreseptörler, analiti algılayan ve seçici olarak etkileşime giren yapılardır. Reseptörler fizyolojik süreçlerin aracıları olmalarının yanı sıra çeşitli toksinler ve ilaçlar için de doğal hedeflerdir (Chambers ve Arulanandam, 2008)



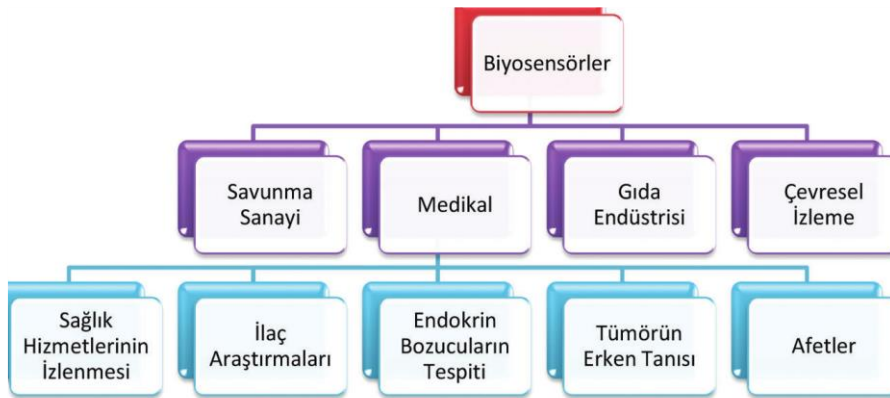
Şekil 2.1. Biyosensörlerin çalışma prensibi (Aykut ve Temiz, 2006)

2.1.2. Biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörler, kullanılan sinyal dönüştürme aracına göre veya biyoreseptör türlerine göre sınıflandırılmaktadır. Sinyal dönüştürme aracına göre; elektrokimyasal biyosensörler, optik biyosensörler, piezoelektrik biyosensörler (kütle algılama yöntemleri), kalorimetrik biyosensörler (termal algılama) olarak kategorize edilmektedir (Özer, Tezel, Sanajou, Yirün, ve Baydar, 2022).

2.1.3. Biyosensörlerin kullanım alanları

Biyosensörler, yaşam kalitesini artırmayı hedefleyen geniş uygulama alanına sahip biyoanalitik cihazlardır. Tıp, savunma sanayi, gıda endüstrisi, çevre kirliliği, medikal alan biyosensörlerin olası uygulama alanlarından bazılarıdır (Özer ve diğerleri, 2022).



Şekil 2.2. Biyosensörlerin kullanım alanları (Özer ve diğerleri, 2022)

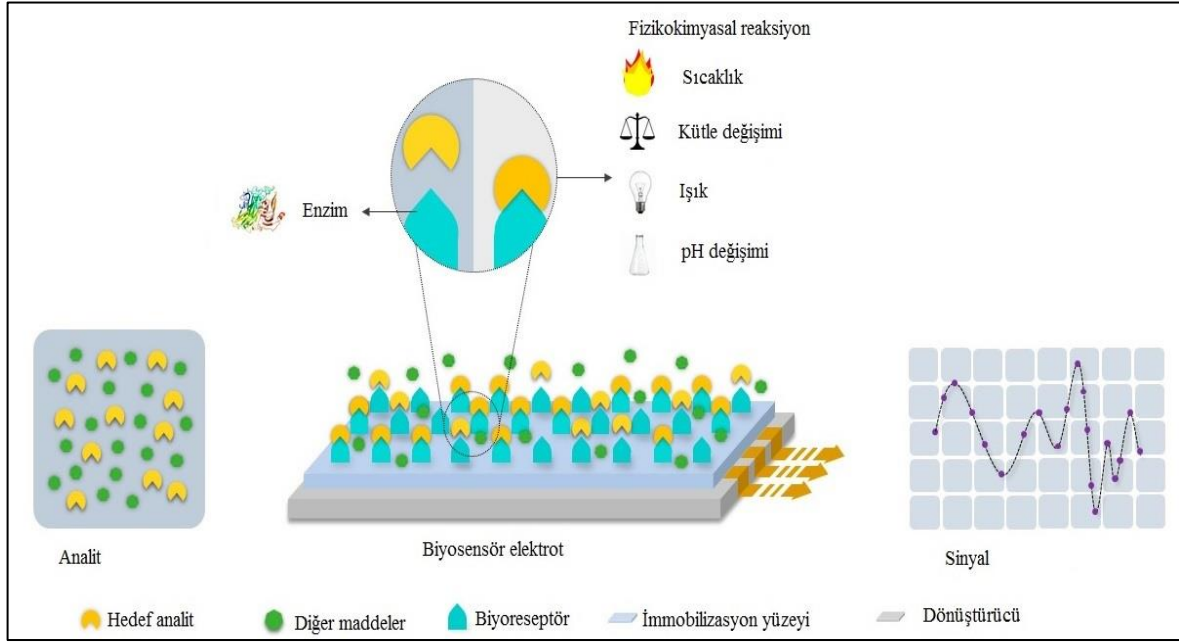
Biyomedikal alan, biyosensörler için en ideal pazarlardan biridir. Bu sektörde uygulanmış ilk biyosensör örneği enzim sensörleridir. Glukoz oksidaz elektrodu olarak bilinen ve ticari olarak üretilen ilk biyosensör, kan ve idrarda glukoz tayinini sağlayarak şeker hastalığı teşhisinde kullanılmaktadır (Çalışkan , 2012).

Enzim sensörleri, gıda endüstrisinde glukoz gibi monosakkaritler, amino asitler, laktik asit gibi organik asitler, üre, alkol gibi madde tayinlerinde kullanılmaktadır. Aynı zamanda, gıda yapısındaki pestisitler, toksinler, yabancı hormon yapıları gibi yabancı maddelerle birlikte aroma ve tazelik gibi karmaşık parametrelerin belirlenmesi için de biyosensörler kullanılmaktadır (Çalışkan , 2012).

Biyosensörler, ilaçların kullanım amaçları dışında kullanılması ve uyuşturucuyla mücadelede de büyük öneme sahiptir. Uyuşturucu arama amacıyla kullanılan köpeklerin yerine biyosensörlerin kullanılması mümkündür. Bu sayede gümrüklerde zaman kazanılmaktadır. Ayrıca çevre kirliliği (toprak, hava, su gibi) denetim sistemlerinde mikrobiyal sensörler ve enzim sensörleri tercih edilmektedir (Çalışkan , 2012).

2.2. Enzimler ve Enzim Temelli Sensörler

Biyosensör yapısında biyobileşen olarak enzimlerin kullanıldığı sensörlerdir. Enzimler katalitik işlev gösteren genellikle protein yapılı biyolojik moleküllerdir. Tepkime esnasında oluşan enzim-substrat kompleksi, tepkime sonunda ürüne dönüşür. Biyosensör, üründen doğrudan veya dolaylı olarak oluşan sinyallerin ölçümünü sağlar. Enzim biyosensörlerinin kullanım alanları, enzim-substrat etkileşimiyle tepkimelerin gerçekleşmesi ve biyokatalizin hızlı, verimli ve yüksek spesifiklikte olması sayesinde genişletilmektedir. (Keskin ve Arslan , 2020).



Şekil 2.3. Enzim esaslı biyosensörlerin çalışma şeması (Akbıyık, 2022)

Enzim sensörleri, enzimi içeren biyoaktif tabakanın bir iletimciyle birleştirilerek oluşturulan bir sistemdir. Bu sensörlerde zarlar, sinyal yükselticiler, mikro işlemciler ve kaydedici/bilgisayar sistemleri, amaçları doğrultusunda aktif tabakanın iç ve dış yüzeylerinde kullanılabilir. Enzim elektrodunda, enzimi katalizleyen bir tepkimeye uygun bir iletim ve ölçüm sistemiyle entegre edilen biyoaktif tabaka bulunur. İletici sistem, biyoaktif tabakadaki enzimatik reaksiyon sonucunda açığa çıkan ürün miktarındaki artışı tespit edebilmelidir. Biyoaktif tabaka ve iletimci ara yüzeyindeki derişimlerin hızla dengeye ulaşabilmesi için biyoaktif tabakanın olabildiğince ince olması gerekmektedir. İletimci sistemin ölçüm sistemine ilettiği sinyal, biyoaktif tabaka ve iletimci ara yüzeyindeki derişimlerdeki değişikliklere bağlıdır. Genellikle kalibrasyon grafiği çizilerek sonuca ulaşılır, çünkü bu derişimler genellikle ölçüm çözeltisindeki derişimlerle orantılıdır (Çalışkan , 2012).

Enzim inhibisyonu temelli biyosensörler, enzim aktivitesinin inhibisyonunu kullanarak analitleri algılayan sensörlerdir. Enzim inhibisyonu temelli biyosensörlerin çalışma prensibi, analitlerin hedef enzimler üzerinde inhibisyon etkisi yaratmasıdır. Bu inhibisyon etkisi, biyosensörler tarafından tespit edilebilir ve analit derişimini belirlemek için kullanılabilir (Sheo, Upadhyay, ve Verma, 2013).

Enzim inhibisyonu temelli biyosensörlerin yapısı genellikle üç ana bileşenden oluşur:

1. Substrat: Hedef enzimin reaksiyonunu katalize ettiği bir molekül veya bileşendir. Analit tarafından inhibe edilen bir enzim reaksiyonu ile substratın dönüşümü sağlanır.
2. Enzim: Substratın dönüşümünü katalize eden enzimdir. Analit tarafından inhibe edilirse, enzim aktivitesi azalır veya tamamen durur.
3. Algılama sistemi: Enzim reaksiyonunun sonucunu tespit etmek için kullanılan bir algılama yöntemidir. Bu, renk değişimi, elektriksel sinyal değişimi veya floresan gibi farklı yöntemler olabilir. Algılama sistemi, enzim inhibisyonunun seviyesini tespit ederek analitin varlığını veya derişimini belirler.

Tersinir ve tersinmez inhibisyon olmak üzere iki sınıfta incelenebilen inhibisyon türleri vardır. Tersinmez inhibisyonda, inhibitör molekülüleri enzim aktif merkezine kovalent bağ ile bağlanır ve enzimin yapısını değiştirerek katalitik aktiviteyi tamamen ve geri dönüşü olmayacak şekilde yok eder. Diğer yandan, tersinir inhibisyonda enzim ve inhibitör arasında değiştirilebilir bir denge oluşur ve bu durum tersine çevrilebilir. Enzimin inhibitöre olan ilgisi, K_i sabitiyle ifade edilebilir (Bodur, 2019).

2.2.1. Elektrokimyasal esash sensörler

Elektrokimyasal biyosensörler, kimyasal sensörlerin bir alt sınıfıdır ve elektrokimyasal transdüserlerin yüksek hassasiyetini biyolojik tanıma süreçlerinin özgülüğüyle birleştirir. Bu cihazlar, hedef analit ile seçici bir şekilde etkileşime girerek incelenen analit derişimiyle orantılı elektriksel bir sinyal üreten biyolojik tanıma unsurlarını (enzimler, proteinler, antikolar, nükleik asitler, hücreler, dokular veya reseptörler) içerir. (Ronkainen, Halsall ve Heineman, 2010).

2.2.2. Optik esash sensörler

Optik sensörler, ultraviyole, görünür bölge veya yakın kızılötesi bölgede gerçekleşen absorbans, yansıma veya floresan emisyonlarının ölçümüne dayanan sensör türüdür (Borisov ve Wolfbeis, 2008). Floresan tabanlı bir cihaz, radyasyonun daha önceki absorpsiyonunun ve çok kısa süre devam eden uyarılmış durumun oluşmasının neden olduğu elektromanyetik radyasyon emisyonunun frekansındaki derişikliği tespit eder. Tek

moleküller, hücre düzeyinde bile ölçülen parlak sinyaller üretmek için tekrar tekrar uyarılabilir (Monošík, Stred'anský ve Šturdík, 2012).

2.2.3. Kalorimetrik esaslı sensörler

Kalorimetrik biyosensörler, biyomoleküllerin sıcaklık sensörlerine bağlanmasıyla oluşturulur. Analit ile etkileştiğinde, analitin derişimiyle orantılı olarak reaksiyon ısısı ölçülür. Toplam üretilen veya emilen ısı, molar entalpi ve reaksiyondaki toplam molekül sayısı ile ilişkilidir. Sıcaklık ölçümü termistör adı verilen bir cihazla yapılır ve bu tip cihazlara enzim termistörleri denir. Termal sensörler, sık sık tekrar kalibrasyon gerektirmez ve numunenin optik ve elektrokimyasal özelliklerinden etkilenmezler (Mohanty ve Kougianos, 2006). Kalorimetrik biyosensörler, gıda, kozmetik, farmasötik ve diğer bileşen analizleri için kullanılmaktadır (Monošík, Stred'anský ve Šturdík, 2012).

2.2.4. Piezoelektrik esaslı sensörler

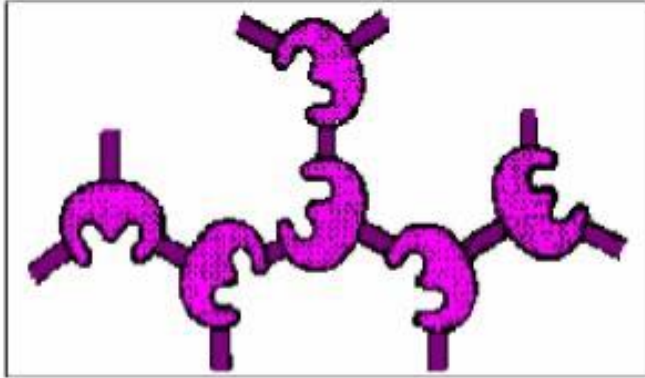
Piezoelektrik esaslı sensörler, biyoelementin bir piezoelektrik bileşen olduğu, genellikle altın elektrotlarla kaplanmış kuvars kristaliyle bağlanmasına dayanır. Pek çok malzeme türü piezoelektrik etki gösterir. Bunlar; kuvars, turmalin, lityum niyobat veya tantalat veya alüminyum nitrür olabilir. Bu kristaller, belirli bir frekanstaki elektrik sinyalinin uygulanmasıyla belirli bir frekansta titreştirilebilir. Bu şekilde, salınım frekansı, kristal kütlelerinin yanı sıra kristale uygulanan elektrik frekansına bağlıdır. Moleküllerin bağlanmasıyla kütle artması, kristal salınım frekansını değiştirir. Bu değişiklik elektriksel olarak ölçülebilir ve kristalin ek kütlelerini belirlemek için kullanılabilir (Monošík, Stred'anský, & Šturdík, 2012). Kristal üzerine uygulanan uygun tanıma katmanı veya molekülü kaplandığında pek çok molekül algılama sağlanabilir. Bu da piezoelektrik sensör uygulamalarını önemli kılmaktadır (Tombelli, Minunni ve Mascini, 2005).

2.3. Biyosensörlerde Biyobileşen İmmobilizasyonu

Biyosensörler, farklı özelliklere sahip iki bileşenin (dönüştürücü ve biyobileşen) birleşiminden oluşur. Uygun bir biyoreseptör ve dönüştürücü seçimi yapıldıktan sonra, en önemli zorluk bu iki bileşenin birbirine bağlanmasıdır ve bu bağlama işlemine biyoreseptör

immobilizasyonu denir. İmmobilizasyon, biyoreseptör kararlılığı ve tekrar kullanılabilirliği açısından büyük avantajlar sağlamaktadır (Çalışkan , 2012).

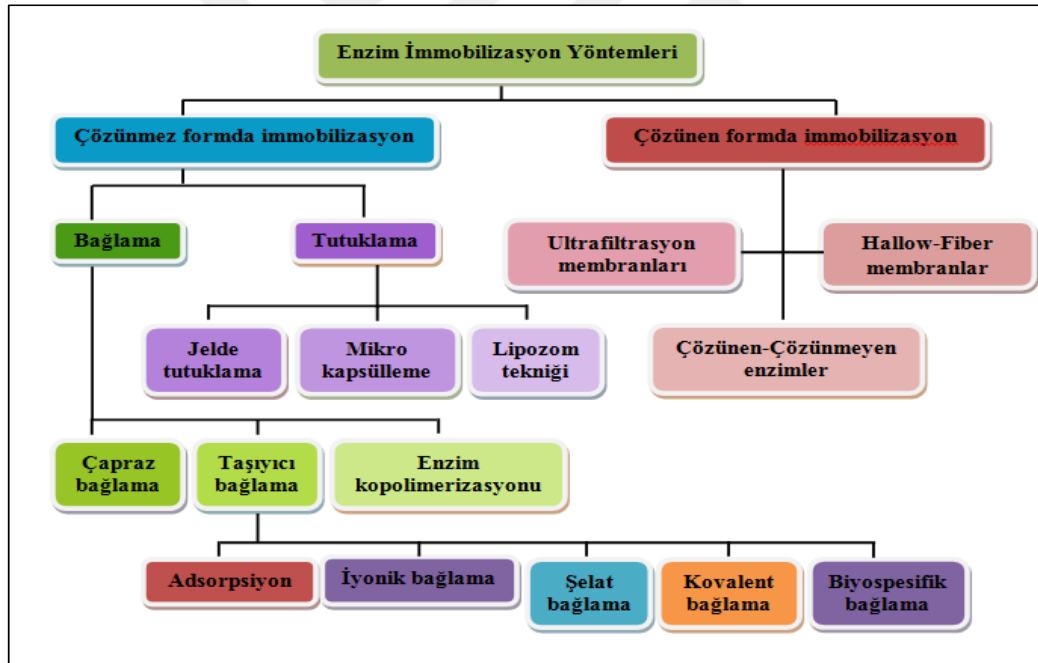
Biyosensör sistemlerinde, enzimler en yaygın kullanılan biyobileşen türüdür. Enzim immobilizasyonu, enzim sensör tasarımının en önemli adımlarından biridir. Biyosensör kararlılığının yüksek, hassas ve tekrar tekrar kullanılabilir olması için enzim ile destek maddesi arasındaki etkileşimin güçlü olması gerekmektedir. Biyosensör çalışmasının özelliklerine bağlı olarak, enzim immobilizasyonu için kullanılan yöntemler farklılık gösterebilir (Andreescu ve Marty, 2006). İmmobilizasyon metodlarının avantaj ve dezavantajları olabilmektedir. Çarpraz bağlanma metodu uygulama kolaylığı nedeniyle sık tercih edilen bir yöntemdir. Yöntemde en önemli dezavantaj ise çarpraz bağlanma enzimin aktif merkezini etkileyecek şekilde gerçekleşirse enzim aktivitesinde düşmeye neden olabilir. Bu sebeple, çarpraz bağlayıcı olarak kullanılan reaktif miktarı uygun şekilde optimize edilmelidir (Çil, 2014).



Şekil 2.4. Çarpraz bağlanma metodunun şematik gösterimi (Çil, 2014)

Sık tercih edilen çarpraz bağlanma reaktifleri; gluteraldehit, kloroformat ve karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsülfonlar, p- benzokinon, transizyon metal iyonları ve epiklorhidrinlerdir (Çalışkan , 2012).

Çizelge 2.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri



Enzim immobilizasyon teknikleri, immobilizasyon işlemi sırasında oluşabilecek sorunlara hızlı ve etkili çözümler sunmaktadır, ancak her enzim için kabul edilen genel bir yöntem bulunmamaktadır.

Enzim immobilizasyon yöntemi seçilirken, kullanılan enzimin kimyasal yapısı, substrat ve ürünün özellikleri, açığa çıkan ürünün kullanılacağı alanlar dikkate alınmalıdır. Ayrıca, enzimin aktif merkezinin kimyasal yapısını değiştirmeyecek, enzim aktivitesinin düşmesine neden olmayacak bir yöntem seçilmesine dikkat edilmelidir (Kasavi, 2006).

Çizelge 2.2. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması

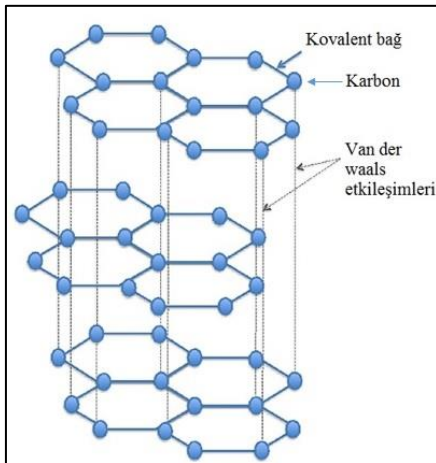
Özellik	Fiziksel Adsorpsiyon	İyonik Bağlama	Çapraz Bağlama	Kovalent Bağlama	Tutuklama
Hazırlama	Kolay	Kolay	Zor	Zor	Zor
Bağlanma Gücü	Zayıf	Orta	Kuvvetli	Kuvvetli	Kuvvetli
Enzim Aktivitesi	Düşük	Yüksek	Orta	Yüksek	Yüksek
Tekrar Kullanılabilirliği	Mümkün	Mümkün	İmkansız	Nadiren	İmkansız
Maliyeti	Düşük	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek
Kararlılık	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Uygulanabilirlik	Düşük	Orta	Düşük	Orta	Yüksek

2.4. Karbon Pasta

Karbon pasta elektrotlar, camsı karbon elektrotlar, karbon nanotüpler, kompozit elektrotlar ve metal elektrotlar gibi birçok elektrot çeşidi yaygın olarak kullanılmaktadır (Bodur, 2019).

Karbon, geniş bir anodik potansiyel aralığına, düşük elektrik direncine, düşük artık akıma, tekrarlanabilir yüzey yapısına ve sulu ortamda hem indirgeme hem de yükseltme bölgelerinde geniş bir çalışma aralığına sahip olduğu için uygun bir elektrot malzemesidir. Ticari camsı karbon elektrotlar, bir elektrotta bulunması gereken birçok özelliği içermektedir. Ancak maliyetli olmaları, alternatif karbon çalışma elektrotlarının geliştirilme ihtiyacını ortaya çıkarmaktadır. Karbon pasta elektrotlar, karbonun organik bir sıvı olan nujol gibi bir maddeyle karıştırılıp pasta haline getirildikten sonra elektrotun gövdesine doldurularak sıkıştırılmasıyla hazırlanır. Elektriksel iletim için bir iletken tel kullanılır.

Çeşitli karbon türleri, elektrot malzemesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. HOPG (yüksek düzenli pirolitik grafit), tek kristalli grafit, iç içe geçmiş karbon, lifli karbon, karbon siyahı, cam veya seramik karbon ve toz grafit gibi farklı tipler en sık tercih edilenler arasındadır (Polatoğlu, 2018).



Şekil 2.5. Grafit molekülünün yapısı (Akbıyık, 2022)

Grafitler, altıgen karbon dizilimine sahip levha benzeri tabakalı bir yapısı olan petek şeklinde bir yapıya sahiptir. Bu yapı, farklı karbon türlerinin grafit tabakaları arasına farklı şekillerde yerleştirilebilmelerini sağlar. Grafitler anizotropdur, yani farklı yönlere göre farklı özelliklere sahiptir. Örneğin, levhaların paralel olduğu bölgelerde elektriksel iletkenlik daha

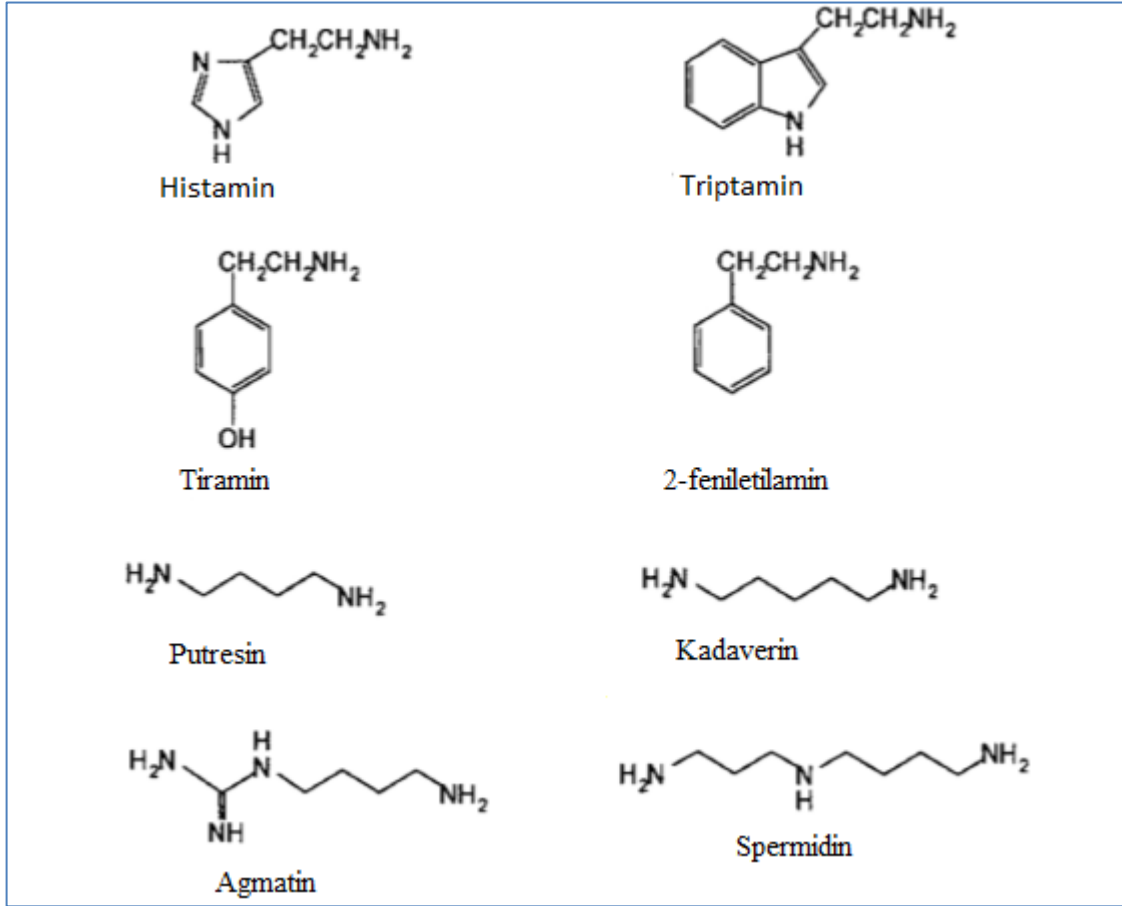
yüksektir. Elektrotlarda sıkça kullanılan başka bir karbon türü ise toz grafit olarak bilinir. Bunun tercih edilmesinin nedeni, grafit tozunun yüksek saflıkta olması, düşük emilim kapasitesine sahip olması ve mikron boyutunda parçacıklara sahip olmasıdır. Karbon elektrot pastasının önemli bir bileşeni ise pastayı bağlayıcı özelliklere sahip sıvılardır. Bu sıvılar, yüksek viskoziteye, hidrofilik olmaya, uçucu olmamaya, organik çözücülere dayanıklı olmaya ve topaklanmayı önleyici özelliklere sahip olmalıdır. Ayrıca, bu sıvılar elektriksel olarak etkisiz ve inert olmalıdır. Nujol ve uvasol gibi yağlar, karbon elektrot pastalarında yaygın kullanım alanına sahip bağlayıcı sıvılar arasındadır ve mineral yağı veya parafin olarak da bilinirler. Aynı amaçla organofosfat sıvılar, elektrolitik sıvılar veya silikon yağı da tercih edilebilir. Bu bağlayıcı sıvılar, elde edilen karbon elektrot pastalarının düşük omik dirence (yüksek iletkenlik) sahip olmasını sağlar. Ayrıca, bağlayıcı sıvının suda çözünmeyen olması, karbon elektrot pastalarının lipofilik özellik göstermesine neden olur. Bununla birlikte, bu elektrotların heterojen bir yapıya sahip olmaları ve organik çözücülere karşı hassas olmaları gibi bazı dezavantajları vardır (Polatoğlu, 2018).



Şekil 2.6. Grafit tozu ve karbon pastaya uygulanması (Bodur, 2019)

2.5. Biyojen Aminler

Biyojen aminler, biyolojik aktivitesi olan, düşük molekül ağırlıklığına sahip organik bazlardır. Aromatik, alifatik ve heterosiklik yapıda olan biyojen aminler canlılarda metabolik aktivitenin sonucu olarak parçalanabilirler ve genellikle amino asitlerin dekarboksilasyonu ile üretilirler (Halasz ve diğerleri, 1994). Normal koşullarda biyojen aminler sindirim sistemi içerisinde monoamin oksidaz (MAO), diamin oksidaz (DAO) ve N- metil transferaz enzimleri tarafından detoksifiye edilirler. Böylelikle fazla miktarda alınmadıklarında vücutta toksik etki oluşturmazlar (Özdestan ve Üren, 2005).



Şekil 2.7. Biyojen amin çeşitleri (Önal, 2007).

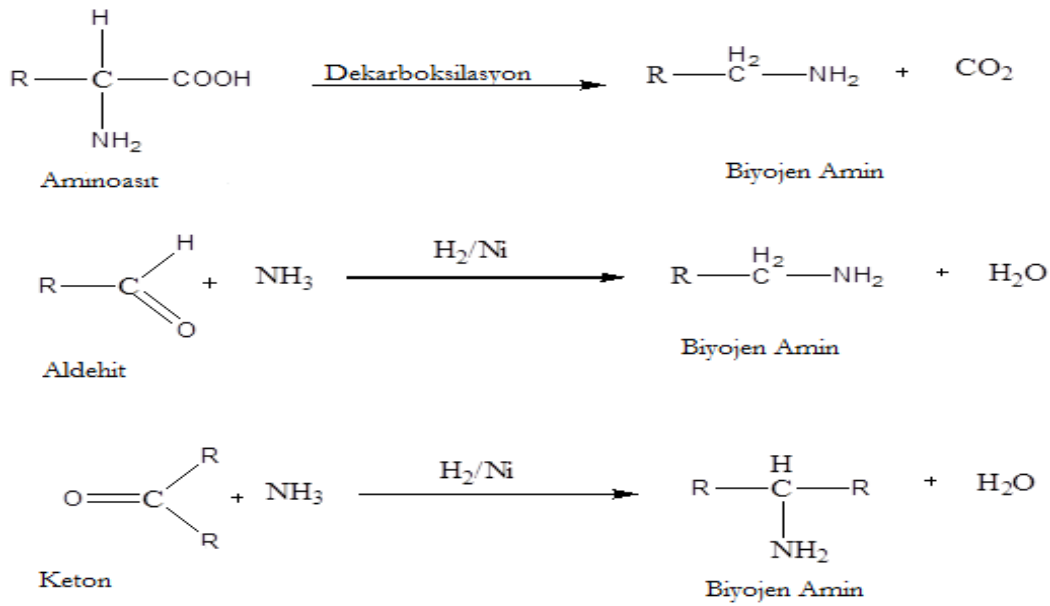
Biyojen aminlere peynir, şarap gibi fermente olmuş gıdalarda ve proteince zengin gıdaların bozulması sonucu rastlanır. Gıdalarda bulunan bazı biyojen aminler, putresin, kadaverin, histamin, tiramin, triptamin 2-feniletilamin, spermin, spermidindir (Düz ve Fidan, 2016) (Şekil 2.7). Gıdalarda mikrobiyal bozulma ile dekarboksilaz aktivitesi artmaktadır. Böylelikle ortamda biyojen amin varlığı gıda bozulmasının olası göstergesi olmaktadır (Karahan, 2003). Biyojen aminlerden histamin, tiramin, putresin, spermidin gıda zehirlenmesine sebep oldukları için ayrı bir öneme sahiptir (Erginkaya ve Var, 1989).

2.5.1. Biyojen aminlerin oluşum mekanizmaları

Biyojen aminler genellikle serbest aminoasitlerin dekarboksilasyonu veya aldehit ve ketonların transaminasyonu yoluyla oluşurlar. Aminoasitlerin dekarboksilasyonu, α -karboksil grubunun öncü bir aminoasitten çıkmasıyla biyojen amin oluşumunu sağlar (Ercan, Bozkurt ve Soysal, 2013). Protein ve serbest amino asit içeren mikrobiyal veya biyokimyasal aktiviteyi sağlayan koşullarda bulunan tüm gıdalarda biyojen amin oluşumu

beklenir. Yiyecek ve içeceklerdeki biyojen amin oluşumu enzimler tarafından veya aminoasitlerin mikrobiyal dekarboksilasyonu ile gerçekleştirilir (Santos, 1996)

Biyojen aminlerin gıdalarda oluşumu iç ve dış etkenlere bağlıdır. Bunlar; sıcaklık, pH, oksijen ihtiyacı, karbon kaynağı varlığı, ortamdaki koenzim, serbest aminoasitler ve fermente edilebilen karbonhidratlar olarak ifade edilebilir (Akan ve Demirağ, 2018).



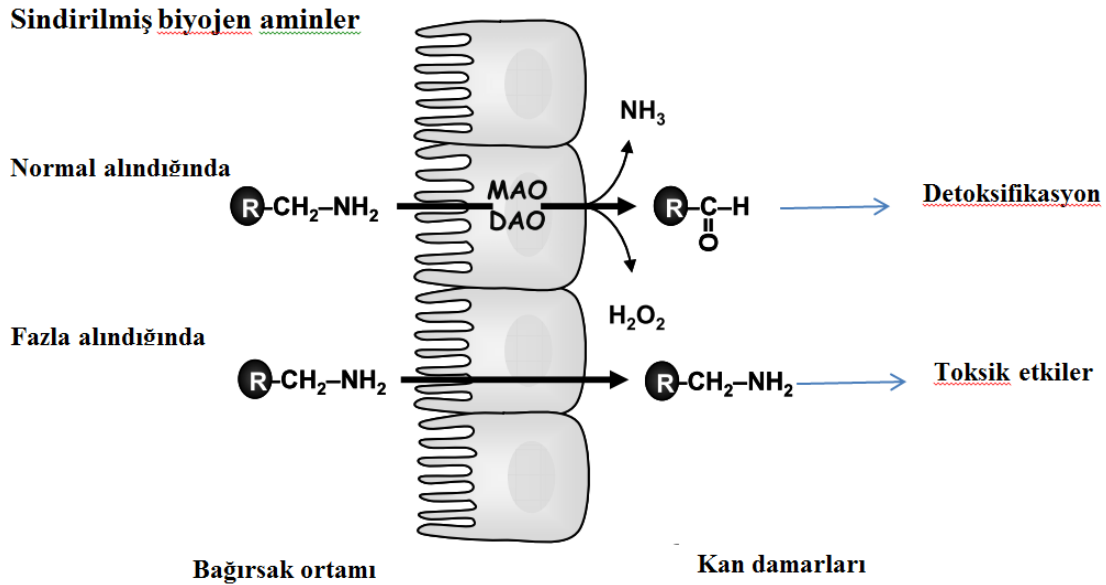
Şekil 2.8. Biyojen aminlerin oluşum mekanizması (Düz ve Fidan, 2016)

2.5.2. Biyojen aminlerin tayin yöntemleri

Biyojen aminler, organizmaların metabolizmasında önemli rol oynayan organik bileşiklerdir ve genellikle gıda kaynaklarından alınır. Bu nedenle, biyojen aminlerin tayini ve analizi, gıda güvenliği ve kalitesi açısından büyük bir öneme sahiptir. Yapılan araştırmalar, biyojen amin yüksek derişimlerin insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri olabileceğini göstermiştir. Biyojen aminlerin tayini için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi (GC) ve elektrokimyasal yöntemler, biyojen aminlerin tayininde yaygın olarak kullanılan analitik tekniklerdir (Özdestan ve Üren, 2005; Önal, 2007).

2.5.3. Biyojen amin tayininin önemi

Normal şartlarda gıdalarla vücuda alınan biyojen aminler sindirim sisteminde sindirilir ve toksit etki oluşturmazlar. Biyojen amin, bağırsak ortamından kan damarlarına geçerken monoamin oksidaz (MAO), diamin oksidaz (DAO) veya histamin-N-metil transferaz enzimleri tarafından detoksifikasyona uğrayarak aldehit veya ketonlara dönüşür ve toksit etki oluşturmazlar (Özdestan & Üren, 2005). Yüksek miktarlarda biyojen amin alındığında, sindirim sisteminde monoamin oksidaz (MAO) ve diamin oksidaz (DAO) enzimlerinin genetik olarak eksik olduğu durumlarda, bu enzimleri inhibe edici ilaçlar kullanıldığında (örneğin, ağrı kesici, stres ve depresyon tedavisi için kullanılan ilaçlar, Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının tedavisi için kullanılan ilaçlar) ya da yüksek miktarlarda alkol tüketimi gerçekleştiğinde, biyojen aminlerin toksik etki oluşturuğu bilinmektedir (Özdestan, 2013).

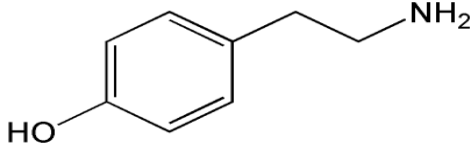


Şekil 2.9. Biyojen aminlerin oksidasyon mekanizmaları (Akan ve Demirağ, 2018)

2.5.4. Tiramin metabolizması

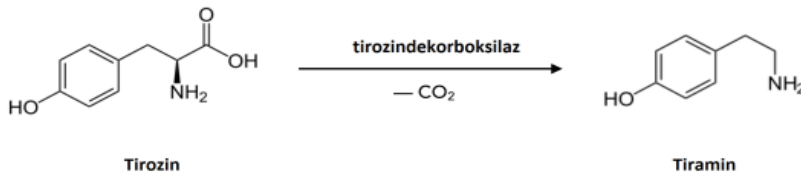
Tiramin (Şekil 2.10), tirozin ve fenilalaninin dekarboksilasyonu sonucunda oluşan bir bileşiktir (Şekil 2.11). Olgunlaşmış gıdalardaki protein parçalanmasıyla ortaya çıkar ve yaygın olarak hayvanlar ve bitkilerde bulunan monoamin oksidaz enzimiyle detoksifikasyona uğramaktadır (Şekil 2.12). Tiramin, olgunlaşmış, fermente veya bozulmuş

gıdalarda bulunma eğilimindedir (Batra ve diğerleri, 2012). Soya ürünleri, peynir çeşitleri, alkollü içecekler, çikolata gibi gıdalarda yüksek miktarlarda tiramin bulunur (Yerlikaya ve Gökoğlu, 2002).

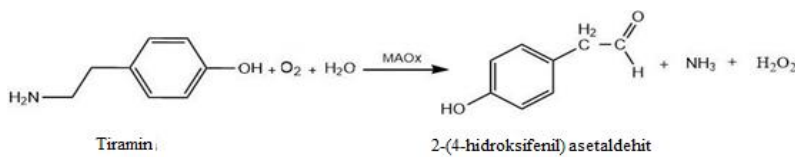


Şekil 2.10. Tiramin'in molekül yapısı

Peynir, yüksek derişimlerde biyojen amin biriktirebilen fermente bir süt ürünüdür ve peynir içerisinde bulunan en zehirli biyojen amin tiramindir (Fernandez, Linares, Rio, Ladero ve Alvarez, 2007). Tiramin, "peynir reaksiyonu" olarak bilinen ve şiddetli migrenlere hatta beyin kanamalarına yol açabilen kan basıncını artıran bir etkiye sahiptir. Peynirde tiramin içeriğini sınırlayan bir mevzuat olmasa da, peynirdeki toksisite eşiklerinin 100-400 mg/kg arasında olduğu bilinmektedir (Burdychova ve Komprda, 2007). Peynirdeki tiramin içeriğinin kontrolü, sadece toksik etkilerinden değil, aynı zamanda gıda kalitesinin bir göstergesi olarak da önemlidir. Tiramin seviyelerinin mikrobiyal kontaminasyonun bir sonucu olarak işleme ve depolama sürecinde uygun olmayan koşullar nedeniyle kademeli olarak artması gıda kalitesi açısından büyük önem taşır (Sánchez, López, Gómez ve Ruiz, 2017).



Şekil 2.11. Tiramin sentezi

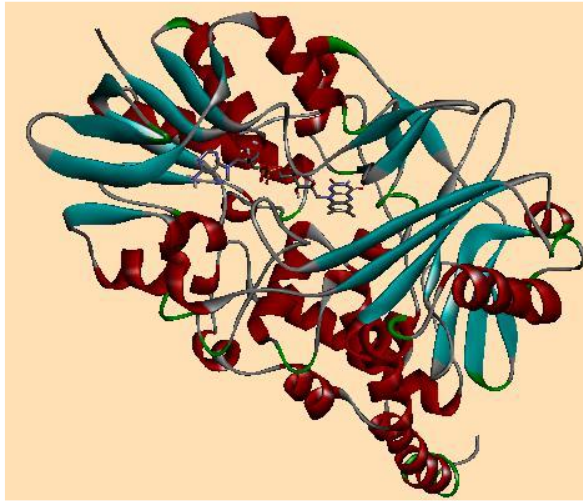


Şekil 2.12. Tiramin'in enzimatik yıkımı

2.6. Monoamin Oksidaz Enzimi

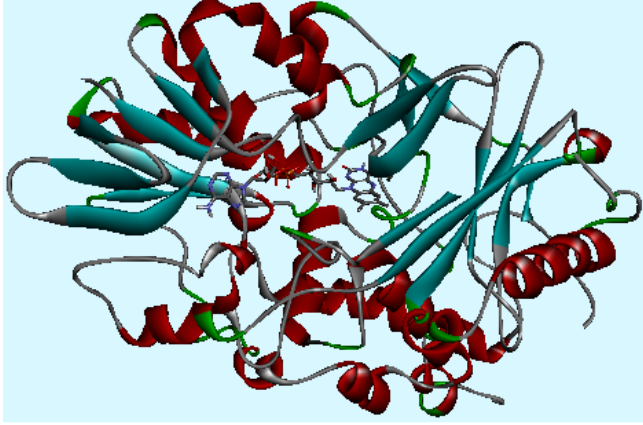
Monoamin oksidaz (EC 1.4.3.4, MAO), elektron alıcısı olarak O₂ kullanarak biyojenik aminlerin oksidatif deaminasyonunu katalize eden membrana bağlı bir flavoproteindir (Edmondson, Bhattacharyya, & Walker, 1993). Monoamin oksidaz, dış mitokondriyal membrana bağlı olarak flavin-adenin dinükleotid (FAD) taşıyan bir enzimdir. c-DNA klonlama çalışmaları sonucunda MAO enzimin MAO-A ve MAO-B olarak adlandırılan izozimik formları olduğu ve amino asit sıralamasının %70 oranında benzerlik gösterdiği bulunmuştur (Yeşilada ve Gökhan, 1995).

MAO-A, serotonin, epinefrin ve norepinefrini metabolize ederken, MAO-B tercihen benzilamin ve feniletilamin'i okside eder. Tiramin ve dopamin ise hem MAO-A hem de MAO-B'nin ortak substratlarıdır.



Şekil 2.13. MAO-A enzimi 3-D gösterimi

Substrat boşluğu, MAO-A'da Ile180, Asn181, Phe208 ve Ile335 kalıntılarını ve MAO-B'de Leu171, Cys172, Ile199, Tyr325 kalıntılarını içerir. FAD koenzimi, MAO-A'da Tyr407, Tyr444 ve MAO-B'de Tyr398, Tyr435 ile çevrilidir (Karaman, 2014).



Şekil 2.14. MAO-B enzimi 3-D gösterimi

Monoamin oksidaz enzimi, gıdalardan elde edilen aminleri oksidatif olarak deaminasyona tabi tutarak bu aminlerin kana geçmeden önce bozunmasında önemli bir rol oynar. MAO inhibitörü ilaçlarının zihinsel depresyon tedavisinde kullanılması, bu detoksifikasyon sürecini etkisiz hale getirir. Sonuç olarak, biyojen aminlerin yüksek derişimleri, gıdalardan alınan aminlerin birikerek hastalarda hipertansiyon krizine yol açtığı bilinmektedir. Başlangıçta MAOI tedavisi gören hastalarda kaydedilen hipertansif reaksiyonlar, peynirle ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, kan basıncındaki artışa artık "peynir reaksiyonu" denilmektedir. Peynir reaksiyonu şiddetli baş ağrılarına neden olabilir ve beyin kanaması veya kalp yetmezliği gibi ciddi sağlık sorunlarına yol açabilir (Shalaby, 1996).

2.7. Kaynak Araştırması

2.7.1. Tiramin biyosensörlerine ait kaynak araştırmaları

Erden ve diğerleri, (2019), grafen oksit (GRO) ve polivinilferrosen (PVF) modifiye karbon pasta elektrotlara dayalı iki tiramin biyosensörünün analitik özelliklerini karşılaştırmışlardır. Diamin oksidaz (DAOx) veya monoamin oksidaz (MAOx), biyosensörleri üretmek için PVF/GRO modifiye edilmiş SPCE üzerine immobilize edilmiştir. Modifiye edilmiş SPCE'lerin yüzey özellikleri ve elektrokimyasal davranışı atomik kuvvet mikroskobu (AFM), taramalı elektron mikroskobu (SEM), enerji dağıtıcı X-ışını spektroskopisi (EDX) ve siklik voltametri (CV) ile incelenmiştir. MAOx/PVF/GRO/SPCE biyosensörü için çalışma potansiyeli +0.50 V - pH 9.0 da optimum özellik göstermiştir. 1 ay sonunda MAOx/PVF/GRO/SPCE biyosensörünün aktivite kaybı %32.5 olarak belirtilmiştir.

Geliştirilen biyosensörler, peynir numunesinde tiramin tayini için başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Erden, Erdoğan, Öztürk, Koçoğlu ve Kılıç, 2019).

Dalkıran ve diğerleri, (2020), biyojen amin tayininde kullanılmak üzere diamin oksidaz (DAOx) ve monoamin oksidaz (MAOx) enzimleri ile platin nanoparçacık (PtNP) modifiye edilmiş ekran baskılı karbon elektrotlar (SPCE) kullanarak biyosensörler geliştirmişlerdir. Biyosensörlerin morfolojik ve elektrokimyasal özellikleri taramalı elektron mikroskopu, enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi, elektrokimyasal empedans spektroskopisi ve siklik voltametri ölçümleri ile incelenmiştir. Biyosensörün çalışma prensibi, tiraminin MAOx ile oksidasyonu sonucu açığa çıkan H_2O_2 'nin elektrokimyasal ölçümüne dayanır. MAOx/PtNP/SPCE biyosensörü için uygun çalışma potansiyeli +0.50 V olarak belirlenmiştir. Tiramin tayininde kullanılan MAOx/PtNP/SPCE biyosensörü için optimum pH 9.5 olarak belirtilmiştir. Tiramine karşı MAOx/PtNP/SPCE biyosensörü, DAOx bazlı biyosensör ile elde edilen duyarlılıktan 1,9 kat daha yüksek duyarlılık göstermiştir. Geliştirilen biyosensörler, peynir numunesinde tiramin tayini için başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Dalkıran, Kaçar, Can, Erden ve Kılıç, 2020).

Batra ve diğerleri, (2012), gümüş nanopartikül- sistein modifiye edilmiş Au elektrot yüzeyine tiramin oksidaz enziminin immobilizasyonuna dayalı amperometrik tiramin biyosensörü geliştirmişlerdir. Enzim elektrodu, taramalı elektron mikroskobu, Fourier dönüşümü yıpranmış spektroskopisi ve siklik voltametri ölçümleri ile incelenmiştir. Biyosensör, 0,25 V, pH 8,5 ve 35 °C'de polarize edildiğinde, doğrusallık 0,017 - 0,25 mM ve 0,01 mM algılama sınırı ile 8 s içinde optimum yanıt gösterdiği belirtilmiştir. Tiramin biyosensörü, 4 °C'de saklandığında 2 ay içerisinde 100 kullanımda aktivitesinin %35'ini kaybetmiştir (Batra ve diğerleri, 2012)

Boka ve diğerleri, (2011), et bozulmalarının izlenmesi amacıyla 3 farklı enzim ile biyosensörler geliştirmişlerdir. Enzimler, peroksidaz ve Os aracılı (PVI7-dme-Os) grafit elektrot üzerine ayrı ayrı immobilize edilmiştir. Monoamin oksidaz A enzimi kullanarak geliştirilen biyosensör ile tiramin, triptamin ve feniletilamin tayini gerçekleştirilmiştir. MAO sensörün HPLC ile sonuçları karşılaştırıldığında doğrusal korelasyon $R_2 = 0,87$ olarak belirtilmiştir (Boka, Adanyi, Virag, Sebela ve Kiss, 2011)

Lata ve diğerleri, (2011), tiramin tayini için, epoksi reçine membranı üzerine kovalent olarak immobilize edilmiş siyah gram tiramin oksidaz kullanarak amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Biyosensör için optimum koşullar pH 8.5 ve 35 °C olarak belirtilmiştir. 0.24 ila 3.47 mg/dL aralığında tiramin derişimleri ile akım (mA) arasında doğrusal bir ilişki gözlenmiştir. Sensörün saptama sınırı 0,24 mg/dL'dir. Enzim elektrodu, 2 aylık bir süre boyunca düzenli kullanımında ilk aktivitesinin %35'ini kaybetmiştir. Biyosensör, bira ve sosta tiraminin belirlenmesi için kullanılmıştır (Lata ve diğerleri, 2011)

Lange ve Wittmann (2001), yapay bir sinir ağı kullanarak örüntü tanıma ve farklı gıda örneklerinde uygulanması ile üç biyojen aminin (histamin, tiramin ve putresin) eş zamanlı belirlenmesi için bir enzim sensör dizisi geliştirmişlerdir. Monoamin oksidaz, tiramin oksidaz ve diamin oksidazın (hızlı tespit için yeterli spesifik aktivitelere sahip) bir kombinasyonu ile bu çapraz bağlayıcı reaktifleri uygunlukları açısından karşılaştırmak için transglutaminaz ve glutaraldehit ile ayrı bir ekran baskılı kalın film elektrot üzerine immobilize edildi. Biyosensör için çalışma potansiyeli +0.70 V - pH 6.5 da optimum özellik göstermiştir. Enzim sensör dizisinin uygulama alanı, peynir çeşitleri, balık, et ürünleri, lahana turşusu, bira şarap gibi gıdalarda test edilmiş ve LC analizlerinin verileriyle karşılaştırılmıştır. Ortalama korelasyon katsayısı 0.854'dür (Lange ve Wittmann, 2001)

Apetrei, M. ve Apetrei, C. (2015), tirozinaz enzimi kullanarak karboksil işlevselleştirilmiş tek duvarlı karbon nanotüp modifiye ederek karbon ekran baskılı elektrot üzerine immobilizasyonu ile yeni bir tiramin biyosensörü geliştirmişlerdir. Döngüsel voltametri yöntemi kullanılarak elektrot yüzeyinde enzimatik olarak üretilen kinon bileşiğinin azalması ile tiramin derişiminin indirgenmiş akımı gözlenmiştir. Optimum koşullar altında (pH 7.0 , -0.20 V) biyosensör 5-180 μM aralığında tiramin derişimini, 0.7414 A $\times\text{M}^{-1}$ hassasiyet ve 0.62 μM algılama sınırına sahiptir. Bu biyosensör için K_m 88.52 μM - I_{max} 5.85 μA olarak hesaplanmıştır. Yeni biyosensör, salamura ve tütsülenmiş balık numunelerinde tiramin miktarlarını belirlemek için başarıyla uygulandığı belirtilmiştir (Apetrei, M. ve Apetrei, C., 2015).

Apetrei, M. ve Apetrei, C. (2013), fosfat katkılı polipirrol ince film üzerine tirozinaz enzimi immobilize ederek yeni bir tiramin biyosensörü geliştirmişlerdir. Polipirrol üzerine immobilize edilen tirozinaz enziminin aktivitesini iyi koruduğu görülmüştür. Tiramin tayini, CV yöntemi kullanılarak -0.25 V potansiyelde (pH 7,0 fosfat tamponu) biyokatalitik olarak

oluşturulmuş dopakinonun doğrudan indirgenmesiyle belirlenmiştir. Biyosensörün çalışma aralığı $4,0 \times 10^{-6} \text{ M} - 80,0 \times 10^{-6} \text{ M}$, duyarlılığı ise 0.1069 A M^{-1} olarak belirtilmiştir. Biyosensörün tespit limiti ise $5,7 \times 10^{-7} \text{ M}$ olarak belirtilmiştir. Geliştirilen biyosensör lahana turşusu örneklerinde tiramin içeriğinin belirlenmesi için uygulanmıştır (Apetrei, M. ve Apetrei, C., 2013).

Sánchez ve diğerleri, (2017), tirozinaz enziminin kalsiyum fosfat materyallerde (CaP'ler) immobilizasyonunu, gluteraldehit ile çapraz bağlanma yöntemini kullanarak, yeni bir tiramin biyosensörü geliştirmişlerdir. Tiramin, CV yöntemi kullanılarak o-dopakinonun -0.1 V potansiyelde elektrokimyasal indirgenmesi ile tespit edilmiştir. Optimum koşullar altında (20°C ve pH 6,0) biyosensörün çalışma aralığı $5,8 \times 10^{-7} \text{ M} - 1,6 \times 10^{-5} \text{ M}$ ve tespit limiti $4,85 \times 10^{-8} \text{ M}$ ve 6 s yanıt süresi olarak belirtilmiştir. Önerilen biyosensörün peynir numunelerindeki tiramin içeriğini belirlemeye uygunluğu bakılmıştır. Gouda ve brie peynirlerinde eklenen ortalama tiramin analitik geri kazanımı sırasıyla 95.5 ± 5.8 ve 96.9 ± 7.5 olarak bulunmuştur (Sánchez ve diğerleri, 2017).

Erden ve diğerleri, (2021), Tirosinazın (Ty) karbon nanolifler (CNF'ler), kitosan (CH), iyonik sıvı 1-bütill-3-metilimidazolyum tetrafloroborat (IL) ile modifiye edilmiş camısı karbon elektrot (GCE) üzerine immobilizasyonuna dayalı yeni bir amperometrik tiramin biyosensörü ve altın nanopartiküller (AuNP'ler) kompozit filmi üretildi. Biyosensörün başarılı bir şekilde üretilmesini sağlamak için taramalı elektron mikroskobu (SEM), enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX), döngüsel voltammetri (CV) ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) teknikleri uygulandı. Ty/AuNPs/CNFs-IL-CH/GCE biyosensörün optimum koşullar altında (-0.25 V, pH 6,5) çalışma aralığı $2,0 \times 10^{-7} \text{ M} - 4,8 \times 10^{-5} \text{ M}$ ve tespit limiti $9,3 \times 10^{-8} \text{ M}$ olarak belirtilmiştir. Ayrıca Ty/ AuNPs/CNFs-IL-CH/GCE biyosensörü, diğer biyogenik aminlerin varlığında tiramine karşı yüksek seçicilik sergilediği belirtilmiştir. Tiramin biyosensörünün uygulanabilirliği, iyi geri kazanımlarla soya sosu örneğinde tiramin seviyesinin saptanmasıyla gösterilmiştir (Erden, Selvi ve Kılıç, 2021) .

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin isimleri ve temin edildikleri üretici firmalar Çizelge 3.1’ de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışma için kullanılan kimyasal madde isimleri ve üretici firmalar

Kimyasal Madde	Temin Edildiği Üretici Firma
Grafit tozu	Merck
Mineral yağ (nujol)	Sigma
Tiramin	Bostonchem
Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	Merck
Monosodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4)	Merck
Glisin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)	Sigma
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Merck
Gluteraldehit ($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$)	Aldrich
Sığır serum albumin (BSA)	Sigma
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma- Aldrich
Monoamin oksidaz enzimi	Sigma- Aldrich
L-Tirozin ($\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$)	Fluka
DL-Triptofan ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$)	Merck
L-Histidin	Fluka
L-Lizin ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$)	Fluka
L-Ornitin-dihidroklorür	Fluka
Dopamin ($\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_2$)	Trc Canada

3.2. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler

Sodyum hidroksit çözeltisi: Katı sodyum hidroksit maddesinden uygun bir miktar tartıldı. Saf su ile çözülerek çalışılacak derişimlerde çözeltiler hazırlandı.

Tiramin çözeltisi: Katı tiraminden uygun miktarda tartılarak saf suda çözüldü. Uygun derişimlerde tiramin çözeltileri hazırlandı. Çözeltiler +4 °C’de buzdolabında saklandı.

Fosfat tamponu: Monosodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) ve disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) hazırlanacak tamponun pH değerine uygun olarak tartılarak saf suda çözüldü.

Hazırlanan çözeltinin pH'sı 0,1 M NaOH ile ayarlandı. Tampon çözelti +4 °C'de buzdolabında saklandı.

Glisin tamponu: 0,1 M pH'sı 10,0 olan glisin tamponu hazırlamak için glisin ile NaOH uygun miktarda tartılarak saf suda çözüldü, tampon çözeltinin pH'sı 0,1 M'lık NaOH ile ayarlandı. Tampon çözelti +4 °C'de buzdolabında saklandı.

Hidrojen peroksit çözeltisi: %35,0'luk hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisinden uygun miktarda alınarak 1,0 M'lık stok çözelti hazırlandı. Stok çözelti seyreltilerek $1,0 \times 10^{-3}$ M ve $1,0 \times 10^{-7}$ M aralığında hidrojen peroksit çözeltileri hazırlandı.

Enzim çözeltileri: Aktivitesi 0,25 mg/mL olan monoamin oksidaz enzimi toplam hacim 10,0 mL olacak şekilde saf su ile seyreltildi. Her biri 1'er mL lik çözeltiler halinde deney tüplerine alındı. Deney sırasında kullanılacak enzim çözeltileri buzdolabında saklandı, uzun süre kullanılmayacak enzim çözeltileri ise derin dondurucuya kaldırıldı.

Gluteraldehit çözeltisi: %25,0'lik gluteraldehit çözeltisi saf su ile seyreltilerek %5,0'lik gluteraldehit çözeltisi hazırlandı. Daha sonra %5,0'lik gluteraldehit çözeltisinden %2,5'luk gluteraldehit çözeltisi hazırlandı. Çözeltiler +4 °C'de buzdolabında muhafaza edildi.

L-Tirozin çözeltisi: Katı L-Tirozin uygun miktarda tartılarak saf su ile çözülerek tirozin çözeltisi hazırlandı.

DL-Triptofan çözeltisi: Uygun miktarda tartılan DL-Triptofan katısı saf su ile çözülerek çözelti hazırlandı. Triptofan çözeltisi +4 °C'de buzdolabında saklandı.

L-Histidin çözeltisi: Katı L-Histidinden hesaplanan miktarda tartılarak histidin çözeltisi hazırlandı. Çözelti +4 °C'de buzdolabında saklandı.

L-Ornitin-dihidroklorür çözeltisi: Katı L-Ornitin-dihidroklorür uygun miktarda tartıldı ve saf su ile çözülerek ornitin çözeltisi hazırlandı. Ornitin çözeltisi +4 °C'de buzdolabında muhafaza edildi.

L-Lizin çözeltisi: Katı L-Lizin gerekli miktarda tartılarak saf suda çözüldü ve lizin çözeltisi hazırlandı. Lizin çözeltisi +4 °C’de buzdolabında muhafaza edildi.

Dopamin çözeltisi: Katı dopamin çözeltisi gereken miktarda tartılarak saf su ile çözüldü ve dopamin çözeltisi hazırlandı. Dopamin çözeltisi +4 °C’de buzdolabında saklandı.

3.3. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

3.3.1. Elektrokimyasal analiz cihazı

Amperometrik ölçme işlerinde bilgisayar bağlantılı olarak çalışan CHI firmasının 1230-B modeli elektrokimyasal analiz cihazı kullanıldı.

3.3.2. Hücre ve elektrotlar

Amperometrik ölçme işlemlerinde 3 elektrotlu ölçme sistemi kullanıldı. Referans elektrot olarak BAS RE-5B no’lu Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak MW-1032 no’lu platin tel ve çalışma elektrodu olarak 0,3 cm çapında (teflondan özel olarak imal edilmiş) karbon pasta elektrot kullanıldı. Çalışma elektrodu her elektrokimyasal çalışma sonrası çalışmanın basamaklarına göre saf su veya tampon çözelti içerisinde +4 °C’de muhafaza edildi.

3.3.3. pH metre

pH belirlenmesi ORION Model 720A pH- iyonmetre ile ölçüldü.

3.3.4. Su banyosu

Sıcaklık ölçümünün yapılacağı çalışmalarda Grant GD120 marka 0-100 °C’ da hassasiyet gösteren termostatl dolaşım sistemli su banyosu kullanıldı.

3.3.5. Mikro pipet

10,0 µL-1000,0 µL çözeltilerin hücre içerisine ilaveleri ve gerekli olduğu durumlarda çözelti hazırlanması Brand marka $\pm 0,05$ µL hassasiyeti olan mikropipetler ile yapıldı.

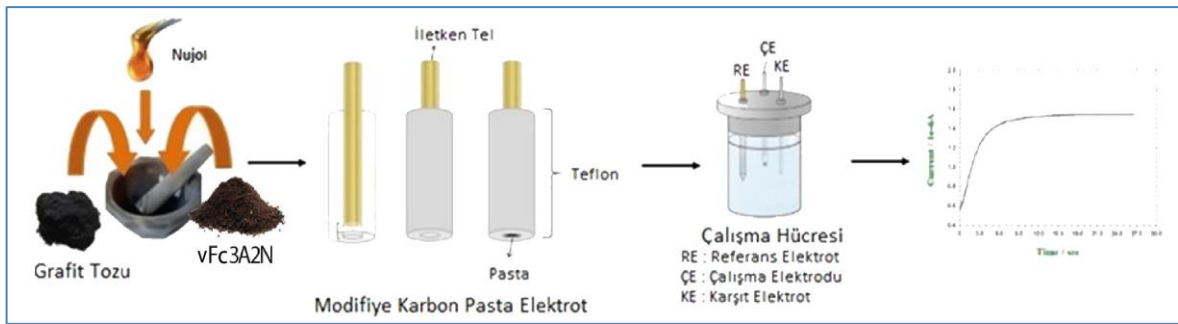
3.3.6. Saf su eldesi için cihaz

Bütün deneylerde kullanılan çözeltiler, GFL marka saf su cihazından sağlanan saf su ile hazırlanıp kullanıldı.

3.4. Tiramin Biyosensörünün Hazırlanması ve En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

3.4.1. Çalışma elektrodun hazırlanması: Karbon pasta elektrot (CPE), modifiye karbon pasta elektrot (MCPE) hazırlanması

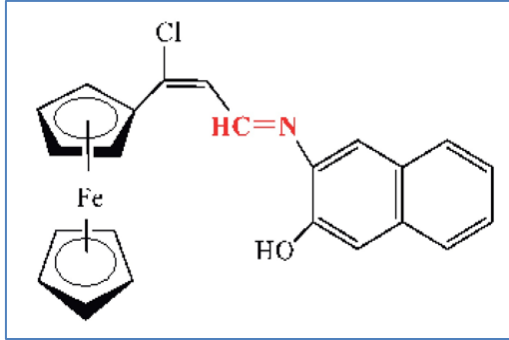
Çalışmaya başlamadan önce kullanılan elektrot saf su ile temizlendi. Hazırlanan tüm karbon pasta elektrotlar için içerisinde sabit miktarda grafit tozu (0.0650 g) olacak şekilde hassas terazi ile grafit tozu tartıldı. Grafit tozu karma işlemini gerçekleştirmek üzere saat camı üzerine alındı. Bir arada tutma özelliğine sahip mineral yağ (nujol), tüm yeni elektrotlar için sabit hacimde (30 μ L) olacak şekilde mikro pipet ile alındı ve saat camı üzerinde bulunan grafit tozu üzerine ilave edildi. Uygun hamur kıvamı elde edilene kadar karma işlemi yapıldı ve elektrot içerisine madde kayıpsız olacak şekilde dolduruldu. Doldurma işleminden sonra karbon pasta elektrot yüzeyi pürüzsüz olması amacıyla bir ped yardımı ile elektrot sekiz şekli çizerek temizlendi. Düz ve pürüzsüz hale getirilen elektrot tekrar saf su ile yıkanarak kullanıma hazır hale getirildi.



Şekil 3.1. MCPE hazırlanması ve çalışma hücresi şeması

Modifiye karbon pasta elektrot hazırlanırken yukarıdaki işlemlere ek olarak hazırlanan pastaya (grafit tozu+ nujol) modifiye edilecek katı madde uygun miktarda eklenip homojen bir şekilde karıştırılır ve elektroda doldurulur (Şekil 3.1).

Çalışmamızda modifikasyon işlemi için schiff bazı olan vFc3A2N kullanılmıştır (Şekil 3.2). vFc3A2N N-naftaliden-(1-kloro-2-formilvinil)ferrosen şeklinde adlandırılır. Bileşik, bu çalışma için ilk defa Araş. Gör. Selinsu DİKİM ve Prof. Dr. Nurşen SARI tarafından sentezlenmiştir.



Şekil 3.2. vFc3A2N bileşiği

3.4.2. Karbon pasta elektrodun sabit akıma getirilmesi

Elektrokimyasal hücreye 9 mL pH'ı 7,0 olan fosfat tamponu çözeltisi ve 1 mL 1 M NaCl destek elektrolit ilave edildi. Karşıt elektrot (Pt tel), referans elektrot (Ag/AgCl) ve çalışma elektrodu (CPE/MCPE) hücre içerisine yerleştirildi. Çalışılacak potansiyelde elektrot sabit akıma gelene kadar bekletildi ve sabit akım değeri denge akımı olarak kaydedildi. Çalışma elektrodu tüm deneylerde bu işlemle sabit akıma getirildi.

3.4.3. CPE ve MCPE'nin H₂O₂'e duyarlılığının belirlenmesi

Monoamin oksidaz ve tiramin tepkimesi sonucu H₂O₂ açığa çıkar. CPE VE MCPE'nin H₂O₂'ye duyarlılığının belirlenmesi tiramine duyarlılığını da gösterdiğinden bu çalışmada standart H₂O₂ ile çalışıldı. Bu amaçla elektrokimyasal hücreye pH'ı 7,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tampon çözeltisi, 1 M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi ilave edildi. Karbon pasta elektrot çalışılan potansiyelde sabit akıma getirilip denge akımı kaydedildi. Elektrokimyasal hücre içerisine H₂O₂' in derişimi $1,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-3}$ M aralığında olacak şekilde eklemeler yapıldı. Her eklemede manyetik karıştırıcı yardımı ile çözelti 1 dk karıştırıldı ve 200 s sonunda ölçülen akım değerleri kaydedildi. Kaydedilen denge akımları H₂O₂'nin akım değerini bulmak amacıyla denge akımından çıkarıldı. Akım fark değerleri (Δi) hesaplandı.

Artan H_2O_2 derişimlerine karşı artan akım farkları (Δi) grafiğe geçirildi. Bu işlem basamakları MCPE için de yapılarak elde edilen grafikler karşılaştırıldı.

3.4.4. Karıştırma süresinin belirlenmesi

Elektrokimyasal hücreye pH'ı 7,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tampon çözeltisi, 1 M 1mL NaCl destek elektrolit çözeltisi ilave edildi. +0,7 V'da elektrot sabit akıma getirildikten sonra hücreye belli miktar Monoamin oksidaz enzimi ilave edildi. Hücre içerisine enzim ilave edildiği için elektrotun belli bir süre dengeye gelmesi beklendi ve denge akımı kaydedildi. Elektrokimyasal hücre içerisindeki tiramin derişimi $1,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde substrat ilavesi yapıldı. Sırasıyla 10 dk, 20 dk, 30 dk ve 40 dk karıştırma sürelerinde cevap akımları ölçüldü. Artan tiramin derişimlerine karşı artan akım farkları (Δi) grafiğe geçirildi ve elde edilen Michaelis Menten grafikleri karşılaştırılarak uygun karıştırma süresi tespit edildi.

3.4.5. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi

Hazırlanan biyosensör için en uygun çalışma potansiyelini belirleyebilmek amacıyla 0,7 V – 0,3 V aralığında potansiyellerde çalışmalar yapıldı. Elektrokimyasal hücreye pH'ı 7,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tampon çözeltisi, 1 M 1mL NaCl destek elektrolit çözeltisi ilave edildi. MCPE çalışılan potansiyelde denge akımına geldikten sonra akım kaydedildi. Elektrokimyasal hücre içerisindeki H_2O_2 ' in derişimi $1,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-3}$ M aralığında olacak şekilde eklemeler yapıldı. Her ilavede manyetik karıştırıcı yardımıyla çözelti 1 dk karıştırıldı ve 200 s sonra ölçülen akım değerleri kaydedildi. Artan H_2O_2 derişimlerine karşı artan akım farkları (Δi) grafiğe geçirildi. Bu işlem basamakları 0,7 V – 0,3 V aralığında potansiyeller için tekrarlandı ve en uygun çalışma potansiyeli belirlendi.

3.4.6. MCPE'nin H_2O_2 duyarlılığına vFc3A2N miktarının etkisi

Bölüm 3.4.1'e göre hazırlanan MCPE içerisine sırasıyla 1,5 mg, 2,5 mg ve 3,5 mg olacak şekilde vFc3A2N ilave edildi ve çalışma elektrotları hazırlandı. Elektrokimyasal hücreye pH'ı 7,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tampon çözeltisi, 1 M 1mL NaCl destek elektrolit çözeltisi ilave edildi. MCPE önceden belirlenen +0,5 V çalışma potansiyelinde sabit akıma getirildi. Denge akımı kaydedildi. Elektrokimyasal hücreye artan derişimlerde ($1,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-3}$

M) H_2O_2 ilavesi yapıldı ve her eklemekten sonra 1 dakika karıştırıldı. 200 saniye sonra ölçülen akım değerleri kaydedildi. Artan H_2O_2 derişimlerine karşı artan akım farkları (Δi) grafiğe geçirildi. Bu işlem basamakları 1,5 mg, 2,5 mg ve 3,5 mg vFc3A2N için tekrarlandı ve grafikler karşılaştırılarak uygun miktar tespit edildi.

3.4.7. Enzimin MCPE'ye immobilizasyonu

Çapraz bağlanma yöntemi ile immobilizasyon

2,0 mg BSA (sığır serum albumin), 50,0 μ L tampon çözelti, 75 μ L MAO A, 30 μ L gluteraldehitten (% 2,5) oluşan bir karışım oluşturuldu. Bu karışım, Bölüm 3.4.1'e göre hazırlanan MCPE'un yüzeyine her yerine eşit dağılacak şekilde mikro pipet ile damlatıldı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Kuruyan elektrot saf su ile yıkandı ve kullanılmadığı zamanlarda tampon çözelti içerisinde $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de buzdolabında muhafaza edildi.

3.4.8. Biyosensörün tiramin duyarlılığına gluteraldehit miktarının etkisi

Enzim immobilizasyon işlemi sırasında çapraz bağlayıcı olarak görev alan gluteraldehit miktarının belirlenmesi amacıyla farklı gluteraldehit miktarlarında biyosensörler hazırlandı. MCPE $+0,5\text{ V}$ potansiyelde sabit akıma getirildikten sonra artan derişimlerde tiramin ilave edildi. Her ilaveden sonra çözelti 30 dakika karıştırıldı ve 200 s sonra akım ölçüldü. Hücreye eklenen tiramin derişimine karşı akım farkı (Δi) grafiği çizilerek sonuçlar karşılaştırıldı.

3.4.9. Enzim elektrodun en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi

Tiramin'in amperometrik cevabına pH'ın etkisi

Hazırlanan biyosensörün amperometrik cevap akımına pH'nın etkisini inceleme amacıyla pH'sı 6,0; 7,0; 8,0 fosfat tamponu (NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4); 9,0; 10,0; 11,0 glisin tamponu çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan tampon çözeltileriyle aynı pH değerlerinde olacak şekilde hücre içerisinde derişimi $5 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-7} - 5 \times 10^{-7}\text{ M}$ olan tiramin çözeltileri hazırlandı. Elektrot $+0,5\text{ V}$ potansiyelde sabit akıma getirilip denge akımı kaydedildi. Akım kaydedildikten sonra hücre içerisindeki derişim sırayla $5 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-7} - 5 \times 10^{-7}\text{ M}$ olacak şekilde eklemeler yapıldı. Her eklemede çözelti 30 dk karıştırıldı ve 200 s sonra ölçülen

akım değerleri kaydedildi. Bu işlem farklı pH değerlerindeki bütün tampon çözeltileri ile yapıldı. Artan tiramin derişimine karşı değışen Δi akım değerleri ile Michaelis Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerden yola çıkarak K_m ve I_{max} değerleri bulundu. I_{max}/K_m oranından yararlanarak uygun pH değeri belirlendi.

Tiramin'in duyarlılığına sıcaklığın etkisi

Elektrokimyasal hücreye pH'ı 10,0 olan 0,1 M 9 mL glisin tamponu ve 1 M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi ilave edildi. Elektrot +0,5 V potansiyel değeriinde sabit akıma getirildi ve denge akımı kaydedildi. Termostatlı dolaşımly su banyosu cihazı kullanılarak hücre içerisindeki çözeltinin sıcaklığı 20 °C' ye ayarlandı. Dengeye gelen sisteme hücre içerisindeki derişim $1,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde tiramin ilave edildi. Çözelti 30 dk karıştırıldı ve 200 s sonra ölçülen akım değeri kaydedildi. Bu işlem 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 °C sıcaklıklar için tekrarlandı. Hesaplanan akım farkı (Δi) değeri sıcaklığa karşı grafiğe geçirildi ve grafik kullanılarak biyosensör için uygun sıcaklık değeri bulundu.

Substrat derişiminin etkisi

Hazırlanan biyosensör, hücre içerisinde pH'sı 10,0 olan 0,1 M 9 mL glisin tamponu ve 1 M 1 mL NaCl bulunan çözeltiye daldırıldı. Elektrot +0,5 V sabit potansiyelde dengeye getirildikten sonra denge akımı kaydedildi. Daha sonra $1,0 \times 10^{-10}$ – $1,0 \times 10^{-6}$ M derişim aralığında tiramin ilaveleri yapıldı. Her eklemede çözelti 30 dk karıştırıldı ve 200 s sonra akım değeri okundu. Her bir tiramin derişimi için akım farkı (Δi) değeri hesaplanarak grafiğe geçirildi (Michaelis- Menten eğrisi). Elde edilen grafikten yararlanarak biyosensörün çalışma aralığı belirlendi. Ayrıca bu verilerden elde edilen Lineweaver- Burk grafiği çizilerek enzime özgü K_m ve I_{max} değeri belirlendi. Biyosensörün gözlenebilme sınırı (LOD; limit of detection) = $3 \times (\text{standart sapma} / \text{eğim})$ formülü ile, tayin sınırı (LOQ; limit of quantification) = $10 \times (\text{standart sapma} / \text{eğim})$ formülü ile hesaplandı.

Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi

Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla elektrot, +0,5 V potansiyelde dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Hücreye $1,0 \times 10^{-7}$ M derişimde tiramin çözeltisi ilave edildi. Her tiramin çözeltisi ilavesinde çözelti 30 dk karıştırıldı ve 200 s sonra akım

değeri kaydedildi. Her ölçüm için akım farkı (Δi) hesaplandı. Ölçüm sayısına karşın akım değerleri grafiği çizildi. Biyosensörün tekrar kullanım sonucu aktivite kaybı belirlendi.

Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi

Hazırlanan biyosensörün raf ömrünü belirlemek amacıyla elektrot pH'sı 10,0 olan 0,1 M 9 mL glisin tamponu ve 1 M 1 mL NaCl içeren çözeltide +0,5 V potansiyel değerinde sabit akıma getirildi. Farklı aralıklarla (1-3-5-10-15-20-30. gün) hücre içi derişim $1,0 \times 10^{-7}$ M olacak şekilde Tiramin çözeltisi ilave edilerek manyetik karıştırıcı yardımıyla 30 dk karıştırıldı ve 200 s sonunda akım değeri ölçüldü. Hesaplanan akım farkı (Δi) bekletme süresine karşı grafiğe geçirildi. Bu grafikten yararlanarak raf ömrü belirlendi.

3.4.10. Biyosensör üzerine girişim yapan türlerin etkisinin incelenmesi

Hazırlanan tiramin biyosensörünün amperometrik cevap akımına tirozin, triptofan, histidin, lizin, ornitin ve dopaminin girişim etkileri incelendi. Hücre, +0,5 V potansiyelde sabit akıma getirildikten sonra denge akımı kaydedildi. Hücre içi tiramin derişimi $1,0 \times 10^{-7}$ M olacak şekilde tiramin ilave edildi. Çözelti 30 dk karıştırıldı ve cevap akımı kaydedildi. Daha sonra girişim etkisi incelenecek madde, hücre içi derişimi $1,0 \times 10^{-7}$ M olacak şekilde eklendi. 30 dk karıştırıldı ve cevap akımı okundu. Gözlenen cevap akımı, hücre içerisindeki tiramin ve girişimi incelenen türün toplam cevap akımıdır. Çalışılan maddeye karşılık gelen cevap akımı, toplam cevap akımından tiramine karşılık gelen cevap akımının çıkartılması ile elde edildi. Hesaplanan cevap akımlarından yola çıkarak girişimi incelenen maddenin yüzde olarak yaptığı girişim hesaplandı.

3.4.11. Peynirde tiramin tayini

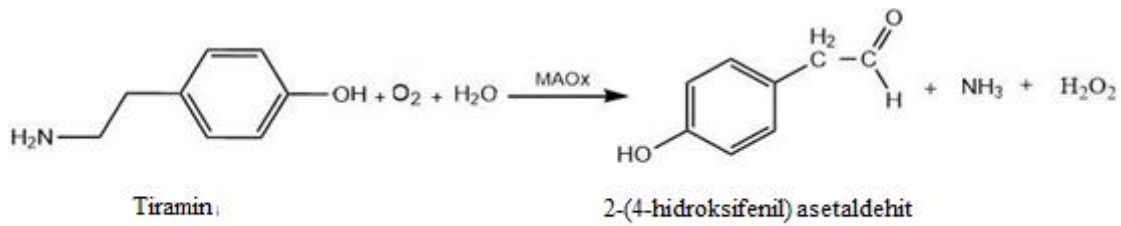
Peynir numunesinde tiramin tayini için 1,3 mg parmesan peyniri tartıldı ve homojenize edildi. Homojenizat bir tüpe alınarak üzerine 0,1 M 20 mL pH'ı 7,0 olan fosfat tamponu ilave edildi. Hazırlanan karışım 2 saat manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında karıştırıldı ve daha sonra 5 dakika vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı. Santrifüj cihazı ile 4000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenen çözelti pipet yardımıyla balon jojeye alındı ve gerekli seyreltme işlemleri yapıldı. Seyreltme işlemi peynir içerisindeki tiramin derişimini biyosensörün

Çalışma aralığına getirmek ve girişim yapan türlerin derişimini tayin sınırının altında bir değere getirmek amacıyla yapıldı.

Gerçek numune analizi için elektrokimyasal hücreye pH'sı 10,0 olan 0,1 M 9 mL glisin tamponu ve 1 M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi eklendi. Elektrot 0,5 V potansiyelde sabit akıma getirildi ve denge akımı kaydedildi. Daha sonra hücreye 10^9 kat seyreltme yapılarak elde edilen peynir numunesi ilave edildi. Çözelti 30 dk karıştırıldı ve 200 s sonra akım ölüld. Çalışma 3 kere tekrar edildi. Kaydedilen akım değeri denge akımından çıkartılarak akım farkı (Δi) hesaplandı. Kalibrasyon grafiğinden yararlanarak tiramin miktarı hesaplandı.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında tiramin tayinine yönelik yeni bir modifiye karbon pasta elektrot sistemi ile amperometrik bir biyosensör tasarlandı. Karbon pasta elektrot schiff bazı olan vFc3A2N ile modifiye edildi. Hazırlanan elektrot yüzeyine MAOx enzimi, gluteraldehit ile çarpaz bağlanma yöntemi kullanılarak immobilize edildi. Tiramin tayini, enzimatik tepkime sonucu açığa çıkan H_2O_2 'nin +0,5 V potansiyelde yükseltgenme akımlarının ölçülmesinden yararlanarak yapılmıştır.

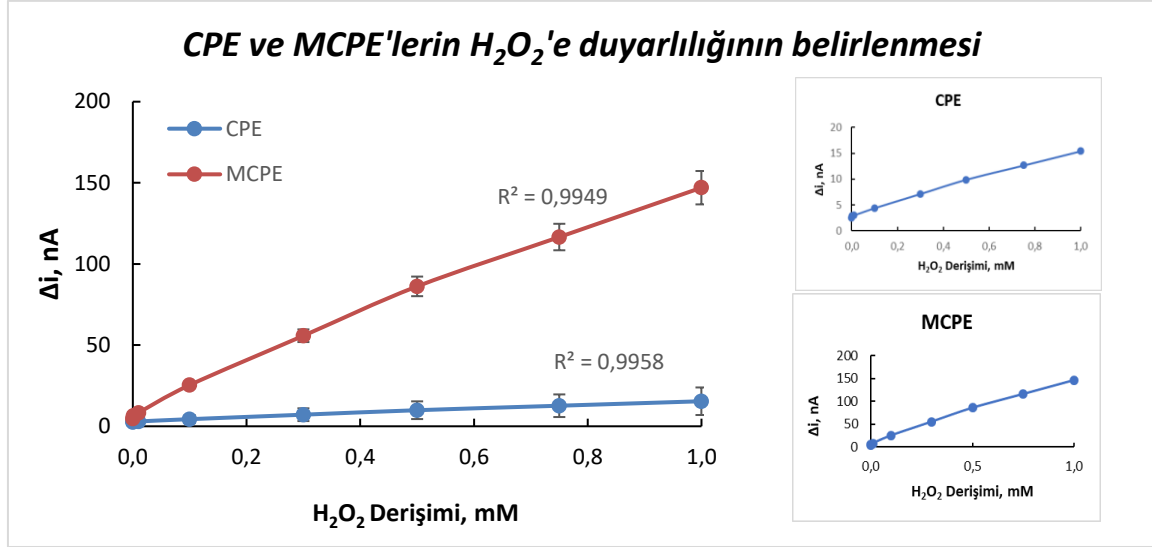


Şekil 4.1. Tiramin tayini için tepkime şeması

Hazırlanan enzim elektrot için en iyi çalışma koşullarını belirlemek amacıyla pH, sıcaklık, substrat derişiminin etkisi, tekrarlanabilirlik, raf ömrü ve girişim etkisi incelendi ve hazırlanan yeni tiramin biyosensörü ile peynir numunesinde tiramin tayini gerçekleştirildi.

4.1. CPE ve MCPE'nin H_2O_2 'e duyarlılığının belirlenmesi

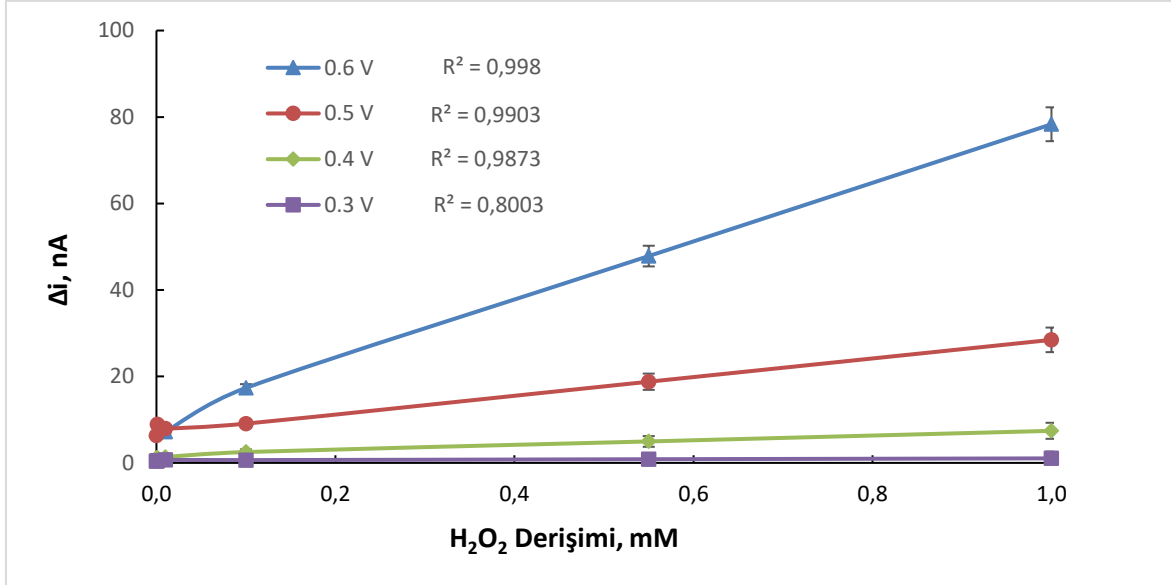
Karbon pasta elektrodun ve modifiye karbon pasta elektrodun duyarlılıklarının belirlenmesi tiramin'in hücrede monoamin oksidaz enzimi ile reaksiyonu sonucu açığa çıkan H_2O_2 'in oluşturduğu anodik akımların ölçülmesi sayesinde gerçekleştirildi. CPE ve MCPE +0,7 V'da sabit akıma getirildikten sonra denge akımı kaydedildi. Elektrokimyasal hücre içerisindeki H_2O_2 derişimi $1,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-3}$ M aralığında olacak şekilde ilaveler yapılarak H_2O_2 derişimine karşılılık elde edilen cevap akımları kaydedildi. Artan H_2O_2 derişimlerine karşı artan akım farkları (Δi) grafiğe geçirildi (Şekil 4.2). Grafikler incelendiğinde H_2O_2 'nin anodik akımlarının MCPE'da CPE'a göre yaklaşık 10 kat daha büyük olduğu görülmektedir. Ferrosen ve ferrosenil bileşikler enerji ve elektron transferi gerçekleştirebildikleri bu sebeple modifiye madde yapısında bulunan ferrosenin elektron aktarımını kolaylaştırarak akımı artırdığı görülmektedir (Uçar, Fındık, Bingöl, Güler, & Özcan, 2015).



Şekil 4.2. CPE ve MCPE'nin H_2O_2 duyarlılığının belirlenmesi

4.2. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi

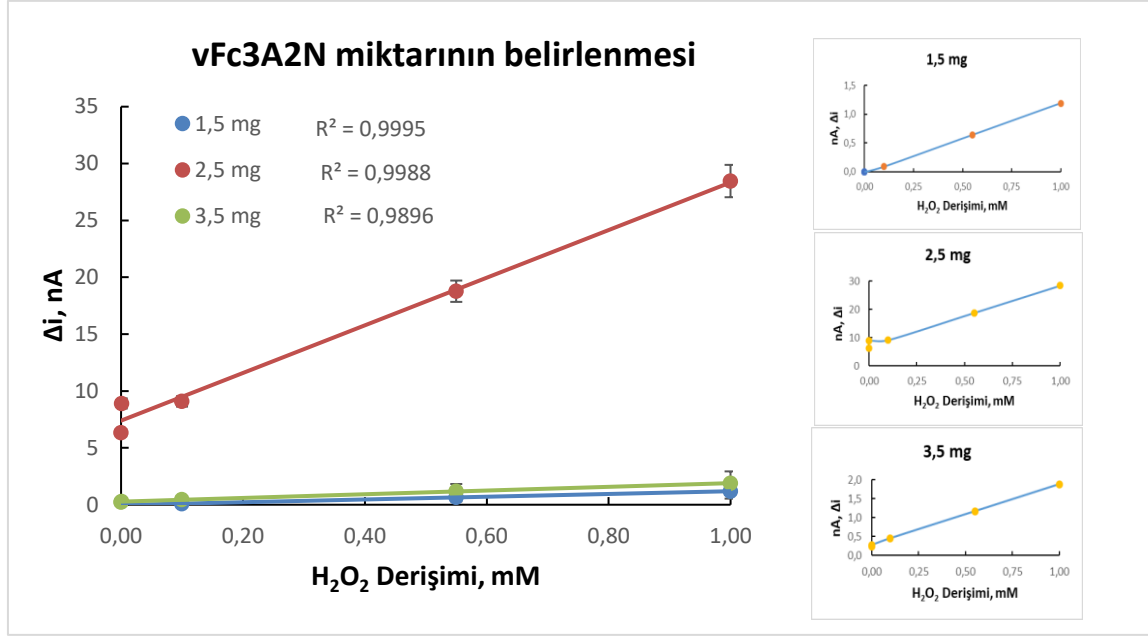
Hazırlanan biyosensörün tiramin tayini için uygun potansiyel değerini belirlemek amacıyla farklı potansiyelerde çalışmalar yapıldı. Artan H_2O_2 derişimlerine karşı akım değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.3). Grafikler incelendiğinde yüksek potansiyelerde akım değerlerinin daha yüksek olduğu görüldü. Yüksek potansiyelerde girişim etkisi incelenen maddelerin girişim etkisinin oldukça büyük olduğu bilinmektedir (Bodur, Alzheimer Hastalığının Teşhisi İçin Asetilkolin Biyosensörünün Hazırlanması, 2019). Bu nedenle yüksek cevap akımının görüldüğü, girişim etkisinin düşük olacağı, doğrusallığın iyi, R^2 değerinin yüksek olan +0,5 V'un çalışma potansiyeli olmasına karar verildi.



Şekil 4.3. MCPE'un H₂O₂'e duyarlılığı üzerine çalışma potansiyelinin etkisi

4.3. MCPE'nin H₂O₂ duyarlılığına vFc3A2N miktarının etkisi

Modifiye karbon pasta elektrot içerisindeki vFc3A2N miktarının H₂O₂'e duyarlılığını belirlemek amacıyla karıştırdığımız pasta içerisine 1,5 mg, 2,5 mg ve 3,5 mg vFc3A2N olacak şekilde madde ilave edildi. Hazırlanan çalışma elektrodu sabit akıma getirildikten sonra hücre içerisine artan derişimlerde H₂O₂ ilave edildi. H₂O₂ derişimine karşı akım farkı (Δi) grafiğe geçirildi (Şekil 4.4) ve uygun olan vFc3A2N miktarına karar verildi. Hazırlanan üç elektrot karşılaştırıldığında doğrusallığı iyi, cevap akımının en yüksek olduğu elektrot 2,5 mg vFc3A2N ile hazırlanan elektrot olduğu görüldü. Pasta içerisindeki madde miktarı elektrotun mekanik kararlılığını etkilediği bilinmektedir. Bu sebepten uygun modifiye madde miktarının belirlenmesi önemlidir. Madde miktarı arttıkça akımın artması beklenen durumdur ancak 3,5 mg ile hazırlanan elektrot içerisinde madde miktarı, elektrotun mekanik kararlılığını bozduğu ve akımı düşürdüğü gözlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda hazırlanan MCPE içerisine 2,5 mg vFc3A2N ilave edildi.



Şekil 4.4. MCPE’ta kullanılan vFc3A2N miktarının H₂O₂ cevabına etkisi

4.4. Karıştırma süresinin belirlenmesi

Hazırlanan elektrot sabit akıma getirildikten sonra hücre içerisine enzim ilave edildi. Tekrar elektrotun belli bir süre dengeye gelmesi beklendi ve denge akımı kaydedildi. Hücre içerisine artan derişimlerde tiramin çözeltisi ilave edildi ve sırasıyla 10 dk, 20 dk, 30 dk ve 40 dk karıştırma sürelerinde cevap akımları kaydedildi. Akım farkına karşı tiramin derişimi grafiğe geçirildi ve sonuçlar karşılaştırıldı. Elde edilen Michaelis-Menten grafikleri incelendiğinde 30 dk karıştırma süresinin tepkimenin tamamlanması için gerekli olan karıştırma süresi olduğuna karar verildi. Bundan sonraki tüm çalışmalarda karıştırma işlemi 30 dk olarak uygulandı.

4.5. Biyosensörün tiramin duyarlılığına glutaraldehit miktarının etkisi

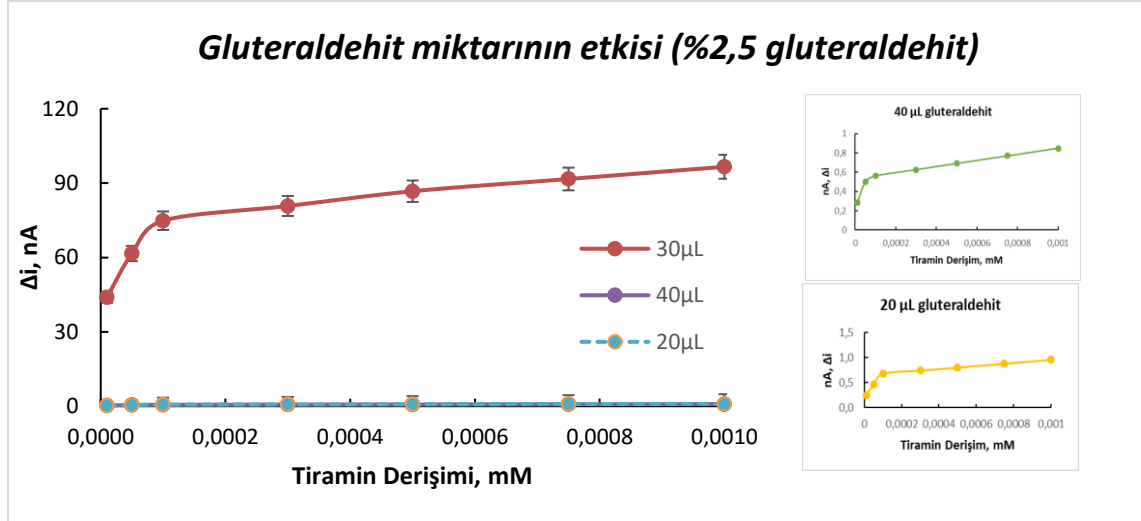
Biyosensör çalışmalarına bağlı olarak, enzim immobilizasyonu için kullanılan yöntemler çeşitlilik gösterebilir. Her bir yöntemin kendine özgü avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır (Andreescu ve Marty, 2006).

Çapraz bağlama yöntemi, uygulama kolaylığı nedeniyle sık tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntemde, enzim molekülleri çapraz bağlayıcı reaktifler aracılığıyla sabitlenir. Glutaraldehit

(CHO-CH₂CH₂CH₂-CHO), enzim immobilizasyonunda yaygın olarak tercih edilen çapraz bağlama reaktiflerinden biridir. Bu reaktif, enzim moleküllerinde bulunan amin gruplarıyla etkileşime girerek bağlanma sağlar. Ancak, glutaraldehit sadece enzim yüzeyindeki amin gruplarıyla etkileşime girmekle kalmaz, aynı zamanda küçük bir molekül olduğu için enzimin iç kısımlarına kadar difüzyon yaparak iç amin gruplarıyla da etkileşime geçebilir (Çil, 2014) (Bodur, 2019).

Enzimin aktif bölgesine etki eden çapraz bağlanmanın azaltılması için çeşitli optimizasyon stratejileri kullanılabilir. Bunlar arasında çapraz bağlayıcı reaktifin derişiminin ayarlanması, bağlama süresinin optimize edilmesi ve uygun bağlama koşullarının sağlanması yer alır. Bu şekilde, enzim aktivitesinin azalmadan immobilizasyonun gerçekleştirilmesi mümkün olabilir (Çil, 2014). Bu nedenle, glutaraldehit ile çapraz bağlanma yöntemi kullanıldığında glutaraldehitin enzim aktivitesine etkisinin araştırılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, enzim immobilizasyonu için kullanılan glutaraldehit miktarını belirlemek amacıyla 20 µL, 30 µL ve 40 µL (%2,5'luk) glutaraldehit içeren elektrotlar hazırlandı. Elektrotlar +0,5 V potansiyelde sabit akıma getirildi ve denge akımı kaydedildi. Hücre içi derişim $1,0 \times 10^{-8}$ M- $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde tiramin çözeltileri ilave edildi. Akım farkına karşılık gelen tiramin derişimi grafiğe geçirildi (Şekil 4.5). Grafik incelendiğinde glutaraldehit miktarı 20 µL 'den 30 µL'ye çıkartıldığında akımın arttığı ancak 40 µL'de akımın azaldığı görülmektedir. Bunun nedeni az miktarda glutaraldehitin enzim immobilizasyonunu gerçekleştirmek için yapıyı bir arada tutamaması ve fazla miktarda glutaraldehitin enzim aktif bölgesine aşırı bağlanması sonucu enzim aktivitesinin düşürmesidir. Bundan sonraki çalışmalarda monoamin oksidaz enzimi 30 µL glutaraldehit ile immobilize edildi.



Şekil 4.5. Tiramin duyarlılığına gluteraldehit miktarının etkisi

4.6. Optimum pH

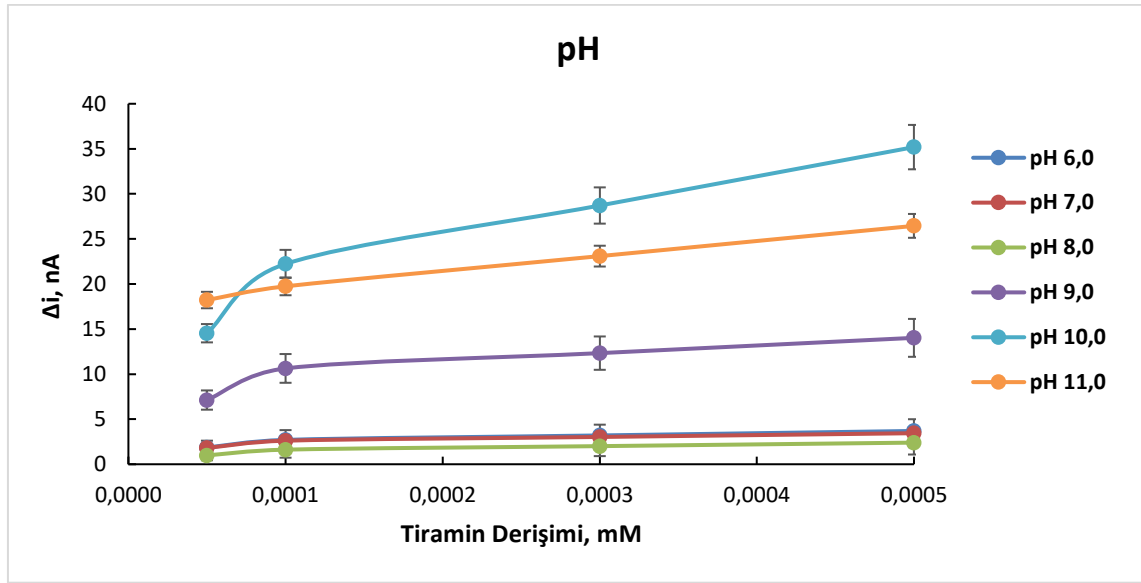
Enzimler protein yapılı olduklarından çok düşük ve çok yüksek pH'larda denatürasyona uğrayarak düşük aktivite gösterirler veya inaktif olurlar. Her enzim için aktivitesinin maksimum olduğu özel bir pH vardır. Bu pH'ya optimum pH denir. Optimum pH, tampon çözeltinin cinsi, substratın özelliği ve enzim kaynağı gibi çeşitli şartlara bağlıdır (Atasağungil, 1965). Hazırlanan tiramin biyosensörü için optimum pH'ı tespit etmek amacıyla farklı pH değer ve türleri için hücre içi tiramin derişimi $5,0 \times 10^{-8}$ M- $5,0 \times 10^{-7}$ M olacak şekilde tiramin çözeltileri ilave edildi. Elde edilen akım farkına karşılık gelen tiramin derişimi grafiğe geçirildi (Şekil 4.6). Elde edilen Michaelis- Menten grafiklerinden yola çıkarak Lineweaver-Burk eğrileri elde edildi. Aktivite hakkında bilgi verdiği için I_{max}/K_m hesaplanarak optimum pH belirlendi (Bodur, Keskin, Avan, & Arslan, 2023). Bundan sonraki deney aşamalarında pH 10,0 glisin tamponu kullanıldı.

Kullanılan tampon çözeltiler;

- pH 6,0 Fosfat Tamponu (Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4)
- pH 7,0 Fosfat Tamponu (Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4)
- pH 8,0 Fosfat Tamponu (Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4)
- pH 9,0 Glisin/ Sodyum Hidroksit Tamponu
- pH 10,0 Glisin/ Sodyum Hidroksit Tamponu

- pH 11,0 Glisin/ Sodyum Hidroksit Tamponu

Literatür çalışmaları incelendiğinde hazırlanan tiramin biyosensörleri için farklı pH değerlerinde çalışıldığı görülmektedir. Örneğin; pH 9,5 (Dalkıran ve diğerleri, 2020), 9,0 (Erden ve diğerleri, 2019), 8,0 (Boka ve diğerleri, 2011). Enzimin farklı şekillerde immobilize edilmesi veya immobilizasyon için farklı bir madde kullanılması, pH değerlerinin değişiklik göstermesine yol açabilir.



Şekil 4.6. Tiramin duyarlılığına pH'nın etkisi

4.7. Optimum sıcaklık

Sıcaklığın, enzim aktivitesi üzerinde belirgin bir etkisi olduğundan dolayı, sıcaklık seçimi son derece kritik bir faktördür. Enzimle yapılan çalışmalar, aktivite kaybına neden olmayan sabit bir sıcaklıkta gerçekleştirilir. Sıcaklık, enzim aktivitesini belirli bir noktaya kadar artırırken, yüksek sıcaklıklarda enzim denatüre olur ve aktivitesini yitirir (Akbıyık, 2022).

Biyosensörün tiramin duyarlılığı üzerine sıcaklığın etkisi incelendi. Hazırlanan biyosensör farklı sıcaklıklarda (20 °C - 30 °C - 40 °C - 50 °C - 60 °C - 70°C - 80°C- 90°C) hücre içi tiramin derişimi $1,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde tiramin ilave edildi. Artan akım farkına karşılık gelen sıcaklık değeri grafiğe geçirildi (Şekil 4.9). Grafik incelendiğinde, 80 °C'a kadar akımın arttığı ve optimum sıcaklık olduğu görülmektedir. Sıcaklık 90 °C'a geldiğinde

enzimin denatüre olduğu söylenebilir. 80 °C özel bir koşuldur, biyosensörler için çalışma koşulları pratik olmalıdır. Bu nedenle tüm diğer biyosensör çalışmalarında olduğu gibi biz de çalışmalarımıza oda sıcaklığında devam ettik.

Literatür çalışmaları incelendiğinde farklı maddelerle hazırlanan tiramin biyosensörleri için farklı optimum sıcaklık değerleri görülmektedir. Örneğin; 35 °C (Batra ve diğerleri, 2012). Enzimin farklı şekillerde immobilize edilmesi veya immobilizasyon için farklı bir madde kullanılması, sıcaklık değerlerinin değişiklik göstermesine yol açabilir.



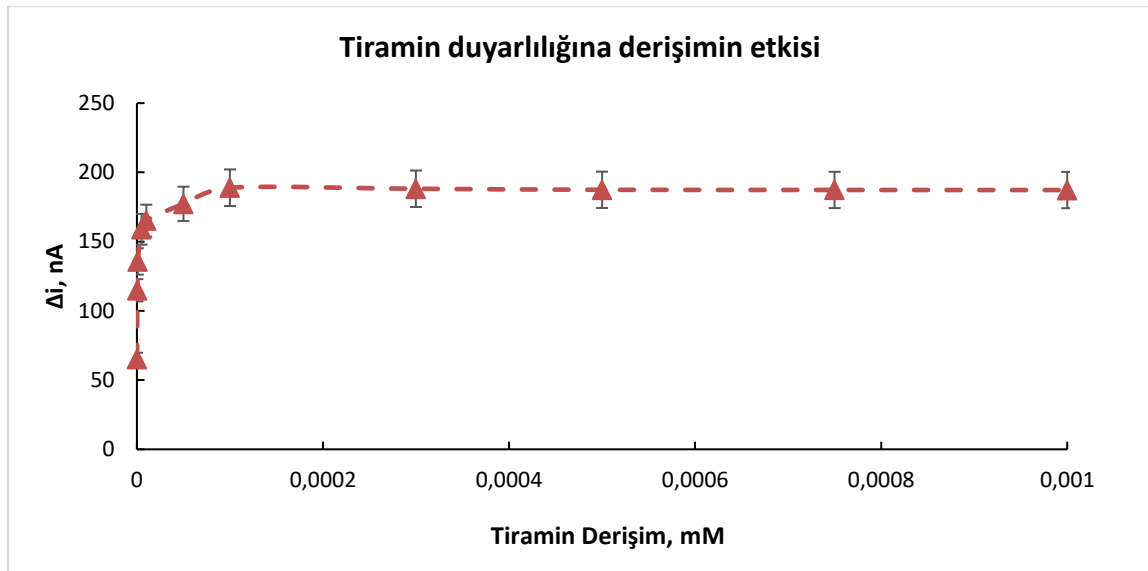
Şekil 4.7. Tiramin duyarlılığına sıcaklığın etkisi

4.8. Substrat derişiminin etkisi

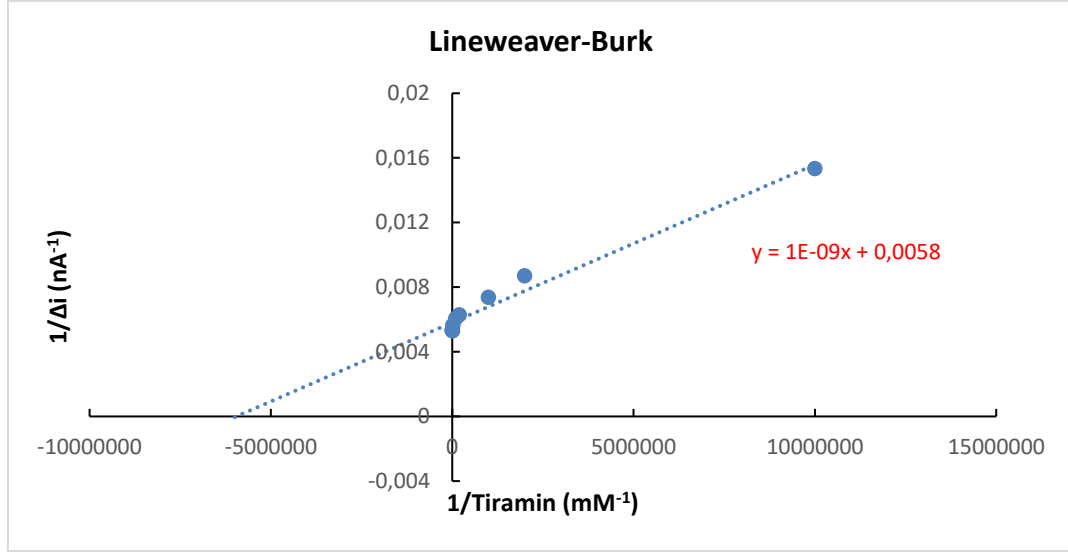
Hazırlanan biyosensörün tiramin duyarlılığına derişim etkisi incelendi. Biyosensör +0,5 V'ta, pH 10,0 glisin tampon çözeltisinde dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Hücre içerisindeki derişim $1,0 \times 10^{-10}$ – $2,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde tiramin çözeltileri ilave edildi ve akım değerleri kaydedildi. Artan tiramin derişimine karşılık gelen akım farkları grafiğe geçirildi (Şekil 4.10). Grafikten $1,0 \times 10^{-8}$ – $1,0 \times 10^{-7}$ M ($R^2 = 0,9942$) aralığında çalışma aralığı elde edildi (Şekil 4.12). Biyosensörün cevap süresi 200 s olarak belirlendi. Yapılan hesaplamalar sonucu LOD = $6,10 \times 10^{-9}$ M ve LOQ = $2,03 \times 10^{-8}$ M olarak belirlendi.

Literatür çalışmaları incelendiğinde doğrusal çalışma aralığı ve alt tayin sınırı sırasıyla; $3,0 \times 10^{-7}$ - $7,6 \times 10^{-5}$ M, $2,1 \times 10^{-7}$ M (Dalkıran ve diğerleri, 2020), $9,9 \times 10^{-7}$ - $1,1 \times 10^{-4}$ M, $6,1 \times 10^{-7}$ M (Erden , Erdoğan, Öztürk, Koçoğlu, & Kılıç, 2019) şeklinde hesaplanan tiramin biyosensör çalışmaları yapılmıştır. Literatür ile kıyasladığında yeni geliştirilen tiramin biyosensörünün doğrusal aralığının düşük, tayin sınırının ise oldukça düşük olduğu görülmektedir.

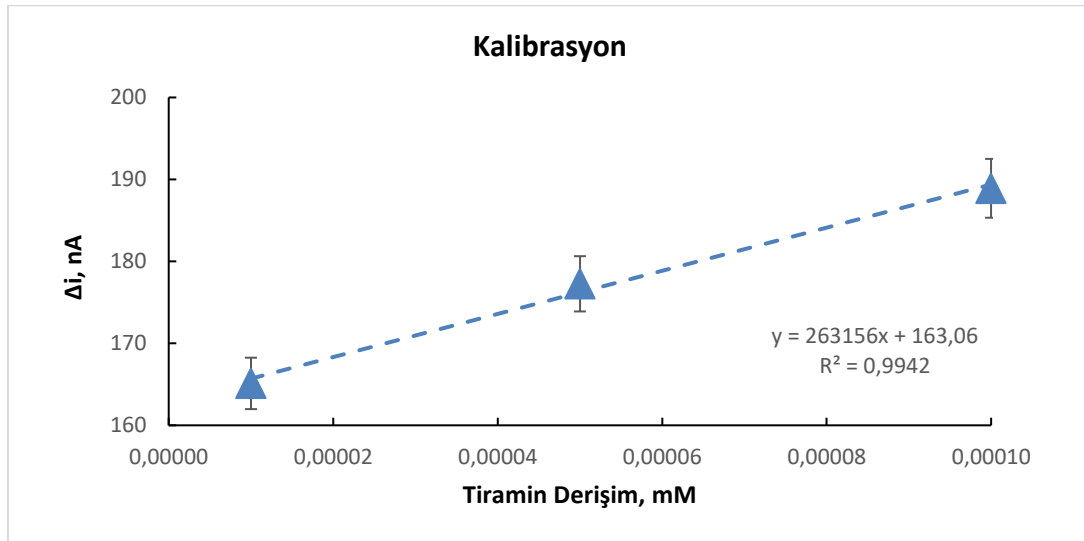
$K_m(\text{göz})$ ve $I_{\text{max}}(\text{göz})$ değerlerini bulmak amacıyla $1/[\text{Tiramin}] - 1/\Delta i$ grafiği (Lineweaver-Burke eğrisi Şekil 4.11) çizildi. $K_m(\text{göz})$; $1,72 \times 10^{-4}$ μM , $I_{\text{max}}(\text{göz})$; 0,1724 μA olarak hesaplandı.



Şekil 4.8. Biyosensörün amperometrik cevap akımına tiramin derişiminin etkisi



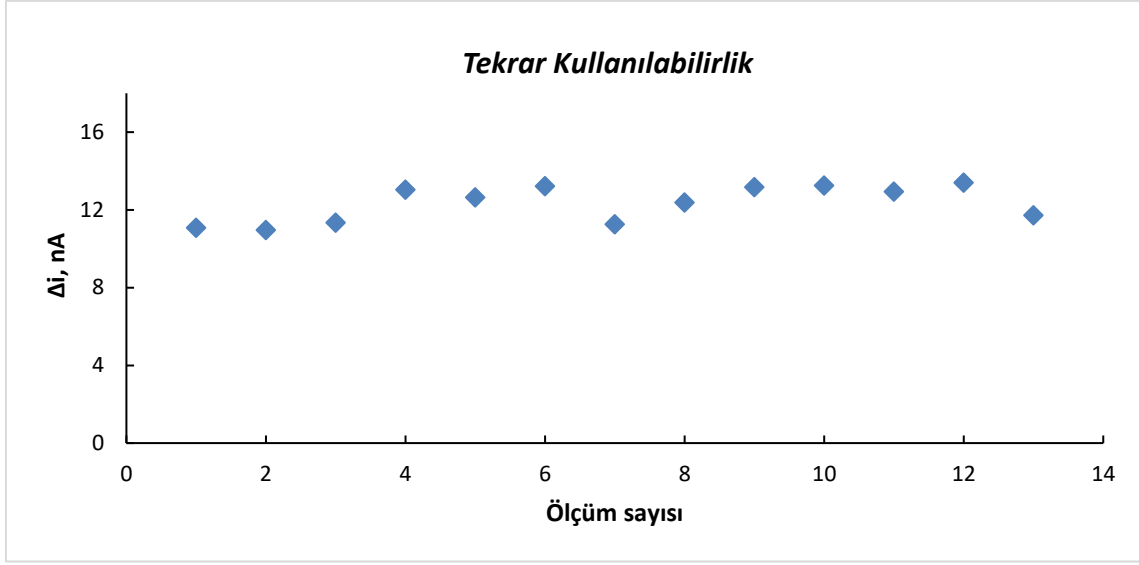
Şekil 4.9. Biyosensörün amperometrik cevap akımına tiramin derişiminin etkisi, Lineweaver- Burk grafiğı



Şekil 4.10. Tiramin biyosensörü için kalibrasyon grafiğı

4.9. Tekrarlanabilirlik

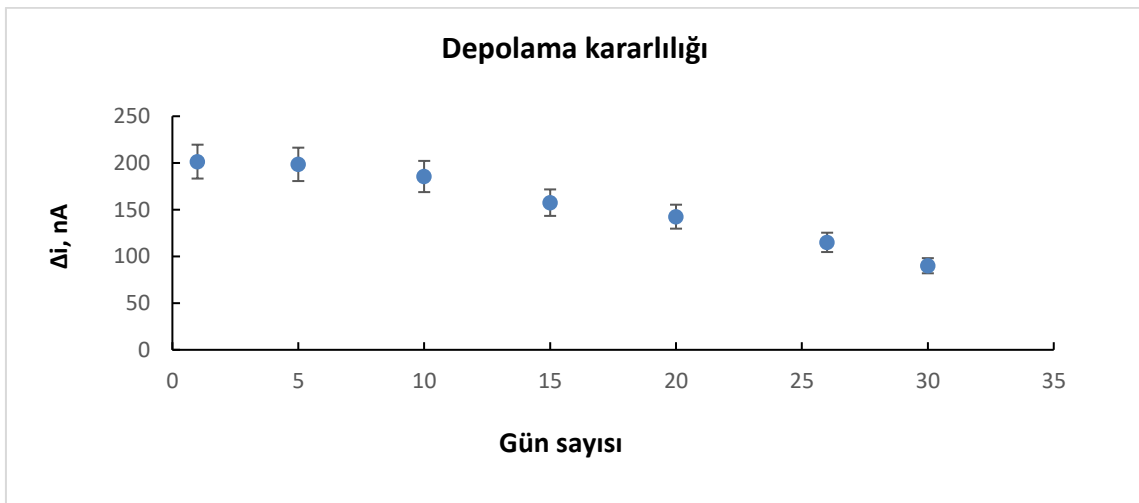
Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla sabit $1,0 \times 10^{-7}$ M tiramin derişiminde peş peşe yapılan ölçümler sonucunda elde edilen akım değerleri ölçüm sayısına karşı grafiğı geçirildi (Şekil 4.11). Grafik incelendiğinde 13 ölçüm sonunda biyosensör performansının %5,5'ini kaybettiğı görüldü. Biyosensör için bağıl standart sapma $1,0 \times 10^{-7}$ M tiramin derişimi için %7,5 olarak hesaplandı. Yeni tiramin biyosensörünün tekrarlanabilirliğinin başarılı olduğı söylenebilir.



Şekil 4.11. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi

4.10. Raf ömrünün belirlenmesi

Tiramin biyosensörünün depolama kararlılığı incelendi. Buzdolabında +4 °C’ da tampon çözelti içerisinde bekletilen tiramin biyosensörü 30 gün boyunca farklı aralıklarla (1- 5- 10- 15- 20- 26- 30. gün) akımı ölçüldü. Depolama süresine karşı akım farkı grafiği çizildi (Şekil 4.12). Grafik incelendiğinde 30 günlük depolama sonunda tiramin biyosensörü başlangıç amperometrik cevabının %44,7’sini koruduğu görülmektedir.



Şekil 4.12. Biyosensörün raf ömrünün incelenmesi

4.11. Biyosensör cevabına girişim yapan türlerin etkisinin incelenmesi

Tayin yapılırken, hedeflenen maddeyle birlikte potansiyel olarak girişim etkisine neden olabilecek diğer maddelerin de bulunduğu numuneler kullanılır. Girişim içeren numunelerin analiz edilmesi sırasında, girişim etkilerini azaltmak ve daha doğru ölçümler elde etmek için önlemler alınmalıdır. Bu amaçla, numunenin seyreltilmesi girişim etkisini azaltabilir ve tanı için daha doğru ölçümler sağlayabilir (Park, 2019; Akbıyık, 2022). Bu nedenle peynir numunesinde bulunabilecek ve girişim etkisi gösterebilecek bazı aminoasitlerin tiramin tayini üzerine etkisi incelendi.

Hazırlanan biyosensör +0,5 V potansiyelde, pH 10,0 glisin tamponu içerisinde sabit akıma getirildi ve akım değeri kaydedildi. Hücre içerisine $1,0 \times 10^{-7}$ M tiramin çözeltisi ilave edildi. 30 dk manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı ve akım değeri kaydedildi. Daha sonra hücre içerisinde girişim etkisi incelenen madde derişimi 10 000 kat seyreltme olacak şekilde ilave edildi ve tekrar 30 dk manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı ve akım değeri kaydedildi. Aynı işlem basamakları girişim etkisi incelenen diğer maddeler için tekrarlandı. Elde edilen akım farklarından yararlanarak maddelerin girişim etkileri hesaplandı. Girişim yapan madde, hücre içi derişim, % girişim Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Tiramin tayinine girişim yapan türler ve girişim etkileri

Girişim yapan madde	Hücre içi Derişim (M)	% Girişim
Tirozin	$5,0 \times 10^{-10}$	11,7
Triptofan	$1,0 \times 10^{-10}$	16,4
Histidin	$1,0 \times 10^{-10}$	17,7
Ornitin	$1,0 \times 10^{-10}$	17,9
Lizin	$5,0 \times 10^{-11}$	15,5
Dopamin	$1,0 \times 10^{-8}$	28,2

4.12. Peynirde tiraminin tayin edilmesi

Biyosensörün gerçek numunelerde uygulanabilirliğini belirlemek amacıyla Bölüm 3.4.12’de belirtildiği şekilde hazırlanan peynir numunesinde tiramin ölçümü gerçekleştirildi. Biyosensör +0,5 V potansiyelde sabit akıma getirildikten sonra hücreye 10^9 kat seyreltme işlemi yapılarak elde edilen peynir numunesi eklendi. Hücre, 30 dk manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı ve akım ölçüldü. Tiramin miktarı kalibrasyon grafiğinden (Şekil 4.12)

faýdalanýlarak $117,40 \pm 11,41$ mg/kg olarak hesaplandı. Literatürde tiramin miktarı parmesan peyniri içerisinde HPLC yöntemi kullanılarak 103 mg/kg olarak belirtilmiştir (Custodio, Tavares, Beatriz ve Gloria, 2007).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında tiramin tayini için monoamin oksidaz temelli amperometrik bir biyosensör hazırlandı. Hazırlanan tiramin biyosensörü için elde edilen sonuçlar;

Biyosensörün hazırlanmasında kullanılan modifiye edici madde (vFc3A2N) biyosensörün tiramine duyarlılığını arttırdı.

Çalışma potansiyeli +0,5 V olarak belirlendi.

En ideal pH 10,0 olarak tespit edildi. En ideal sıcaklık 80 °C olarak tespit edildi, ancak oda sıcaklığında (25 °C) çalışıldı. En uygun cevap süresi 200 s olarak belirlendi.

Doğrusal çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-8} - 1,0 \times 10^{-7}$ M, ($R^2 = 0,9942$) olarak bulundu. Bu sonuç biyosensörün düşük bir aralıkta ve düşük derişimlerde Tiramin tayinine olanak sağladığını gösterir.

Tayin sınırı $6,10 \times 10^{-9}$ M olarak hesaplandı. Literatür çalışmaları ile karşılaştırıldığında oldukça küçük bir değerdir. Bu sonuç biyosensörün çok düşük tiramin derişimlerine karşı hassas olduğunu gösterir.

Biyosensörün $K_{m(göz)}$ değeri $1,72 \times 10^{-4}$ μ M, $I_{max(göz)}$ değeri ise 0,1724 μ A olarak hesaplandı. K_m değerinin literatürdeki K_m değerleri ile karşılaştırıldığında oldukça düşük olduğu görüldü. K_m değerinin düşük olması MCPE'deki vFc3A2N maddesi monoamin oksidazın tiramine ilgisini arttırdığı sonucunu gösterir.

Tekrarlanabilirlik incelendiğinde biyosensörün 13 ölçüm sonunda başlangıç aktivitesinin %5,5'ini kaybettiği görüldü. Bağlı standart sapma %7,5 olarak hesaplandı. Elde edilen bu sonuç biyosensörün tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğunu gösterir.

Raf ömrü incelendiğinde biyosensörün 30 günün sonunda başlangıç aktivitesini %44,7 oranında koruduğu görüldü.

Tiramin tayinine diğerk maddelerin yaptığı girişim etkisi tamamen yok edilemese de seyreltme ile yüksek oranda azaltılmıştır. Girişim yapan maddeler ve % girişim oranları; tirozin (%11,7), triptofan (%16,4), histidin (%17,7), lizin (%15,5), ornitin (%17,9), dopamin (%28,2) olarak hesaplandı.

Sonuç olarak tiramin tayini için hazırlanan biyosensör, uygun cevap süresine, düşük bir çalışma aralığına, düşük alt tayin sınırına, iyi bir tekrarlanabilirliğe, kabul edilebilir bir raf ömrüne sahiptir. Ayrıca biyosensörün hazırlanması pratik ve ucuzdur.

Çizelge 5.1. Çalışma sonuçlarının literatür ile karşılaştırılması

Taşıyıcı	Tiramin tayini metodu	Doğrusal aralık	Gözlenebilme sınırı	K_m	Opt. pH	Opt. sıcaklık	Raf ömrü	Referans
Platin nanopartikül (PtNP)	Amperometrik +0,5 V	$3,9 \times 10^{-7} - 7,6 \times 10^{-5} M$	$2,1 \times 10^{-7}$		9,5	-	-	(Dalkıran, Kaçar, Can, Erden, & Kılıç, 2020)
Polivinil ferrosen (PVF)	Amperometrik +0,5 V	$9,9 \times 10^{-7} - 1,1 \times 10^{-4}$	$6,1 \times 10^{-7}$		9,0	-	1 ay sonunda aktivite %67,5 kalmıştır	(Erden , Erdoğan, Öztürk, Koçoğlu, & Kılıç, 2019)
Peroksidaz ve Os mediatör (PVI7-dme-Os)	Amperometrik -50 mV		0,4 μM		8,0	-	-	(Boka, Adanyı, Virag, Sebela, & Kiss, 2011)
Au elektrot modifiye AgNPs/ L-Cys	Amperometrik +0,25 V	0,017- 0,25 mM	0,01 mM	0,16 mM	8,5	35 °C	2 ay sonunda aktivite % 65 kalmıştır	(Lata, Yadav, Bhardwaj, & Pundir, 2011)
vFc3A2N ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrot	Amperometrik +0,5 V	$1,0 \times 10^{-8} - 1,0 \times 10^{-7} M$	$6,10 \times 10^{-9} M$	$1,72 \times 10^{-4} \mu M$	10,0	80 °C	30 gün sonunda aktivite % 44,7 kalmıştır	Bu çalışma

KAYNAKLAR

- Akan, S. ve Demirağ, M. K. (2018). Gıdalarda bulunan biyojen aminlerin önemi ve detoksifikasyon mekanizmaları. *Food and Health*, 4(3), 166-175.
- Akbıyık, M. A. (2022). *Tirozinaz temelli dopamin biyosensörünün hazırlanması*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 35-42.
- Andreescu, S. and Marty, J.-L. (2006). Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications. *Biomolecular Engineering*, 2, 1-15.
- Apetrei, I. M. and Apetrei, C. (2013). Amperometric biosensor based on polypyrrole and tyrosinase for the detection of tyramine in food samples . *Sensors and Actuators B: Chemical*, 3, 40-46.
- Apetrei, I. M. and Apetrei, C. (2015). The biocomposite screen-printed biosensor based on immobilization of tyrosinase onto the carboxyl functionalised carbon nanotube for assaying tyramine in fish products. *Journal of Food Engineering*, 1-8.
- Atasagünil, M. (1965). *Enzimler*. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayını, 26-28.
- Aykut, U. ve Temiz, H. (2006). Biyosensörler ve gıdalarda kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 51-59.
- Bardocz, S., Duguid, T. J., Brown, D. S., Grant, G., Pusztai, A., White, A. and Ralph, A. (1995). The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth . *British Journal of Nutrition*, 819-828.
- Batra, B., Lata, S., Devi, R., Yadav, S. and Pundir, C. S. (2012). Fabrication of an amperometric tyramine biosensor based on immobilization of tyramine oxidase on AgNPs/L-Cys-modified Au electrode. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 16, 3869-3876.
- Bodur, O. C. (2019). *Alzheimer hastalığının teşhisi için asetilkolin biyosensörünün hazırlanması*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 46-48.
- Bodur, O. C., Keskin, M., Avan, B. A. and Arslan, H. (2023). Designing an electrochemical biosensor based on tyrosinase for highly sensitive and rapid detection of bisphenol A and its derivatives. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 3, 521-536.
- Boka, B., Adanyi, N., Virag, D., Sebela, M. and Kiss, A. (2011). Spoilage detection with biogenic amine biosensors, comparison of different enzyme electrodes. *Elektroanalysis*, 12, 181-186.
- Borisov, S. M. and Wolfbeis, O. S. (2008). Optical biosensors. *Chemical Reviews*, 108(2), 423-461.
- Burdychova, R. and Komprda, T. (2007). Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiology Letters*, 276(2), 149-155.

- Chambers, J. P. and Arulanandam, B. P. (2008). Biosensor recognition elements. *Current Issues in Molecular Biology*, 10(1-2), 1-12.
- Custodio, F. B., Tavares, E., Beatriz, M. and Gloria, A. (2007). Extraction of bioactive amines from grated Parmesan cheese using acid, alkaline and organic solvents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 8, 280-288.
- Çalışkan, S. (2012). *Kreatin tayini için yeni bir amperometrik biyosensör hazırlanması*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 82-85.
- Çil, B. (2014). *Fenollere duyarlı potansiyometrik mikro biyosensörler ve uygulamalar*. Yüksek Lisans Tezi, Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Giresun, 18-22.
- Dalkıran, B., Kaçar, C., Can, E., Erden, P. E. and Kılıç, E. (2020). Disposable biosensors based on platinum nanoparticle-modified screen-printed carbon electrodes for the determination of biogenic amines. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 151, 1773-1783.
- Düz, M. and Fidan, A. F. (2016). Biyojen aminler ve etkileri. *Kocatepe Veterinary Journal*, 9(2), 114-121.
- Edmondson, D. E., Bhattacharyya, A. K. and Walker, M. C. (1993). Spectral and kinetic studies of imine product formation in the oxidation of p-(N, N-dimethylamino) benzylamine analogs by monoamine oxidase B. *Biochemistry*, 32(19), 5196-5202.
- Ercan, S. Ş., Bozkurt, H. and Soysal, Ç. (2013). Significance of biogenic amines in foods and their reduction methods. *Journal of Food Science and Engineering*, 5, 395-410.
- Erden, P. E., Erdoğan, Z. Ö., Öztürk, F., Koçoğlu, İ. O. and Kılıç, E. (2019). Amperometric biosensors for tyramine determination based on graphene oxide and polyvinylferrocene modified screen-printed electrodes. *Electroanalysis*, 31(12), 2368-2378.
- Erden, P. E., Selvi, C. K. and Kılıç, E. (2021). A novel tyramine biosensor based on carbon nanofibers, 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate and gold nanoparticles. *Microchemical Journal*, 170, 106729.
- Erdoğan, Z. Ö. (2018). *Gıdalarda tiramin tayini için sensör geliştirilmesi*. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 92-103.
- Erginkaya, Z. ve Var, I. (1989). Et ve et ürünlerinde biyojenik aminler. *Gıda*, 3, 171-174.
- Fernandez, M., Linares, D. M., Rio, B., Ladero, V. and Alvarez, M. A. (2007). HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganisms. *Journal of Dairy Research*, 5, 276-282.
- Halasz, A., Barath, A., Sarkadi, L. S. and Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*, 6, 42-49.
- Karahan, A. G. (2003). Gıdalarda biyojen aminler. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(5), 21-32.

- Karaman, D. (2014). *In silico design and modeling of coumarin derivatives as selective monoamine oxidase a inhibitors*. Yüksek Lisans Tezi, Kadir Has Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 38-45.
- Kasavi, C. (2006). *Kovalent bağlanma ve fiziksel adsorpsiyon metotları ile proteaz enziminin immobilizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 112-115.
- Keskin , M. ve Arslan , F. (2020). Biyosensörler. *Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi*, 3, 51-60.
- Kökbaş, U., Kayrın, L. and Tuli, A. (2013). Biyosensörler ve tıpta kullanım alanları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 8(2), 499-513.
- Küçük, A. (2018). *Biyojen aminlerin tayini için modifiye elektrotların hazırlanması*. Doktora Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, 45-66.
- Lange, J. and Wittmann, C. (2001). Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372, 276-283.
- Lata, S., Yadav, S., Bhardwaj, R. and Pundir, C. (2011). Amperometric determination of tyramine in sauce and beer by epoxy resin biocomposite membrane bound tyramine oxidase . *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, 5, 104-110.
- Mohanty, S. P. and Koungianos, E. (2006). Biosensors: A tutorial review. *Leve Potentials*, 25(2), 35-40.
- Monaci, L. and Visconti, A. (2012). *Allergens*. Italy: Institute of Sciences of Food Production (ISPA), 25-32.
- Monošík, R., Stred'anský, M. and Šturdík, E. (2012). Biosensors — classification, characterization and new trends. *Acta Chimica Slovaca*, 3, 109-120.
- Önal, A. (2007). A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 103(4), 1475-1486.
- Özdestan , Ö. (2013). Peynirde biyojen aminler. *Analiz 35 Dergisi*, 18, 42-47.
- Özdestan, Ö. and Üren, A. (2005). Biyojen amin analiz yöntemleri. *Akademik Gıda Dergisi*, 8, 19-24.
- Özer, İ., Tezel, H., Sanajou, S., Yirün, A. ve Baydar, T. (2022). Biyosensörler ve Kullanım Alanları: Geleneksel Derleme. *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi*, 5(2), 35-48.
- Park, S. (2019). Improvement of biosensor accuracy using an interference index detection system to minimize the interference effects caused by icterus and hemolysis in blood samples. *Analyst*, 144(17), 5223-5231.
- Polatoğlu, İ. (2018). Elektrokimyasal biyosensörler için karbon pasta elektrot tasarımı ve karakterizasyonu. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3(2), 141-148.

- Ronkainen, N. J., Halsall, H. B. and Heineman, W. R. (2010). Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 2, 1747–1763.
- Sánchez, M., López, P., Gómez, E. R. and Ruiz, B. L. (2017). Electrochemical enzyme biosensors based on calcium phosphate materials for tyramine detection in food samples. *Talanta*, 5(3), 209-216.
- Santos, M. S. (1996). Biogenic amines: their importance in foods . *International Journal of Food Microbiology*, 29(2-3), 213-231.
- Shalaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health . *Food Research International*, 29(7), 675-690.
- Sheo, L., Upadhyay, B. and Verma, N. (2013). Enzyme inhibition based biosensors: A review. *Analytical Letters*, 46(2), 225-241.
- Tombelli, S., Minunni, M. and Mascini, M. (2005). Piezoelectric biosensors: Strategies for coupling nucleic acids to piezoelectric devices. *Methods*, 12, 48-56.
- Tüylek, Z. (2017). Biyosensörler ve nanoteknolojik etkileşim. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 6(2), 71-80.
- Uçar, A., Fındık, M., Bingöl, H., Güler, E. ve Özcan, E. (2015). Kiral sensör olarak ferrosen türevli yeni schiff bazının sentezi. *Journal of the Turkish Chemical Society*, 3(2), 1-4.
- Wierenga, R., Jong, R., Kalk, K., Hol, W. and Drenth, J. (1979). Crystal structure of p-hydroxybenzoate hydroxylase. *Journal of Molecular Biology*, 131(1), 55-73.
- Yerlikaya, P. ve Gökoğlu, N. (2002). Gıdalarda biyojen aminler ve önemi. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 6(12), 24-30.
- Yeşilada, A. ve Gökhan, N. (1995). Monoamin oksidaz inhibitörlerinde yeni gelişmeler. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20, 157-172.



Gazili olmak ayrıcalıktır...