

**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İÇECEKLERDE KAFEİN TAYİNİ İÇİN
YENİ BİR BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI**

**Neslihan MERT TOPRAKKIRAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Danışman

**Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU
EDİRNE-2010**



T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İÇECEKLERDE KAFEİN TAYİNİ İÇİN YENİ BİR BİYONSENSÖR HAZIRLANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hazırlayan

Neslihan MERT TOPRAKKIRAN

Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU

EDİRNE-2010

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İÇECEKLERDE KAFEİN TAYİNİ İÇİN
YENİ BİR BİYONSENSÖR HAZIRLANMASI**

Neslihan MERT TOPRAKKIRAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez 26 / 10 / 2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Seyfettin DALGIÇ

Doç. Dr. Hülya YAĞAR

Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU

(Danışman)

ÖZET

Günümüzde kafein tayininde çeşitli kromatografik, spektrofotometrik yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bunlar özel ekipmanlar gerektiren zaman alıcı sistemlerdir.

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

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

Bu çalışmada, kahve çekirdeği, çay yaprağı, taze fasulye ve taze bakla olmak üzere 4 farklı bitkisel doku, kafein oksidaz aktivitesi bakımından tarandı. Dokulardan, nispeten daha yüksek kafein oksidaz aktivitesi gösteren taze bakla dokusu kullanılarak kafein tayini için doku temelli bir biyosensör geliştirildi.

Bu amaç doğrultusunda taze bakla bitki dokusu, immobilizasyon materyali olarak jelatin ve çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehitin kullanılmasıyla camsı karbon elektrot yüzeyinde immobilize edildi. Ölçümler, kafein konsantrasyonu ile orantılı olarak azalan akım şiddetinin belirlenmesiyle elde edilen standart grafikler yardımıyla gerçekleştirildi.

İmmobilizasyon ve çalışma koşulların optimizasyonu için, optimum glutaraldehit yüzdesi, doku miktarı, jelatin miktarı, pH, tampon konsantrasyonu ve sıcaklık değerleri taze bakla biyosensörü için sırasıyla % 1, 20.59 mg/cm², 2.37 mg/cm², 6.5, 100 mM, 37.5 °C olarak bulundu. Bunun yanı sıra purin halkası içeren 6 farklı bileşik substrat olarak kullanılarak taze bakla biyosensörünün verdiği cevaplar incelendi. Geliştirilen biyosensörün depolama kararlılığı, analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği ve bazı kimyasal maddelerin biyosensör cevabı üzerine etkisi araştırıldı.

Taze bakla biyosensörü için kafein lineer tayin aralığı, 1.5-4.0 mM olarak bulundu. Biyosensörün standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri, sırasıyla ± 0.040866 ve % 1.36 olarak bulundu. Çalışmanın son kısmında çeşitli içecek örneklerinde kafein miktarı standart ekleme metoduyla belirlendi.

Anahtar kelimeler: Amperometrik biyosensör, kafein oksidaz, doku biyosensörü, kafein

ABSTRACT

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

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

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

In this study, firstly, four different tissues as tea leaf, fresh bean, fresh broad, unroasted coffee bean were scanned for caffeine oxidase activity. The tissue based biosensor was prepared for determination of caffeine by using fresh broad, which have the highest caffeine oxidase activity.

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

For the optimization of the immobilization and experimental parameters such as optimum glutaraldehyde percentages, amounts of tissue homogenate, amounts of gelatin, pH, buffer concentrations and temperatures were founded to be 1 %, 20.59 mg/cm², 2.37 mg/cm², 6.5, 100 mM, 37.5 °C for fresh broad based biosensor, respectively. Substrate specifities of biosensor were studied by using six different substrates which contain purine system. The usability and storage of the biosensor were investigated in optimum conditions. The effects of some chemical compounds on biosensor response were studied by using some salts and sugars.

The typical calibration curve for fresh broad biosensor revealed a linear range of 1.5- 4.0 mM caffeine. Standard deviation and variation coefficient of the biosensor were calculated ± 0.040866 and % 1.36 for fresh broad based biosensor, respectively. Finally, concentration of caffeine were determined with developed biosensor by using standard addition method in common drinks used in daily life.

Key words: Amperometric biosensor, caffeine oxidase, caffeine, tissue biosensor

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, kıymetli görüş ve tecrübelerini benimle paylaşan, her konuda ilgi ve desteğini gördüğüm değerli danışmanım Prof.Dr.Ayten SAĞIROĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın deneysel aşamalarında yardım ve görüşlerini esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN, Arş. Gör. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR ve Öğr. Gör. Hatice PALÜZAR'a, ve manevi desteğini esirgemeyen tüm yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Hep yanımda olan, desteğini esirgemeyen eşime ve annesinden ayrı kalma fedakarlığını gösteren biricik kızım ANDAY'a... İyi ki varsınız.

Neslihan MERT TOPRAKKIRAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	I
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR	XIII
1.GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Purinler	3
2.2. Kafein	5
2.2.1. Kafeinin genel özellikleri	5
2.2.2. Kafeinin fiziksel özellikleri	7
2.2.3. Kafeinin molekül yapısı	8
2.2.4. Kafein metabolizması	9
2.2.5. Kafein tüketimi	11
2.2.6. Kafeinin organizmaya etkileri	13
2.2.7. Kafeinin uyarıcı etkisi	14
2.2.8. Kafeinin olumsuz etkileri	16
2.2.9. Kafeinin olumlu etkileri	20
2.2.10. Kafein tayin metodları	21

2.2.10.1. UV spektrofotometrik tayin	21
2.2.10.2. HPLC ile tayin	21
2.2.10.3. Kapiler elektroforez ile tayin	22
2.2.10.4. FTIR ile tayin	23
2.2.10.5. Kafeinin biyosensör esaslı tayini	23
2.3. Biyosensörler	24
2.3.1. Biyosensörlere genel bakış	24
2.3.2. Biyosensörler ve bileşenleri	25
2.3.2.1. Biyolojik bileşenler (reseptör)	26
2.3.2.2. Fiziksel bileşenler (transduser)	26
2.3.3. Biyosensörlerin sınıflandırılması	27
2.3.3.1. Enzim biyosensörleri	28
2.3.3.2. Doku biyosensörleri	30
2.3.3.3. Mikrobiyal biyosensörler	30
2.3.3.4. DNA biyosensörleri	31
2.3.3.5. İmmünosensörler	31
2.3.4. Biyosensörlerin performansını etkileyen faktörler	32
2.3.5. Biyolojik bileşenlerin immobilizasyonu	34
2.3.6. Kafein oksidaz enzimi	35
2.3.7. Kafein biyosensöründe kullanılan biyobileşenler	36
3. MATERYAL VE METOD	39
3.1. Materyaller	39
3.1.1. Bitkisel materyaller	39
3.1.2. Kimyasallar	39
3.1.3. Cihazlar	40

3.2. Metodlar	40
3.2.1. Biyosensörün çalışma ilkesi	40
3.2.2. Doku homojenatı biyosensörlerinin hazırlanması	41
3.2.3. Kafein tayini için uygun dokunun belirlenmesi	42
3.2.3.1. Taze bakla dokusu biyosensörünün hazırlanması	42
3.2.3.2. Taze fasulye dokusu biyosensörünün hazırlanması	42
3.2.3.3. Çay yaprağı dokusu biyosensörünün hazırlanması	43
3.2.3.4. Kahve çekirdeği dokusu biyosensörünün hazırlanması	43
3.2.4. Doku homojenatı biyosensörü ve ölçüm ilkesi	45
3.2.5. Biyosensörün biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonu	46
3.2.5.1. Doku miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi	46
3.2.5.2. Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi	47
3.2.5.3. Glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisi	47
3.2.6. Biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyonu	47
3.2.6.1. En uygun pH değerinin belirlenmesi	47
3.2.6.2. En uygun tampon konsantrasyonunun belirlenmesi	48
3.2.6.3. Reaksiyon ortamının optimum sıcaklığının belirlenmesi	48
3.2.7. Biyosensörün karakterizasyonu	48
3.2.7.1. Kafein tayin sınırlarının belirlenmesi	49
3.2.7.2. Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği	49
3.2.7.3. Biyosensörün işlem kararlılığı	49
3.2.7.4. Biyosensörün depo kararlılığı	49
3.2.7.5. Biyosensörün substrat spesifitesinin tayini	50
3.2.7.6. Biyosensör cevabı üzerine bazı kimyasal maddelerin etkisi	50
3.2.8. Biyosensörün farklı örneklerde kafein tayini için uygulanabilirliği	50

4. DENEYLER VE SONUÇLAR	52
4.1. Kafein Tayini İçin Uygun Dokunun Belirlenmesi	52
4.2. Biyosensörün Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyon Bulguları	54
4.2.1. Doku miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi	54
4.2.2. Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi	56
4.2.3. Glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisi	57
4.3. Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyon Bulguları	58
4.3.1. En uygun pH değeri	58
4.3.2. En uygun tampon konsantrasyonu	59
4.3.3. Reaksiyon ortamının optimum sıcaklığı	60
4.4. Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları Bulguları	61
4.4.1. Kafein lineer tayin aralığı	61
4.4.2. Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği	62
4.4.3. Biyosensörün işlem kararlılığı	62
4.4.4. Biyosensörün depo kararlılığı	63
4.4.5. Biyosensörün substrat spesifitesi	64
4.4.6. Biyosensör cevabı üzerine bazı kimyasal maddelerin etkisi	65
4.5 . Biyosensörün farklı örneklerle uygulanabilirliğinin incelenmesi	66
5. TARTIŞMA	71
KAYNAKLAR	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Purin ve pirimidin halka yapıları	3
Şekil 2.2. Laboratuvarı purin sentezi reaksiyonu	3
Şekil 2.3. Purin halka yapısı ve önemli purin bazları	4
Şekil 2.4. Kafein içeren bitki çeşitleri	5
Şekil 2.5. Saf Kafein	8
Şekil 2.6. Kafeinin (C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂) molekül yapısı	9
Şekil 2.7. İnsanlarda kafein metabolizması	10
Şekil 2.8. Kafein ve adenozinin molekül yapıları	15
Şekil 2.9. Biyosensörlerin şematik gösterimi	25
Şekil 2.10. Biyosensörlerin bileşenleri	26
Şekil 2.11. Enzim biyosensörünün çalışma ilkesi	29
Şekil 2.12. Biyosensörlerde biyobileşen immobilizasyonunda kullanılan yöntemler	35
Şekil 2.13. Kafein oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon	36
Şekil 2.14. Taze bakla bitkisi (<i>Vicia faba</i>)	37
Şekil 3.1. Biyosensör sisteminde meydana gelen reaksiyon zinciri	41
Şekil 3.2. Taze bakla dokusu biyosensörü ile yapılan ölçümlerde kullanılan düzenek	46
Şekil 4.1. Taze fasulye biyosensörünün değişen kafein miktarına karşı akım şiddeti değişimi	52
Şekil 4.2. Çay yaprağı biyosensörünün değişen kafein miktarına karşı akım şiddeti değişimi	53
Şekil 4.3. Kahve çekirdeği biyosensörünün değişen kafein miktarına karşı akım şiddeti değişimi	53
Şekil 4.4. Taze bakla biyosensörünün değişen kafein miktarına karşı akım	54

şiddeti değişimi

Şekil 4.5. Doku miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi	55
Şekil 4.6. Jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi	56
Şekil 4.7. Glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisi	57
Şekil 4.8. Taze bakla biyosensörü için optimum pH grafiği	58
Şekil 4.9. Taze bakla biyosensörü için optimum tampon konsantrasyonu grafiği	59
Şekil 4.10. Taze bakla biyosensörü için optimum sıcaklık grafiği	60
Şekil 4.11. Taze bakla biyosensörü için kafein kalibrasyon grafiği	61
Şekil 4.12. Taze bakla biyosensörünün işlem kararlılığı grafiği	63
Şekil 4.13. Taze bakla biyosensörünün depo kararlılığı	64
Şekil 4.14. Taze bakla dokusu biyosensörü için farklı substrat denemeleri	65
Şekil 4.15. Biyosensör cevabına farklı kimyasal maddelerin etkisi	66
Şekil 4.16. Taze bakla biyosensörü ile koladaki kafein analizi	67
Şekil 4.17. Taze bakla biyosensörü ile granül kahvedeki kafein analizi	68
Şekil 4.18. Taze bakla biyosensörü ile siyah çaydaki kafein analizi	68
Şekil 4.19. Taze bakla biyosensörü ile Türk kahvesindeki kafein analizi	69

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 2.1. Ticari bazı yiyecek ve içeceklerdeki kafein miktarları	12
Tablo 2.2. Biyosensörlerin sınıflandırılması	28
Tablo 4.1. Taze bakla biyosensöründe analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği	62
Tablo 4.2. Taze bakla biyosensörü ile çeşitli örneklerde kafein tayini	70

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Ag

Ag/AgCl

Pt

O₂Na⁺Mg⁺²Ca⁺²H₃O⁺

MgO

Açıklama

Gümüş

Gümüş klorür

Platin

Oksijen

Sodyum iyonu

Magnezyum iyonu

Kalsiyum iyonu

Hidronyum iyonu

Magnezyum oksit

Kısaltmalar

HPLC

GC

UV

FTIR

MS

DNA

E.C.

°C

[S]

V

M

Açıklama

Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi

Gaz Kromatografisi

Ultraviyole

Fourier Dönüşüm Infrared Spektrometresi

Kütle Spektroskopisi

Deoksiribonükleik asit

Enzim Kodu

Santigrad derece

Substrat konsantrasyonu

Volt

Molar

mM	Milimolar
cm ²	Santimetrekaare
cm ³	Santimetreküp
g	Gram
mg	Miligram
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
dk	Dakika
ΔI	Akım değışimi
I	Akım
nA	Nanoamper
nm	Nanometre

1.GİRİŞ

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

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

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

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

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

Sosyal bir alışkanlığa dönüşen kafein, keyif ve enerji verici etkileriyle hayatımızdaki yerini her geçen gün biraz daha sağlamlaştırmış ve bu durum birçok kişinin hayatında bağımlılığa kadar ulaşmıştır.

Yapılan araştırmalar sonucunda, kafeinin insan sağlığı üzerinde birçok olumlu ve olumsuz etkileri tespit edilmiştir. Bu nedenle yiyecek ve içeceklerdeki kafein miktarının tayini büyük önem kazanmıştır.

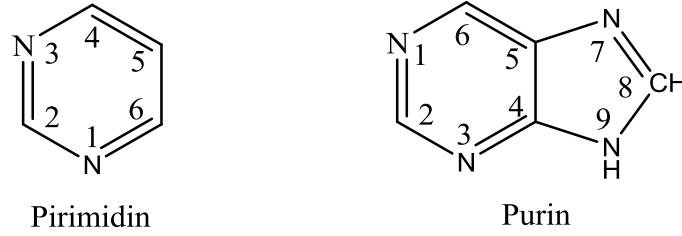
Günümüzde kafein tayinine yönelik olarak kromatografik, spektrofotometrik yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bunlar pahalı kimyasal ve cihazlara gereksinimi olan zaman alıcı yöntemlerdir. Son yıllarda bu tür bileşiklerin analizleri için pratik ve çabuk sonuç veren biyosensrlik metodlara olan ilgi giderek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

Bu tez çalışmasının amacı; kafein oksidaz enzimini içeren taze bakla dokusunun kullanılmasıyla, kafein tayinine yönelik hazırlanması kolay, ucuz, pratik uygulamaya olanak sağlayan, güvenilir ve hassas amperometrik esaslı bir biyosensörün oluşturulması ve hazırlanan biyosensörün karakterizasyonu, optimizasyonu ve uygulanabilirliğinin incelenmesidir.

2. KURAMSAL TEMELLER

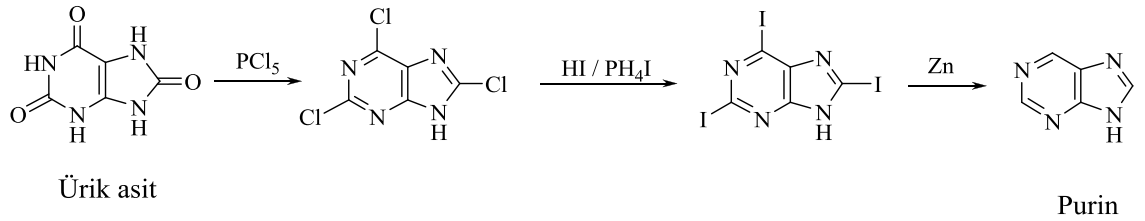
2.1. Purinler

Nükleik asitlerin yapısını oluşturan iki grup organik bazın biri purin bazları diğeri pirimidin bazlarıdır. Pirimidinler, yapılarında iki azot bulunan ve tek altı üyeli heterohalkaya sahip bazlardır. Purin halka yapısı ise pirimidinlerdeki temel halka sistemine, beşli bir imidazol halkasının bağlanmasıyla meydana gelmiştir. Purin ve pirimidin halka yapıları Şekil 2.1.'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Pirimidin ve purin halka yapıları

Purin adı Alman kimyager Emil Fischer tarafından 1884'te türetilmiştir. Fisher, purini 1899'da sentezlemiştir. Başlangıç maddesi olan ürik asit, PCl_5 ile reaksiyona sokularak 2,6,8-trikloropurin oluşturulmuş, bu ürün de HI ve PH_4I ile 2,6-diiodopurine dönüştürülmüştür. Elde edilen ürün çinko tuzu ile purine indirgenmiştir. Bu sentezin reaksiyonu şekil 2.2.'de verilmiştir.

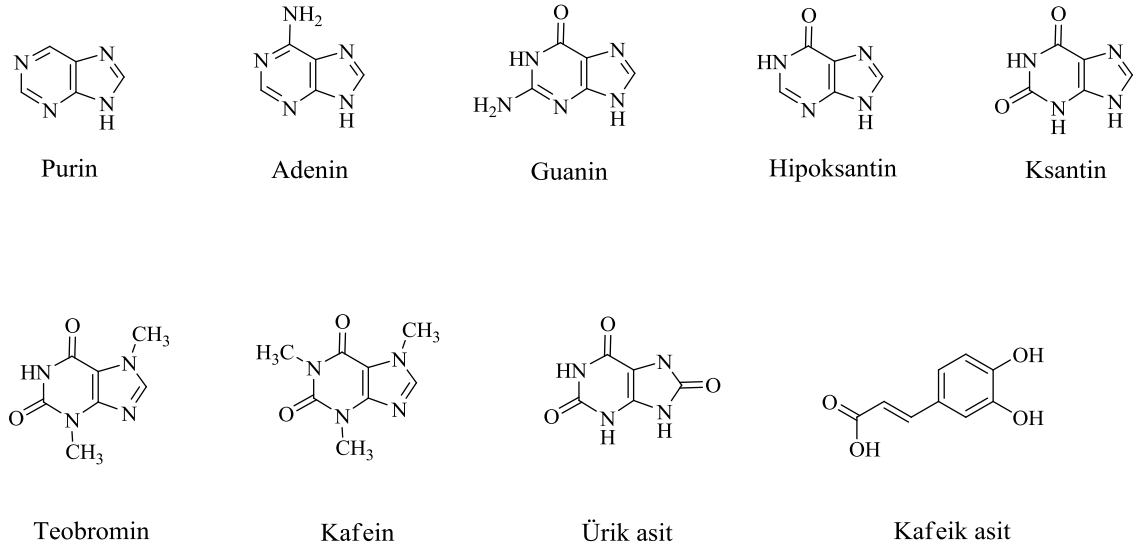


Şekil 2.2. Laboratuvarda purin sentezi reaksiyonu

Nükleik asitlerin yapısında başlıca 2 purin bazı bulunmaktadır ve bunlar **adenin** ve **guanin**'dir. Purinlerin (adenin ve guanin) yıkım metabolizması sırasında, son üründen bir basamak önce ara ürün olarak, adeninden **hipoksantin**, guaninden **ksantin** oluşur. Bu iki ara ürün de sonraki adımlarda, **ürük asit** son ürününe dönüşürler. İnsanlarda, purin metabolizmasının son yıkım ürünü idrarda çıkan ürik asittir. Doğal olarak canlılarda meydana gelen bu purin bazları daha çok genetik materyaller olan DNA ve RNA yapısında ve serbest nükleotidler (GMP, AMP, ADP ve ATP gibi) halinde bütün canlılarda bulunurlar. Serbest nükleotidler, enerji bileşiği, koenzim ve aktivatör olarak fonksiyon gösterirler.

Bitkilerde yukarıda belirtilen ortak purin türevlerinin yanında, metilatlanmış purinler de bulunur ve bunlardan **teobromin** ve **kafein** yüksek uyarıcı fizyolojik aktiviteye sahiptirler. Çay, kahve, mate ve kakaoda bağl olarak konsantrasyonları yüksektir. Purin bazları genellikle renksiz, kristal yapılı bileşiklerdir. Suda yavaş çözünürler, alkali veya zayıf asitli çözeltilerde daha çabuk çözünürler (Sağıroğlu, 2003).

Önemli purin bazlarının yapıları Şekil 2.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Purin halka yapısı ve önemli purin bazları

2.2. Kafein

Kafein ilk kez 1819 yılında Alman kimyager Friedrich Ferdinand Runge tarafından, kahve çekirdeklerinden izole edilmiş ve elde edilen saf kafeine RUNGE KAFEİNİ adı verilmiştir. Kafeinin ilk toplam sentezi ise 1895 yılında Franz Fischer tarafından gerçekleştirilmiştir (Polat, 2005).

2.2.1. Kafeinin genel özellikleri

Kafein, tein, trimetilksantin, matein, guaranin, metilteobromin gibi isimlerle de anılan, başlıca çay, kahve, kakao, kola nut, mate, guarana olmak üzere 60'tan fazla bitki türünün meyvesinde, tohumlarında ya da yapraklarında bulunan doğal bir alkaloiddir. Dolayısıyla bu bitkilerden yapılan yiyecek ve içeceklerin çoğunda bulunur. Ayrıca tat vermek için yiyecek ve içeceklere, etkilerini artırmak için de ilaçlara katıldığı da bilinmektedir. Sonuç olarak kafein, hazır kahvede, bitkisel çaylarda, çayda, kolada, çikolatada ve bazı soğuk algınlığı ilaçları, ağrı kesiciler, diyet hapları ve alerji ilaçlarında da bulunur. Şekil 2.4.'de kafein içeren bitkilere örnekler verilmiştir.

ÇAY



Çay Bitkisi



Kurutulmuş Çay Yaprakları



Çay

KAHVE

Kahve Bitkisi



Kahve ekirdekleri



Kahve

KAKAO

Kakao Ağacı



Kakao ekirdekleri



Kakao Tozu

KOLA NUT

Kola Nut Ağacı



Kola Nut Yapradı



Kola Nut Taneleri

MATE



Mate Ağacı



Mate Yaprakları



Kurutulmuş Mate

GUARANA



Guarana Bitkisi



Guarana Taneleri



Guarana Tozu

Şekil 2.4. Kafein içeren bitki çeşitleri

2.2.2. Kafeinin fiziksel özellikleri

Saf ve katı haldeki kafein beyaz toz veya parlak görünümlü iğneler şeklindedir (Şekil 2.5.). Bazı özellik göstermesinden dolayı tadı acıdır.

Suda, etanol, etilasetat, metanol, benzen gibi organik çözücülerde orta derecede çözünür. Kafein, sudan kristallendirilerek eldesinde 1 molekül kristal suyu ile, çözücünden kristallendirildiğinde ise susuz olarak elde edilir. Monohidrat formundaki kafein 100°C’de anhidrat formuna kolaylıkla dönüştürülebilir. Anhidrat kafein 235-238 °C’de erir. Kafein erime noktası altındaki sıcaklıklarda düşük basınç altında hemen süblimleşebilir. Atmosferik basınçta 176°C’de bozunmaksızın süblime olur (Sarath Babu vd., 2006).



Şekil 2.5. Saf Kafein

Kafeinin diğer fiziksel özellikleri aşağıda belirtilmiştir:

Kaynama Noktası: 178 °C

Erime Noktası: 238 °C

Yoğunluğu: 1.2 g/cm³

Volatilitesi: 0.5%

Buhar Basıncı: 101 kPa 178 °C

pH: 6.9 (% 1'lik çözeltinin)

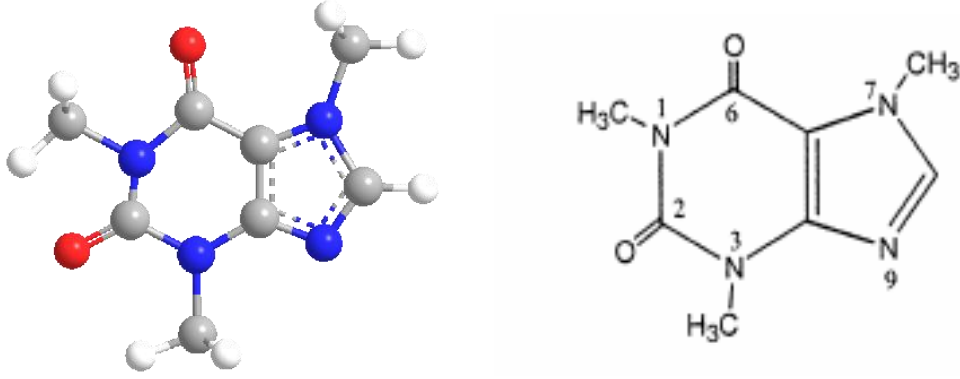
Sudaki Çözünürlüğü: % 2.17

Buhar Yoğunluğu: 6.7 g/m³

Moleküler Ağırlık: 194.19 g/mol

2.2.3. Kafeinin molekül yapısı

Kafeinin kimyasal formülü $C_8H_{10}N_4O_2$ ve sistematik ismi **1,3,7-trimetilksantin'** dir. Temel bileşeni, nükleik asitlerin yapıtaşı olan “purin” dir



Şekil 2.6. Kafeinin ($C_8H_{10}N_4O_2$) molekül yapısı

2.2.4. Kafein metabolizması

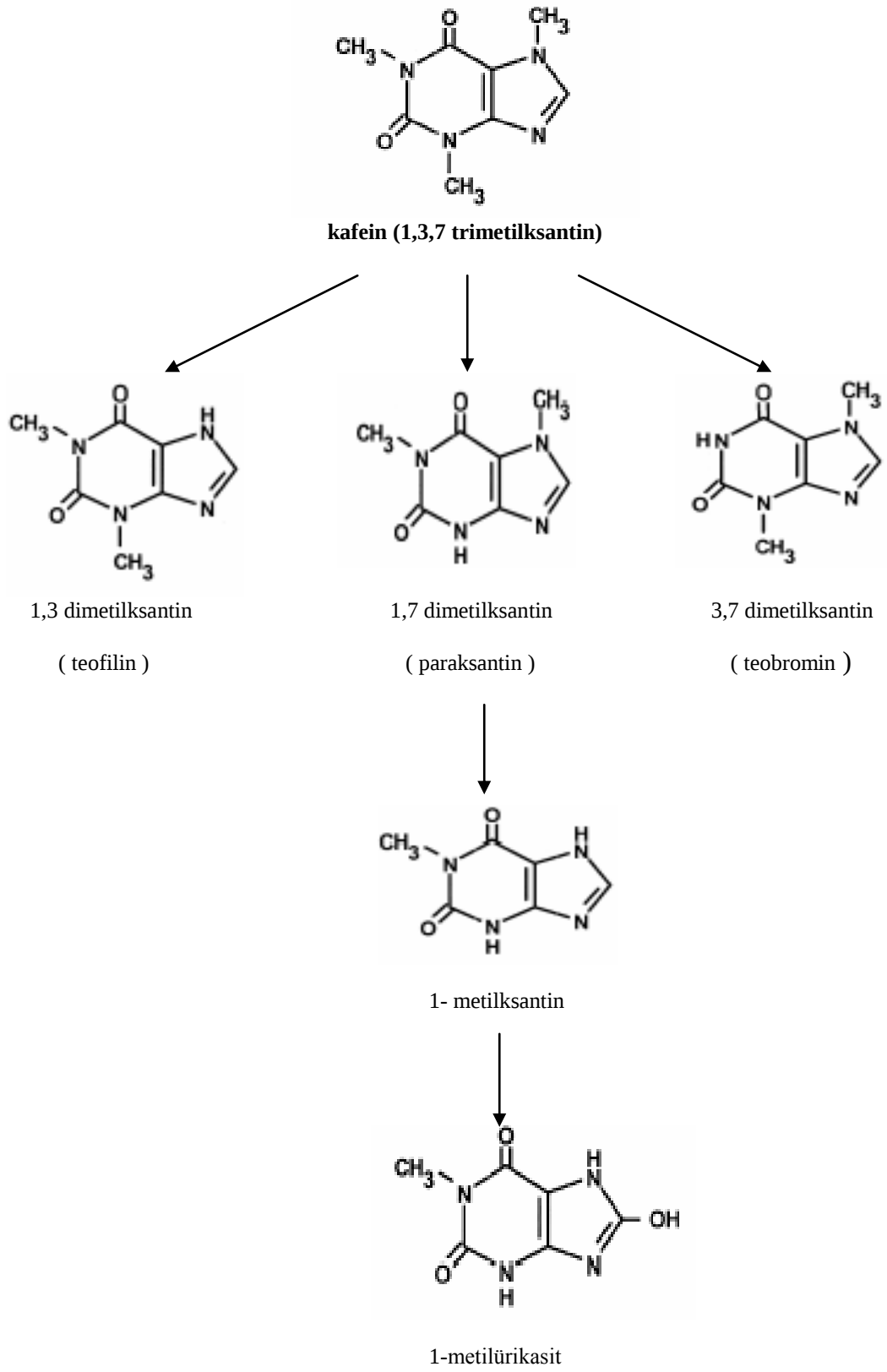
Kafein alımından sonra, kafeinin hemen hemen tamamı (%99) hızlı bir şekilde mide-barsak kanalından (gastrointestinal sistem) emilir ve 30-120 dakika sonra doza bağımlı olarak kan plazmasında en yüksek seviyesine erişir. Hidrofobik özelliğinden dolayı bütün biyolojik zarlardan geçerek hücrelere ulaşır. Kafeinin % 5'inden daha azı ürine çevrilmeden kalır.

İnsanda kafein için normal plazma seviyesi 5-20 μM olarak belirtilmiştir. 300 mg'lık kafein alımından 1-2 saat sonra plazmadaki kafein seviyesi 39-46 μM 'dır.

Yetişkin insanlarda kafein için kan-beyin bariyeri ve plasental bariyer bulunmamaktadır. Bu nedenle yüksek miktarda kafein tüketen hamile bayanların yeni doğan bebeklerinde yüksek seviyelerde kafein tespit edilmiştir.

İnsanlarda kafeinin yarı ömrü 2.5-6 saat arasında değişirken, fetal yaşam ve yeni doğan periyodunda bu süre, kafeinin demetilasyonu için gerekli enzimlerin noksan olması nedeniyle 32-149 saat arasında değişmektedir.

Kafein, Şekil 2.7.'deki metabolizmasına göre; hepatik sitokrom enzimi tarafından demetilasyona uğratılarak paraksantine (1,7-dimetilksantin) dönüştürülür. Bu basamak kafein metabolizmasının ilk basamağını oluşturmakla birlikte, metabolizmanın % 72-80'ini kapsar. Kafein daha düşük oranda da teobromin (3,7-dimetilksantin) ve teofiline (1,3-dimetilksantin) dönüşür. Paraksantin, aynı enzim tarafından demetilasyonla 1-metilksantine dönüşür ve sonunda 1-metil ürik asit oluşur (Ofloğlu, 2007).



Şekil 2.7. İnsanlarda kafein metabolizması

2.2.5. Kafein tüketimi

Kafein, günlük hayatta hemen her gün tüketilen kahve, çay, kola, enerji içecekleri, çikolata gibi yiyecek ve içeceklerle, reçetesiz satılan ağrı kesiciler, diyet hapları ve antihistaminik ilaçlarla vücuda alınmaktadır.

Yapılan araştırmalara göre, insanların günde ortalama 300 mg'dan fazla kafein tükettiği belirtilmiştir. Hatta gün içerisinde, kişiden kişiye değişmekle birlikte alınan kafein miktarı hesaplanırsa, hiç farkında olmadan günde 1 gr'dan fazla kafein tüketildiği görülmektedir. Oysa ki pek çok çalışmada, yetişkinlerin güvenli olarak tüketecekleri kafein miktarı 300 mg (3-4 fincan kahve ya da 5-6 büyük bardak çay) olarak belirlenmiştir.

Çocukların tüketeceği kafein miktarının ise, günde 35-40 mg'ı geçmemesi gerekmektedir. Çocuklarda kafein kullanımının (zellikle enerji içecekleri), endişe, yatak ıslatma ve uyku problemlerine yol açtığı gözlenmiştir.

Yetişkin ya da çocuklarda aşırı miktarda kafein alımı, ciddi zarar ve ölümlere neden olabilmektedir. Yetişkin bir kişinin günde alacağı aşırı doz 5-10 g olarak belirlenmiştir. Bu miktar 57 fincan nescafe, 86 kahve fincanı kahve ya da 161 çay bardağı aya karşılık gelmektedir. Çocukların günde alacağı aşırı doz ise, 1 g'dan daha az olarak belirlenmiştir. Bu da 22 tane kutu kolaya karşılık gelmektedir (Ofluoğlu, 2007).

Tablo 2.1. Ticari bazı yiyecek ve içeceklerdeki kafein miktarları

Filtre kahve	150 ml	60-180 mg kafein
Kafeinsiz kahve	150 ml	2-8 mg kafein
Türk Kahvesi	150 ml	57 mg kafein
Espresso	150 ml	100 mg kafein
Cappuccino	150 ml	100 mg kafein
Demleme çay	150 ml	20 - 110 mg kafein
Poşet çay	150 ml	24-50 mg kafein
Yeşil çay	150 ml	30-48 mg kafein
Kakao	150 ml	2-7 mg kafein
Ice Tea	330 ml	70 mg kafein
Sütlü çikolata	28 g	1-15 mg kafein
Bitter çikolata	28 g	5-35 mg kafein
Kola	330 ml	46 mg kafein
Diet kola	330 ml	46 mg kafein
Enerji içeceği	200 ml	80 mg kafein

Kafeinin vücuttaki etkileri göz önüne alındığında, gıdalardaki kafein miktarının önemli olduğu anlaşılmaktadır. Bu sebeple gıdaların kafein içeriği yasalarla denetlenmektedir.

Alkolsüz içeceklerdeki kafein miktarı ile ilgili yasa aşağıda belirtildiği gibidir: Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nın AB mevzuatına uyum amacıyla Türk Gıda Kodeksi kapsamında hazırladığı tebliğ 2007 yılında yürürlüğe girmiştir. **Tebliğe göre:**

Alkolsüz içecekler, tiplerine özgü tat, koku, renk ve görünüşte olacaklar, yabancı tat ve koku içermeyecektir. Alkolsüz içeceklerdeki kafein miktarı **en fazla 150 mg/L** olacaktır.

Kafein miktarı 1 mg/L'den fazla olan ürünlerde “**kafein içerir**” ifadesi, marka ile aynı yüzde yer alan ürün adının altında, farklı ve dikkat çekici renkte ve büyüklükte belirgin şekilde yer alacak, ürün etiketinde de bu bileşenin miktarı belirtilecektir.

Kafein miktarı 1 mg/L'den düşük olan ürünlerde “ **kafein içermez**” veya “**kafeinsiz**” ibaresi isteğe bağlı olarak kullanılabilecektir.

Aynı tebliğde enerji içecekleri için de kafein sınırı **150 mg/L** olarak belirtilmiştir. Ayrıca aşağıdaki uyarı ifadesinin bulunması zorunluluğu getirilmiştir:

“ Alkol ile birlikte tüketilmemelidir. Gebe ve emzikli kadınlar ile yaşlı kişiler için tavsiye edilmez. Diabetikler, yüksek tansiyonu olanlar, metabolik hastalığı olanlar, böbrek yetmezliği olanlar ile kafeine hassas kişiler için tavsiye edilmez. Sporcu içeceği değildir, yoğun fiziksel aktivite sırasında veya sonrasında tüketilmemelidir. 18 yaş altı kişilere satılamaz.”

2.2.6. Kafeinin organizmaya etkileri

Kafeinin günlük normal doz aralığında (50-300 mg) tüketimi, vücudun enerji seviyesinin artmasına, uyanık ve dinç olmaya, keyif ve rahatlık hislerinde artışa neden olur. Ayrıca kan basıncını artırır, nabızı hızlandırır, kan damarlarını daraltır, nefes almayı kolaylaştırır ve mide asit seviyesini yükseltir. Bu değişimler, vücudun stres altında verdiği tepkilere yakındır. Beyine giden kan damarlarının daralması, kan akışını azaltır ve beynin bunu bir tehdit olarak algılamasını ve vücudu korumak için atağa geçmesini sağlar. Bu durum uykunun ertelenmesine ve stres hormonlarının yükselmesine neden olur.

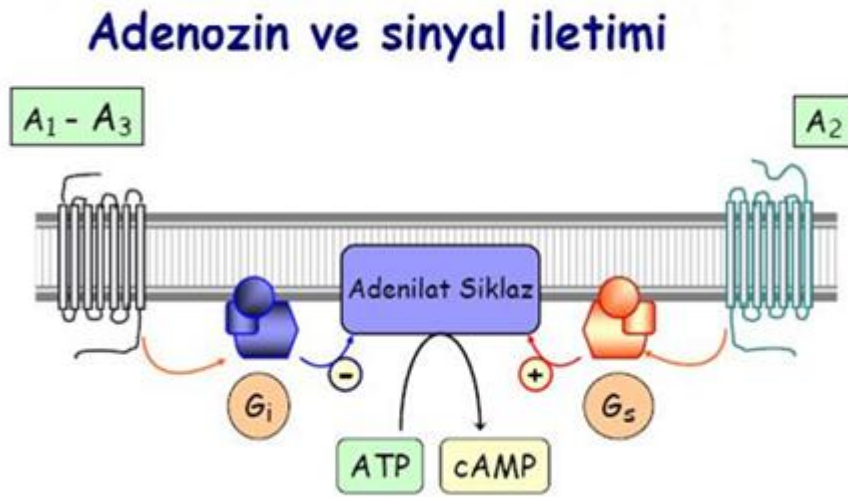
Kafeinin yüksek miktarlardaki (300-800 mg ve üzeri) tüketimi, kişide uyku bozukluğu ve uykusuzluk hali, sinirlilik, huzursuzluk, endişe, panik atak, kaygı hallerine sebep olur. Düzenli olarak alınan kafeinin kesilmesi baş ağrısı, yorgunluk,

halsizlik, uykusuzluk ya da uykulu olma hali, konsantrasyon eksikliği, huzursuzluk ve sinirlilik gibi yoksunluk belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olur.

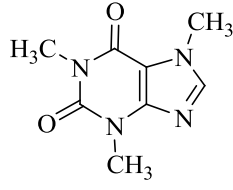
Kafein devamlı ve düzenli olarak kullanıldığında bağımlılık oluşturur. Kafeinin uyanık ve dinç olma, keyif ve rahatlık hislerindeki artış gibi etkileri, alınan kafein miktarına ve kişinin kafeine olan bağımlılık ve bağışıklık derecesine bağlı olarak değişmektedir (Ofloğlu, 2007).

2.2.7. Kafeinin Uyarıcı Etkisi

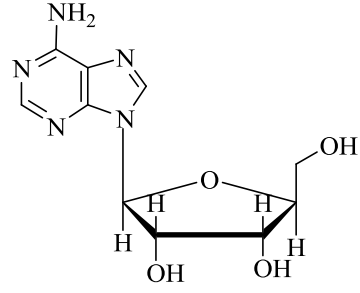
Kafeinin bizi uyanık tutması, kafeinin adenosin reseptörüne bağlanmasıyla ilgilidir. İnsanın beyinde üretilen adenosin adı verilen bir madde ile ilişkilidir. Adenosin, kendisine özgü reseptörlere bağlanarak sinir hücrelerinin aktivitesini yavaşlatır ve vücudu uykuya hazırlar yani rahatlatır. Adenosinin reseptörlerine bağlanması beyindeki damarlarda da genişlemeye neden olur. Bu sayede uyku sırasında beyine daha fazla kan ve oksijen gider.



(Klinger vd., 2000, Kayır ve Uzbay, 2004)



Kafein



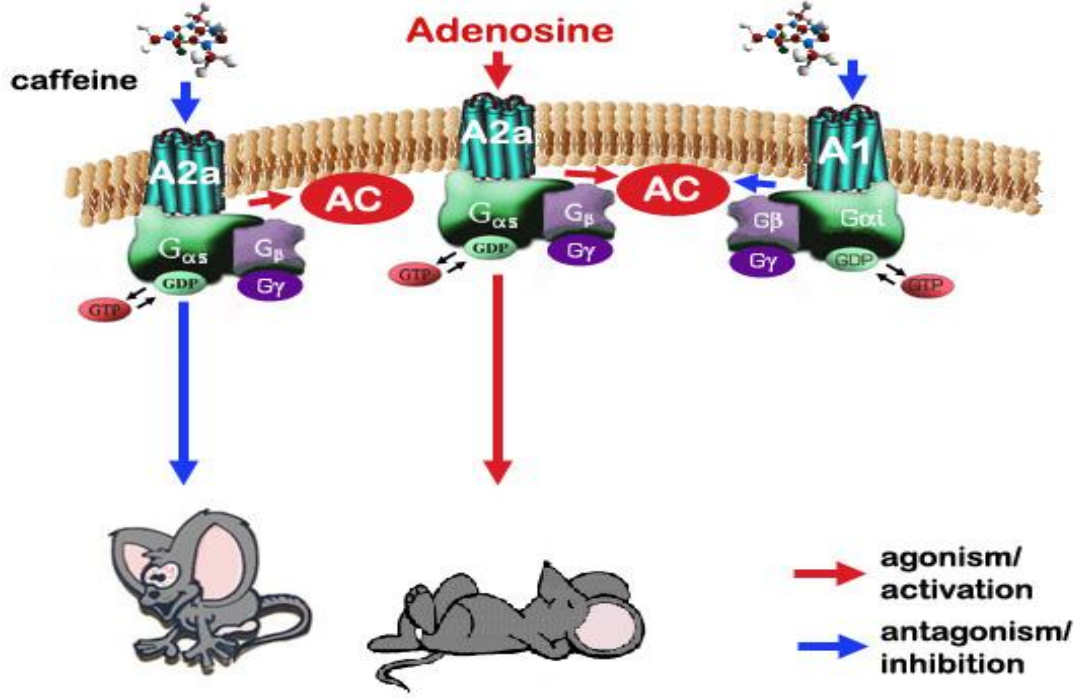
Adenozin

Şekil 2.8. Kafein ve adenozinin molekül yapıları

Organizmaya kafein alındığı zaman ise, kafein molekülü adenozine yapı olarak benzer bir molekül olduğundan (Şekil 2.8.) aynı reseptöre bağlanır. Kafein, adenozin reseptörüne bağlanarak onu bloke eder, böylece sinir hücreleri dolaşımdaki adenozini fark edemez ve aktiviteleri yavaşlamak yerine hızlanır. Kafein aynı zamanda kan damarlarında daralma ve büzüşmeye neden olur. Bu durum damar kökenli baş ağrılarının geçmesine neden olduğundan, kafein bu özelliğiyle bazı ağrı kesicilerin içinde de bulunur.

Sinir hücrelerindeki aktivite artınca hipofiz bezi bu durumu vücutta acil bir durum varmış gibi algılar ve böbrek üstü bezlerini adrenalin salgılamak üzere uyarır. Adrenalinin etkisiyle, göz bebekleri büyür, solunum yolları genişler, kalp atımları hızlanır, cilde yakın kan damarları büzüşerek kanın kas ve vital organlara akmasını sağlar, cilt soluklaşır ve soğur, midenin kan akımı azalır, ek enerji sağlamak için karaciğer kan şekerini yükseltir, kaslar kasılarak harekete hazırlanır.

Kafein, tıpkı amfetaminler, kokain ve eroin gibi dopamin adı verilen maddenin salınımını artırır. Dopamin, mutluluk hormonu olarak da bilinir. Kafeinin dopamin üzerindeki bu etkisi bağımlılık nedeni olarak gösterilmektedir.



(www.cellscience.com)

2.2.8. Kafeinin olumsuz etkileri

Hamilelikte kafein

Araştırmalara göre, kafeinin özellikle hamile kadınlar üzerindeki etkisinin fazla olduğu saptanmıştır. Journal of American Medical Association (JAMA)'da yayınlanan bir araştırma, hamileliğin ilk dönemlerinde kafein kullanımının düşük tehlikesini arttırdığını gösterdi. Araştırmada, hamileliklerinin ilk üç ayında düşük yapan 550 ve düşük yapmayan 950 kadın incelenmiş ve elde edilen veriler karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, günde 1-2 fincan kahve içen kadınlardaki düşük yapma riskinin hiç içmeyenlere oranla % 30 daha fazla olduğu gözlenmiş, kahve tüketimi 4 fincana çıktığında bu oran % 40'a, 5 fincanın üzerine çıktığında ise % 220'ye yükselmiştir. Bu duruma neden olan faktörler tam olarak bilinmemekle birlikte, hamile kadınların metabolizmalarının kafeini daha yavaş özümlediği bilinmektedir.

Kafeinin vücuttaki yarı ömrü 6 saat iken hamilelikte bu zaman 11 saate kadar uzayabilir. Fetusta ise durum daha ürkütücüdür: 32-149 saat. Bu, içilen kahveden bebeğe geçen kafeinin yarısından fazlasının, 100 saat sonra bile hala anne karnındaki bebeğin kanında dolaştığı anlamına gelir. Plesantaya nüfuz eden kafein, korunmasız olan fetus üzerinde toksik etki yaratmaktadır. Bebek ne kadar küçükse onun kafeini detoksifiye etme yeteneği de o kadar azdır.

Kafeinin günlük normal doz aralığında tüketimi, anne adayında çarpıntı ve benzeri yakınmalar yaratmasa da bebeğin kalp atımlarında ve solunumunda (bebek daha doğmadan da anne karnında solunum hareketleri yapar) belirgin artışa neden olabilir.

Yapılan hayvan deneylerinde, anne karnında orta ya da yüksek düzeyde kafeine maruz kalan fetusların beyin ağırlıklarında azalma ve beyin gelişiminde dalgalanmalar izlenmiştir. Yine bu fetuslarda doğumdan sonra öğrenme ve hatırlama güçlükleri ortaya çıkmaktadır.

Bazı çalışmalar ise yüksek miktarda kafein alımının, düşük doğum ağırlığı ve yarık damak, yarık dudak gibi anomalilerle ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Ancak bu çalışmalarda eksik olan nokta bu anomalilere yol açabileceği bilinen alkol alımı, sigara gibi diğer risk faktörlerinin dikkate alınmamış olmasıdır.

Özellikle yemeklerden hemen sonra alınan kafein, bağırsaklardan demir emilimini % 40 oranında azaltır. Bu durum demir gereksiniminin çok yüksek olduğu hamilelik döneminde oldukça önemlidir.

Sonuç olarak, doktorlar hamile kadınlara günde 200 mg'dan (2- 4 fincan çay ya da kahve) daha fazla kafein almamalarını önermektedirler (www.mumcu.com).

Kafein ve kanser

Kafeinin kanser riskini arttırdığına dair kesin bulgular yoktur. Ancak kafeinin meme dokusunu etkileyerek kist oluşumuna neden olacağı şüpheleri vardır. Çünkü eski araştırmalar, günde 500 mg'ın üzerinde (5 fincandan fazla kahveye eşdeğer) kafein tüketiminin kist oluşum riskini arttırdığını göstermekteydi. Diğer taraftan Amerikan

Beslenme Derneği tarafından yürütülen bir çalışma, kafeinin göğüs dokusu üzerinde herhangi bir etkisi bulunmadığını göstermiştir (<http://www.turkiyedoktorlari.com>).

Kafein ve kemik erimesi

Kafeinin kalsiyum eksikliğine yol açtığı bilinmektedir. Çünkü kafein, çeşitli vitaminlerin, kalsiyum ve demir gibi minerallerin emilimini bloke eder. Ayrıca diüretik etkisi nedeniyle de kalsiyum depolanmasını olumsuz etkiler. Bu da kafeinin kemik yoğunluğunu azaltacağı, sonuçta da kemik erimesiyle karşı karşıya kalınacağını düşündürmektedir.

Osteoporozun değiştirilebilir belirleyicilerinden biri olan içeceklerle alınan kafein miktarı ve kemik mineral yoğunluğu arasındaki ilişki incelendiğinde, cinse ve ölçümün yapıldığı bölgeye bağlı farklılıkların olduğu saptanmıştır (Başaran vd., 2005).

Kafein ve tansiyon

Kafein tüketimi kan basıncını birkaç dakikalığına hatta birkaç saatliğine yükseltebilir, ancak yüksek tansiyona yol açmaz. Bunun yanı sıra, zaten yüksek tansiyonu olan kişilerin yoğun stres altındayken kafein tüketimiyle birlikte, tansiyonlarının daha da yükseldiği ve felç riskinin arttığı gözlenmiştir.

Kafein ve kalp rahatsızlıkları

Kafein çarpıntıya, düzensiz ve hızlı kalp atışına neden olabilir. Bu durum, aritmisi ve kalp rahatsızlığı olanlar için sorun yaratabilir. Günde 6 fincan ve üzerinde kahve içenlerin kalp krizi geçirme riskinin arttığı görülmüştür. Buna rağmen kafein tek başına kalp rahatsızlıklarından veya kalp krizinden sorumlu tutulamaz (Lane vd., 2002).

Kahvenin kalbe zarar verip vermediği tartışmalıdır. Amerikan Kalp Derneği'nin 2005 yılı Bilimsel Toplantısı'nda sunulan bir çalışma, kafeinden arındırılmış kahvenin, özel bir kan yağının düzeyini yükselterek zararlı LDL kolesterolünün artmasına yol

açtığını ortaya koydu. Çalışmada, iki gruba ayrılan deneklere kafeinli ve kafeinsiz kahve ile birlikte, kahve yapma makineleri verilmiş ve bunlarla, tarif edilen biçimde ve söylenen miktarlarda verilen kahveyi yapmaları istenmiş. Araştırmayı yöneten Dr. Robert Superko'ya göre kahvedeki kafein düzeyi, kafeinli ve kafeinsiz kahveleri farklı kılan tek unsur değil. Superko, kafeinli ve kafeinsiz kahve markalarının, farklı türde kahve çekirdeklerinden üretildiğine işaret ediyor. O'na göre kahveden kafeini çıkarma sürecinde bazı flavanoidler de kaybolduğundan, üreticiler tadını korumak için kafeinsiz kahveleri daha kuvvetli olan çekirdeklerden üretiyorlar.

Üç ay süren uygulamanın öncesi ve sonrasında deneklerin kanlarındaki kafein miktarlarıyla kısaca “metabolik sendrom” diye adlandırılan bir grup kalp hastalığı risk faktörü ölçülmüştür. Araştırmada, kan basıncına, kalp atış hızına, beden kütle indisine, toplam kolesterol düzeyine, trigliseridlere, HDL ve LDL'ye, insülin, glukoz ve kandaki yağ miktarına (NEFA), HDL2'ye (yüksek yoğunlukta lipoprotein-çok iyi bir kolesterol) bakılmıştır. Üç aylık kahve tüketiminin sonunda farklı gruplardaki deneklerin kanlarında glukoz, insülin ve diğer risk faktörlerinde bir farklılık belirlenmemiştir. Ancak, kafeinsiz kahve tüketen gruptakilerin kanlarındaki yağ asitlerinde dikkat çekici bir artış olmuştur. Bunlar LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein-kötü kolesterol) üretimini hızlandıran faktörlerdir ve bu faktörlerin kalp rahatsızlıklarını tetiklediği ifade edilmektedir (TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi, 2005).

Kafeinin diüretik etkisi

Kafein böbrekleri çalıştırarak daha sık idrara çıkmayı sağlar. Bu durum bir süre sonra mesanede tahrişe ve rahatsızlığa neden olabilmektedir. Ayrıca fazla idrar yapma vücuttan su eksilmesine de neden olur.

Kafein ve anksiyete-panik atak

Yüksek dozda kafein, beyin kimyasını etkileyerek anksiyete ve panik atak oluşumunu güçlendirir.

Kafein ve adet öncesi sendrom

Kafein, kan şekerini düşürerek adet öncesi sendromu şiddetlendirir. Bazı araştırmalara göre, günde 3-4 fincan kahve içenlerde adet öncesi sendrom şikayetleri üç kat artmıştır.

Kafein ve mide problemleri

Kafein mide salgısını uyarır. Mide salgısının aşırı artması mide dokusu zayıf olan bireylerde ülser riskini artırır. Bu nedenle gastrit ve ülser meyilli olan kişilerin kafein tüketimi konusunda dikkatli olması gerekir (www.turkiyedoktorlari.com) .

2.2.9. Kafeinin Olumlu Etkileri

Araştırmalar, kafeinin pek çok olumlu etkisinin de olduğunu göstermiştir.

- Kafeinin psikolojik canlandırıcı etkisi vardır. Uyku hali yaratan adenosin adlı beyin kimyasalını bloke ederek düşünsel performansı artırır ve ruh haline olumlu katkıda bulunur. Üstelik bu etkiyi 50 mg'dan daha az kafein (örneğin 1 fincan çay) dahi gösterir.
- Kas koordinasyonu ve gücü artırır.
- Enerji sarfiyatını yükseltir ve fazla kalori yakmaya yardımcı olur.
- Akciğere giden solunum yollarını rahatlatır ve astım krizlerini azaltıcı etkisi vardır.
- Günde 2-3 fincan kahve içen erkeklerde safra taşı oluşumunun azaldığı görülmüştür.
- JAMA'da yayınlanan yeni bir araştırmaya göre, kafein tüketimi arttırılarak Parkinson hastalığı riski azaltılabilir (<http://www.turkiyedoktorlari.com>).
- İdrar söktürücü özelliği nedeniyle, şişkinlikten kaynaklanan rahatsızlıkların giderilmesine yardımcı olur.

- Beyinde kan damarlarını daraltır, bu nedenle bazı migren ağrısı tiplerini tedavi etmek ve merkezi sinir sistemini zayıflatan bazı ilaçları dengelemek için kullanılır.
- Hiperaktif çocukların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu çocuklar üzerinde sakinleştirici etkisi vardır.

2.2.10. Kafein tayin metodları

Kafein miktar tayini için geleneksel olarak en çok kullanılan yöntemler, Yüksek Performans Likit Kromatografisi (HPLC) ve UV spektrofotometrik tayin metodlarıdır. Ayrıca, kapiler elektroforez ve gaz kromatografisi (GC) gibi metodlar, kütle spektroskopisi (MS) ve fourier dönüşüm infrared spektrometresi (FTIR) gibi tayin metodları ile birleştirilerek kullanılır (Akyılmaz ve Türemiş, 2010).

.

2.2.10.1. UV Spektrofotometrik tayin

Bazık ortamda ekstrakte edilen kafeinin asidik ve bazık iki kolondan seçimli olarak arıtılmasından sonra 276 nm dalga boyunda absorbansının ölçülmesi esasına dayanır (TS 5389).

Ayrıca, çay, kahve, kola gibi bazı içeceklerdeki kafein içeriği, herhangi bir ön-ayırma ya da bir düzeltme prosedürü kullanmaksızın, ikinci ve üçüncü derece türev spektrofotometre ile tayin edildi. Metod, örnek çözeltilerin ikinci derece ve üçüncü derece türev spektrumlarının iki maksimum değeri arasındaki uzaklığın ölçülmesi esasına dayanır (Alpdoğan vd., 2002).

2.2.10.2. HPLC ile tayin

Kafein tayininde en çok kullanılan metodlardan biri yüksek performans likit kromatografisi (HPLC)'dir.

Yöntem, MgO'li ortamda, 90°C sıcaklıkta su ile kafeinin ekstraksiyonu, filtrasyonu ve bir UV dedektörünün kullanıldığı HPLC tekniği ile kafeinin tayin edilmesi esasına dayanır. Taşıyıcı faz olarak metanol-su karışımı kullanılır ve akış hızı 1ml/dk'ya ayarlanır. C18 ters faz kolonu kullanılır ve kolon sıcaklığı 40°C' dir. Enjeksiyon miktarı 10µM, dalga boyu 280 nm'dir.

Nishitani ve Sagesaka'nın bu prensiple gerçekleştirdiği HPLC analizinde, analiz süresi 40 dk'dır. Bileşenlerin daha küçük miktarlarını, bu sistemle 20 dk'da ayırabilmişlerdir (Nishitani.ve Sagesaka, 2004).

Benzer bir çalışmada, kahve, çay ve alkolsüz içeceklerdeki kafeinin HPLC ile tayinininde, öncelikle kafein kloroform kullanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile izole edildi. Ardından katı faz ekstraksiyonu (SPE) ile saflaştırıldı ve toluen ve petrol eteri ile yeniden kristallendirildi. Kafeinin saflığı, erime sıcaklığını tespit ettikten sonra, TLC, FTIR, HPLC ve UV-visible spektrofotometre ile karakterize edildi. 50 mM dihidrojen fosfat (pH=2), asetonitril ve metanol (40:8:2) karışımı mobil faz olarak kullanıldı, akış hızı 0.5 mL/dk'ya ayarlandı ve UV dedektörü ile 254 nm'de kromatogramlar elde edildi (Mumin vd., 2006).

2.2.10.3. Kapiler elektroforez ile tayin

Kafein tayininde test edilen diğer bir teknik, kapiler elektroforezdir. Bu metod çok yüksek ayırma verimliliği sağlamasına rağmen, henüz geniş bir kullanım alanına sahip değildir.

İçeceklerdeki kafeinin kapiler elektroforez ile kantitatif tayini amacıyla yapılan çalışmada, örnek hazırlığı, analizden önce filtrasyon ve ardından su ile seyreltme gerektirdi. Tayin 280 nm'de gerçekleştirildi ve sonuçlar HPLC verileri ile karşılaştırıldı (Hurst vd., 1993).

2.2.10.4. FTIR ile tayin

Çay yaprak örneklerinde kafeinin FTIR (Fourier Transform İnfrared Spectrometry) ile tayini için, bir prosedür geliştirilmiştir. Bu metod, amonyak ve kloroform ile ekstraksiyon ve 1658.5 cm^{-1} 'de kloroform ekstraktındaki kafeinin direk tayinine dayanır. Bir örneği bu metodla analiz etmek 15 dk zaman alır (Ohnsmann vd., 2002).

2.2.10.5. Kafeinin biyosensör esashı tayini

Kahvedeki kafeinin tayini için yeni bir biyosensör geliştirmek amacıyla, bir pH elektrot kullanılmıştır. Kafein biyosensörünün ölçüm metodu, adenosin 3',5'-siklik monofosfat (c-AMP)'ın, protein aktivatörü (kalmodulin) ve Ca^{+2} varlığında, fosfodiesteraz 3',5'-siklik nükleotid (CPDE)'in etkisiyle adenosin 5'-monofosfat (AMP) ve H_3O^+ iyonuna hidrolizine dayanır. Bu reaksiyon kafein tarafından inhibe edildiğinde, H_3O^+ üretimi potansiyometrik pH probu ile gözlenir. H_3O^+ üretimi, kafein konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Geliştirilen biyosensörün kafein tayin limiti 0.6 mg/mL , cevap zamanı ise 2-4 dk idi (Pizzariello vd., 1999).

Çözeltilerdeki kafeinin tayini için, amperometrik bir biyosensör geliştirilmiştir. Bunun için kafeini yıkabilen bir mikroorganizmadan (*Pseudomonas alcaligenes*) yararlanılmıştır. Mikroorganizma hücreleri kovalent çapraz bağlama metod ile selofan membran üzerine immobilize edilmiştir. Mikroorganizma enziminin kafeini parçalaması sonucu tüketilen çözünmüş O_2 miktarı tespit edilmiştir. Mikroorganizma aracılığıyla dönüştürülen kafein miktarı ile tüketilen O_2 miktarı arasında stokiyometrik bir ilişki vardır. Bu bağıntıdan yararlanılarak biyosensör sistemi ile, çözeltilerdeki $0.1\text{-}1\text{ mg/mL}$ konsantrasyon aralığındaki kafein tayin edilebilir (Sarath Babu vd., 2006).

Bir diğer çalışmada, kafein tayini için alkalen fosfataz (ALP) enziminin inhibisyonuna dayalı bir biyosensör geliştirilmiştir. Tayin metodu, kafeinin ALP enzimini yarışmalı olarak inhibe etmesine dayanır. Ölçümün prensibi ise kafein varlığı ve yokluğunda ALP tarafından katalizlenen enzimatik reaksiyondaki biyosensör cevaplarının farkının tayinidir. Biyosensör cevapları arasındaki farklılıklar, reaksiyon

ortamına eklenen kafein konsantrasyonu ile orantılıdır. Kafein konsantrasyonu, biyosensör kullanılarak 0.1-10 μM arasında tam olarak tayin edilebilir (Akyılmaz ve Türemiş, 2010).

2.3. Biyosensörler

2.3.1. Biyosensörlere genel bakış

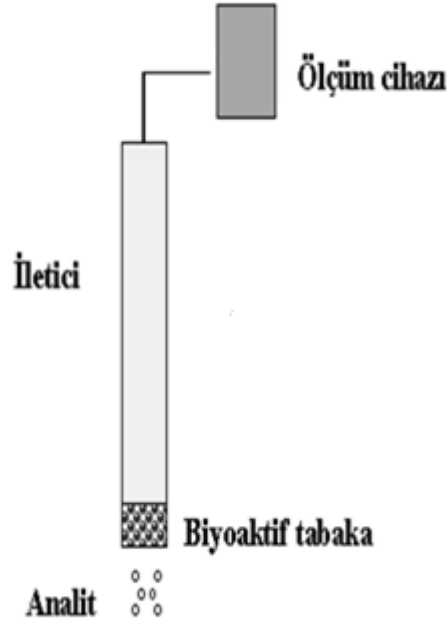
Canlılar teknolojilerin hayal bile edemeyeceği duyarlılık performansı gösterirler. Örneğin; bazı köpeklerin koku almaları insanlardan 100.000 kat daha duyarlıdır. Yılan balıkları, tonlarca su içerisine ilave edilen birkaç damla yabancı maddeyi derhal algırlar. Kelebekler eşlerinin yaydığı birkaç molekül bile hissederler. Algiler ise zehirli maddelere karşı çok duyarlıdırlar. Canlılara bu uyarıları algılamayı mümkün kılan biyolojik maddelerin, analiz sistemleri ile birleştirilmesi biyosensörlerin temelini oluşturur.

Biyosensörlerin tarihi, 50'li yılların ortalarında L.C. Clark'ın Cincinnati Hastanesi'nde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın O_2 miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlar. 1962 yılında Clark ve Lyons, Glukozoksidaz (GOD) enzimini O_2 elektrodu ile kombine ederek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başardılar. Böylece yeni bir analitik sistem oluşmuştur. Bu sistem bir yandan biyolojik sistemin yüksek spesifikliğini (enzim), diğer taraftan ise fiziksel sistemin (elektrot) tayin duyarlılığını birleştirmiş ve geniş spektrumlu bir uygulama olanağı bulmuştur.

Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanabilirken, sisteme biyomateryalin de katılması ile diğer birçok organik ve biyolojik maddenin tayini mümkündür. Böylece hazırlanan analiz sistemlerine “Biyosensörler” adı verilir (Telefoncu, 1999a).

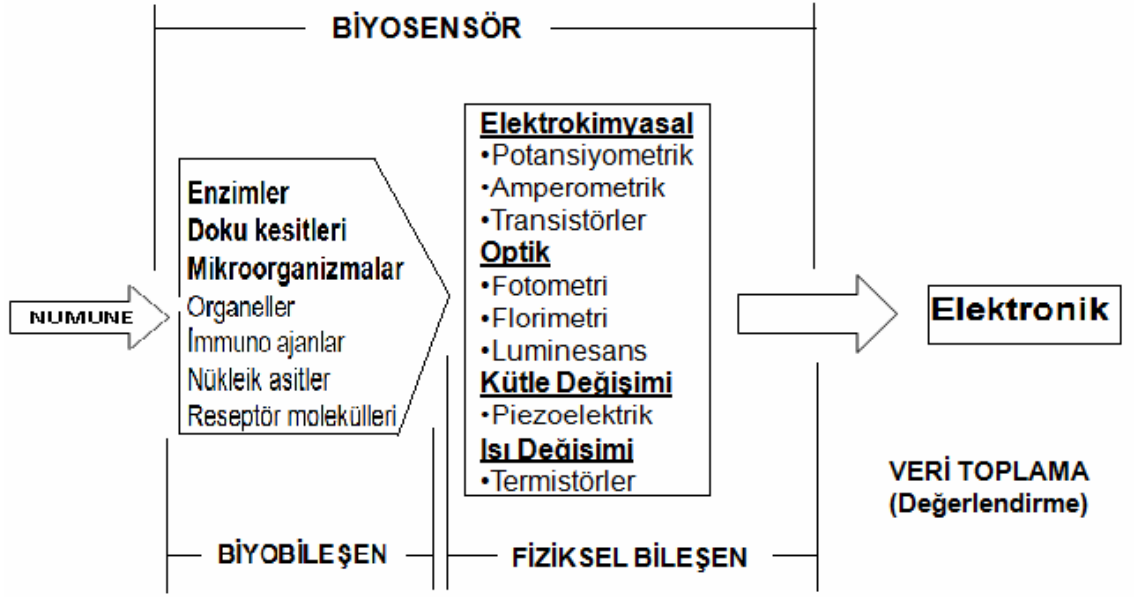
2.3.2. Biyosensörler ve bileşenleri

Biyosensörler, birbiri içine geçmiş biri biyokimyasal diğeri elektrokimyasal özellikteki iki çeviriciden oluşmaktadır. Biyokimyasal kısmın görevi, analizlenecek maddeyle etkileşerek onu tanımadır. Biyosensörün ikinci kısmı olan elektrokimyasal kısım ise bu tanıma olayını, okunabilir (ölçülebilir) bir sayısal değere çevirmekle görevlidir. (Coulet, 1991, Turner, 1987) Yani; bir biyosensörün görevi, biyolojik bir olayın elektriksel sinyale dönüştürülmesidir. Biyosensörlerin şematik gösterimi Şekil 2.9.'daki gibidir.



Şekil 2.9. Biyosensörlerin şematik gösterimi (Telefoncu, 1999)

Biyosensör sistemlerini oluşturan biyolojik bileşenler “reseptör”, fiziksel bileşenler “transduser” olarak adlandırılır. Bu bileşenler Şekil 2.10.’da verilmiştir.



Şekil 2.10. Biyosensörlerin bileşenleri (Telefoncu, 1999)

2.3.2.1. Biyolojik bileşenler (reseptör)

Biyosensörlerin yapısında görev alan biyolojik bileşenler “biyoreseptör” olarak da adlandırılırlar. Biyoreseptörler analizlenecek maddeyi dönüşüme uğrattır ve bu dönüşüme eşlik eden değişimler transduser tarafından algılanır.

Yüksek spesifikliklerinden dolayı enzimler en yaygın kullanılan biyoreseptörlerdir. Uygun bir enzimin bulunamaması veya enzimin kararsız olması ve birden çok maddenin tayini durumunda hücre sistemleri veya mikroorganizmalar kullanılır. Bunların yanı sıra organeller ve nükleik asitler de biyobileşen olarak kullanılmaktadır (Telefoncu, 1999a).

2.3.2.2. Fiziksel bileşenler (transduser)

Transduserler, reseptörlerin biyolojik reaksiyonunu, ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler. Bir biyosensör sisteminde kullanılacak olan fiziksel bileşen, biyokimyasal reaksiyon sonunda oluşan değişimin türüne göre seçilir. Amperometrik ve potansiyometrik ölçümlerde elektrotlar kullanılır. Örneğin; O₂ elektrodunda çözünmüş

oksijen, pH elektrodunda H^+ iyonu belirlenir. Termal biyosensörlerde enerji değişimleri, piezoelektrik sensörlerde kristalin salınım rezonansının kütle yüklenimi nedeniyle değişimi, optik sensörlerde de ışık, temel alınmaktadır (Telefoncu,1999a).

Bu yüksek lisans tezinde bitki dokusu temelli, amperometrik bir biyosensör hazırlanmıştır. Amperometri genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümü esasına dayanır. Söz konusu akım yoğunluğu çalışma elektrodunda yükseltgenen ya da indirgenen elektroaktif türlerin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak tanımlanır. İkinci elektrot referans elektrodu olarak iş görür (Ag/AgCl el.). Kalibrasyondan sonra akım yoğunluklarından, ilgili türlerin konsantrasyonlarının belirlenmesinde yararlanılır. Üçüncü elektrot, Pt karşıt elektrottur (Yıldız, 1999, Killard ve Smith, 2000).

2.3.3. Biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörleri çalışma prensiplerine göre, biyoaffinite sensörleri ve biyokatalitik sensörler olmak üzere iki grupta incelemek mümkündür.

Biyoaffinite sensörleri; boyalar, lektinler, antikorlar veya hormon reseptörleri matrikse bağlı olarak enzimler, antijenler, hormonlar ve glikoproteinlerin moleküler tanımlanmaları amacıyla kullanılır. Bağlanma sonucunda, tabaka kalınlığı, kırınım indisi, ışık emilmesi ve elektriksel yük gibi fizikokimyasal parametrelerin değişimine neden olurlar. Bu değişimler optik sensörler, potansiyometrik elektrotlar veya transistörler ile tespit edilirler.

Biyokatalitik sensörlerde ise; enzimler, organeller, doku kesitleri veya mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen moleküler değişimlere, analitlerin kimyasal dönüşümü eşlik eder. Biyoaffinite ve biyokatalitik sensörler Tablo 2.2' de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Biyosensörlerin sınıflandırılması

BİYOAFFİNİTE SENSÖRLER		BİYOKATALİTİK SENSÖRLER	
RESEPTÖR	ANALİT	RESEPTÖR	ANALİT
Enzim	Substrat, İnhibitör	Enzim	Substrat
Apoenzim	Prostetik grup	Mikroorganizma	Kofaktör
Antikor	Antigen	Organel	Aktivatör
Reseptör	Hormon	Doku kesiti	İnhibitör
Lektin	Glikoproteinler Sakkaritler Protein		Enzim

Biyosensörler biyolojik bileşenin türüne göre, doku sensörleri, enzim sensörleri, mikrobiyal sensörler, DNA sensörleri ve immünosensörler olarak gruplandırılırlar.

2.3.3.1. Enzim biyosensörleri

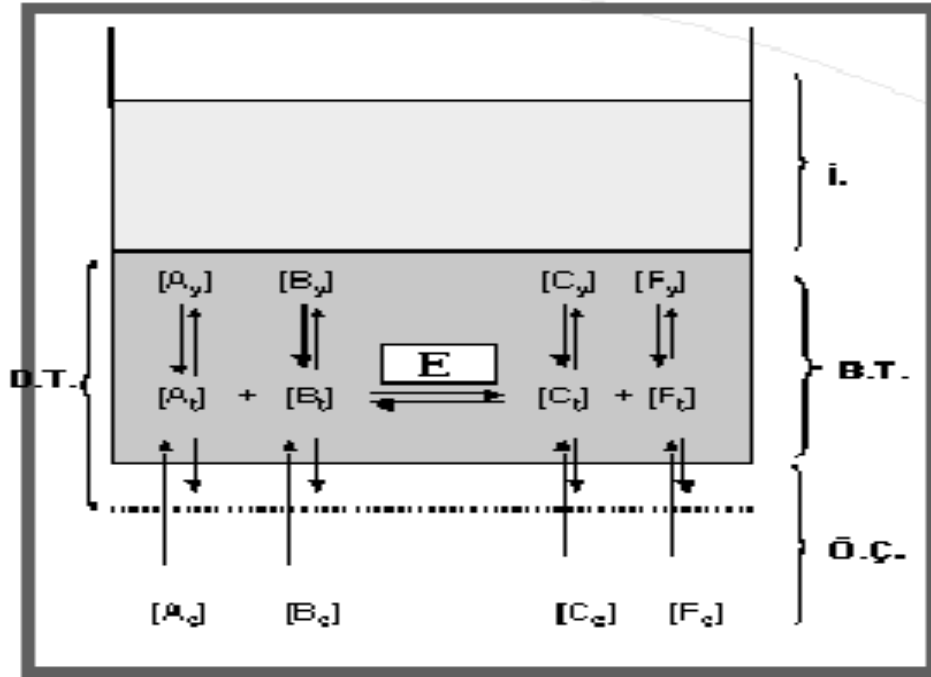
Biyosensör teknolojisinin tarihsel geçmişine bakıldığında bu alandaki ilk çalışmaların enzim sensörleriyle başladığı görülmektedir. 1962’de Clark ve Lyons ve 1967’de Updike ve Hick tarafından rapor edilen glukoz tayinine yönelik “glukoz oksidaz enzim elektrodları” bu konudaki ilk örnekleri oluşturmaktadır (Clark, 1962, Updike ve Hicks, 1967) .

Temel bilimlerdeki ilerlemelerin doğal bir sonucu olarak farklı biyolojik materyallerin ve iletim sistemlerinin kombinasyonuyla çok çeşitli biyosensörler geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam edilmektedir. Hangi temel iletim sistemi söz konusu olursa olsun, pratik ve ticari uygulamalarda enzim elektrotlarının büyük bir üstünlüğü göze çarpmaktadır. Bunun nedeni, canlı sistemlerle ilgili hemen hemen her türlü maddenin doğrudan veya dolaylı olarak analizinde kullanılabilecek binlerce enzimin varlığıdır. Bilinen enzimlerin yanı sıra bilinmeyenlerin potansiyel varlığı, piyasada yüzlerce ticari enzim preparatının bulunabilirliği ve bu sayının her geçen gün

yükselmesi enzim sensörlerinin tartışılmaz üstünlüğünün devam edeceğinin bir göstergesidir (Telefoncu, 1999).

Bir enzim elektrodunda, enzimi içeren biyoaktif tabaka, enzimin katalizlediği reaksiyona uygun bir iletim ve ölçüm sisteminin uzantısı olan bir ileticiyle birleştirilmektedir. İletim sistemi biyoaktif tabakada gerçekleşen enzimatik reaksiyon sonucu substrat, kosubstrat (veya koenzim) konsantrasyonundaki azalış ya da ürün konsantrasyonundaki artışı tespit edebilecek şekilde seçilebilir. Konsantrasyonların hızlı bir şekilde dengeye ulaşabilmesi için difüzyon engelini en aza indirmek amacıyla biyoaktif tabaka kalınlığının mümkün olduğunca ince olması gerekmektedir. Bunun yanı sıra biyoaktif tabakada sabit bir substrat konsantrasyonu sağlayabilmek için ölçüm çözeltisinin yeterli bir şekilde karıştırılması gerekmektedir (Dinçkaya, 1999).

Şekil 2.11.'de bir enzim sensörünün genel çalışma ilkesi, biyoaktif tabakasında gerçekleşen olaylar açısından özetlenmiştir.



A : Substrat **B** : Kosubstrat veya koenzim **C ve F** : Ürünler **ç** : Ölçüm çözeltisi içindeki konsantrasyon **B.T** : Biyoaktif tabakadaki konsantrasyon **y** : Elektrot yüzeyindeki konsantrasyon **D.T** : Difüzyon tabakası **B.T** : Biyoaktif tabaka **i** : İletici

Şekil 2.11. Enzim biyosensörünün çalışma ilkesi (Telefoncu, 1999)

2.3.3.2. Doku biyosensörleri

İlk defa 1981 yılında bitki dokusu temelli elektrot hazırlanmasından itibaren, birçok bitki dokusu temelli biyosensör geliştirilmiştir. Bitkisel doku materyalleri kullanılarak oluşturulan biyosensörler, izole enzimlerle oluşturulan biyosensörlere bir alternatiftir (Sidwell ve Rechnitz, 1986). Hayvansal ve bitkisel dokuların ve organellerin bazı enzimlerce oldukça zengin olduğu bilinmektedir. İşte bu enzimlerin izole edilmiş preparatları yerine, doğrudan yoğun bulundukları dokular biyosensör hazırlanmasında kullanılır (Telefoncu, 1999).

Doku biyosensörlerinde enzimin saflaştırılması gerekliliği ortadan kalkar, ayrıca bu biyosensörler bazı enzimler için doğal ortamda artan kararlılık ve düşük maliyet gibi avantajlara sahiptirler (Macholan, 1987).

Doku kesitleri kullanıldığında biyosensörün cevap süresi genellikle uzundur. Bu süreyi kısaltmak için direkt doku kesiti yerine, doku ezilerek veya iyice homojenize edilerek hazırlanır. Böylece difüzyon problemi de azaltılmış olur (Telefoncu, 1999).

2.3.3.3. Mikrobiyal biyosensörler

Bugün *E. coli* hücresinde bile 3000'den fazla enzimin bulunduğu düşünülürse, gelişmiş hücrelerdeki enzim sayısının çok fazla olacağı açıktır. Saf enzimlerle gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonları, bu enzimi içeren hücre ile de gerçekleştirilebilir. Bunun için ana koşul, hedeflenen biyotransformasyon reaksiyonunun, hücrenin içerdiği diğer enzimler tarafından etkilenmemesidir.

Mikrobiyal sensörlerinin, enzimlerin doğal ortamlarında bulunmaları nedeniyle dış etkilere karşı dayanıklı olması, enzim elektrotlarına kıyasla daha uzun ömürlü olmaları, enzim izolasyonu ve saflaştırılması gibi yorucu ve masraflı işlemlere ihtiyaç duyulmaması gibi avantajlarının yanı sıra, hücre birçok enzim içerdiğinden hedeflenen tayin reaksiyonunun diğer enzimlerden etkilenmesi, hücre membranının yol açtığı difüzyon problemleri gibi dezavantajları da mevcuttur.

Mikrobiyal sensörlerin bir çok uygulama alanı vardır ama en yaygın olarak gıda ve çevre analizlerinde kullanılırlar (Telefoncu, 1999).

2.3.3.4. DNA biyosensörleri

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

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

2.3.3.5. İmmünosensörler

Biyokimyada 10^{-4} M veya daha yüksek derişimlerin ölçümün esas alan analitik yöntemler yanında, 10^{-9} M veya daha düşük derişimlerdeki ilaç, hormon gibi maddelerin tayini ile de karşılaşılır. Bu düşük derişimlerde sadece duyarlı değil aynı zamanda yüksek seçimliliğe sahip yöntemlerin kullanılması zorunludur. Çünkü eser miktarda girişim yapan madde önemli yanılgılara götürür. İmmünolojik tekniklerin kullanılması bu gibi durumlarda önemli avantajlar sağlar. Yüksek seçimlilikte antijen-antibadi reaksiyonlarının duyarlı dedektörlerle kombinasyonu immünosensörleri oluşturur (Uslan, 1999).

2.3.4. Biyosensörlerin performansını etkileyen faktörler

Seçimlilik

Seçimlilik diğer analiz sistemleriyle kıyaslandığında, biyosensörlerin varlık nedenlerinin en ön sıralarında yer almaktadır. Bir biyosensörün seçimliliği üzerinde başlıca, sensörle girişimler, biyokatalizörle girişimler ve pH etkili olmaktadır. Tayin aralığının da seçimlilik üzerinde bir etkisi vardır. Örneğin; bir reaksiyon ortamında analizlenecek hedef maddenin yanında girişim yapabilecek bir başka maddenin varolması durumunda, hedef maddeye ilişkin tayin aralığı büyük önem taşır. Oldukça düşük konsantrasyonlara inebilen bir tayin aralığında, örnekteki hedef maddenin önemli ölçüde seyreltilerek tayinine olanak varsa, girişim yapacak maddenin konsantrasyonunun bu işlemler sonucunda tayin sınırları dışına çıkarılması mümkündür. Bu durum seçimliliğe önemli bir katkı sağlar.

Biyosensör Ömrü

Biyosensörlerin ömrü, onların saklama ve çalışma koşulları açısından başlıca iki durumda incelenir. Doğal olarak kullanılmadan ideal koşullarda saklandığındaki ömrü ile sürekli çalışma koşullarındaki ömrü farklı olacaktır. Bu nedenle, hazırlanan bir biyosensör ile rutin uygulamalara geçmeden önce, operasyonel ve depolama kararlılıklarının spesifik olarak belirlenmesi gerekir. Biyosensör ömrünü etkileyen en önemli faktör, biyolojik bileşenin aktivitesindeki azalmadır.

Tekrarlanabilirlik

Biyosensörlerle yapılan çalışmalarda tekrarlanabilirlik parametresi mutlaka incelenmelidir. Tekrarlanabilirlik denemelerinin en basiti, aynı koşullarda, aynı substrat ile arka arkaya ölçümler almaktır. Elde edilen değerlerden standart sapma ve korelasyon katsayıları hesaplanır. Tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa biyosensör uygulamalarının da o denli iyi olduğundan söz edilebilir.

Kararlılık

Bir biyosensörün kararlı olması, onun pratik kullanılabilirliğinin bir göstergesidir. Kararlılık, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır. Ayrıca pH, ısı, nem, ortam, O₂ derişimi gibi faktörlerden de etkilenmektedir.

Tayin Aralğı ve Tayin Sınırı

Kalibrasyon grafiğinde, substrat konsantrasyonu ile sensör cevabı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğı konsantrasyon aralğına “doğrusal aralık” denir. Bu doğrusal grafiğin en alt sınırı “tayin sınırı” olarak tanımlanır. Tayin sınırının belirli bir derişim değerin altında olması istenir. Belirtilen bu sınır, elektrot yüzeyinin büyüklüğü, biyolojik materyalin tayin edilecek maddeye affinitesi, immobilize edilen madde miktarı gibi faktörlerden etkilenir (Dinçkaya, 1999).

Cevap Zamanı

Biyosensörlerin büyük bir hızla yaygınlaşmasının en önemli nedenlerinden biri, pratik bir işlemle kısa sürede sonuç alınabilmesidir. Cevap zamanı ile kastedilen, biyosensörün, analizlenecek maddenin reaksiyon ortamına giriş yaptığı andan itibaren ölçüm düzeneğinden sonucun okunduğı ana kadar geçen zamandır. Biyosensörün cevap zamanını etkileyen başlıca unsurlar, çözeltinin karıştırma hızı, substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, optimum pH ve sıcaklıktır (Kaufmann, 1992).

Biyosensörler için cevap zamanı genel olarak birkaç saniye ile birkaç dakika arasında değışir. 10 dakika gibi bir süre, oldukça uzun kabul edilebilir (Eggins, 1996).

Maliyet

Maliyet genelde, biyosensörün hazırlık giderleri ile biyosensörle yapılan bir analizin giderlerinin bileşkesini ifade eder. Doğal olarak, biyosensörün operasyonel kararlılığı maliyeti önemli ölçüde etkileyecektir. Çünkü; aynı sensör ile ne kadar çok analiz yapılabiliyorsa, sonuçta hazırlık giderlerinden analiz başına düşen pay o kadar azalacaktır (Dinçkaya, 1999).

2.3.5. Biyolojik bileşenlerin immobilizasyonu

Bir biyosensör oluşturmak için uygun biyolojik ve fiziksel bileşen seçildikten sonra, bunların birbirine bağlanması işlemine biyolojik bileşen immobilizasyonu denir. Bağlanma işleminde çok değişik yöntemler kullanılabilir. Hangi yöntemin kullanılacağı, seçilen biyolojik ve fiziksel bileşene göre belirlenir.

İmmobilizasyon, biyobileşenin kararlılığı ve tekrar kullanımı açısından büyük avantaj sağlar. Biyobileşen immobilizasyonunda başlıca beş yöntem kullanılmaktadır.

Adsorbsiyon

İmmobilizasyonda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Genelde, biyobileşenin bulunduğu çözeltiye, yüzeyi membran veya film ile kaplanmış fiziksel bileşen daldırılır ve belirli bir süre beklenir. Biyolojik bileşen hidrofilik, hidrofobik ya da iyonik etkileşim ile yüzeyde tutulur. En çok kullanılan adsorbanlar; selüloz asetat membranları, polistren, polivinil klorür ve silikadır. Sorpsiyon tersinir bir olay olduğundan adsorbsiyon ile immobilizasyon güvenilir bir yöntem değildir ama yine de biyosensörlerde başarılı uygulamaları vardır (Deng ve Enke, 1980, Aizawa vd., 1994).

Tutuklama

Biyobileşenin polimer jel matrikslerde hapsedildiği immobilizasyon yöntemidir. Biyomolekülü içeren çözelti içinde polimerik jel hazırlandığı zaman, jelin donmasıyla biyomolekül jel matriks içinde tutuklanmış olur. Biyosensörlerde bu amaçla; poliakrilamid, nişasta, naylon ve siliastik jel kullanılabilir.

Çapraz bağlama

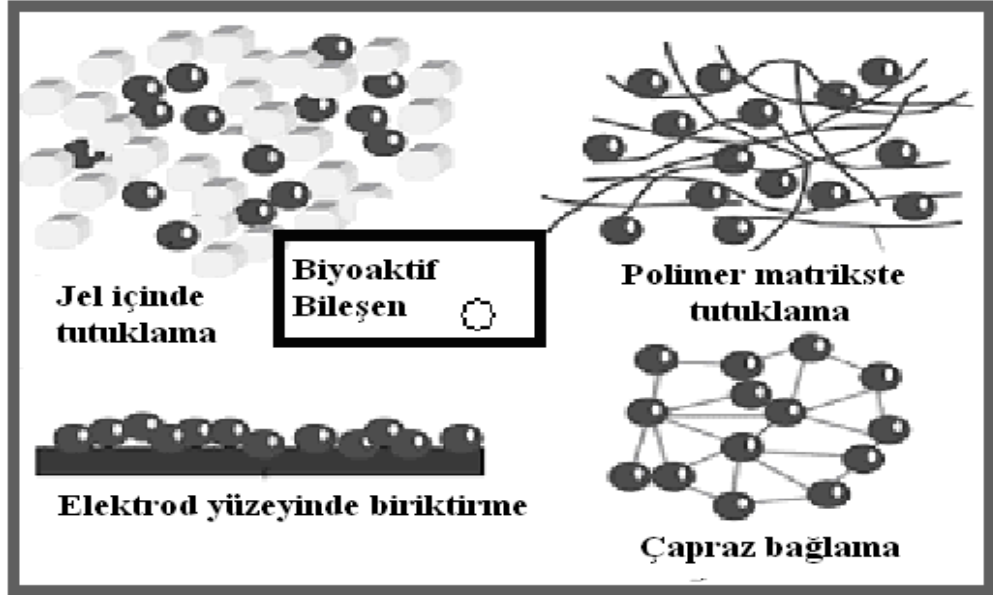
Bu yöntem biyosensör hazırlanmasında, daha çok tutuklama ve kovalent bağlama yöntemlerinin kombinasyonu şeklinde kullanılır. Çapraz bağlayıcı reaktif olarak glutaraldehit, heksametilen, di-izosiyanat, diflorodinitrobenzen sıkça kullanılır. Bu reaktifler, katı desteklere biyomolekülleri bağlayabilirler. Bu nedenle de çapraz bağlama biyosensörlerde sık kullanılan immobilizasyon yöntemlerinden biridir.

Kovalent bağlama

Bu immobilizasyon türünde biyobileşen, doğrudan fiziksel bileşene ya da fiziksel bileşenin uygun bir film veya tabaka ile kaplanmış formuna kimyasal bir reaksiyon sonucu kovalent olarak bağlanır. Genellikle proteinlerin aminoasit yan zincirlerinde bulunan amino, karboksil, imidazol, tiyol, hidroksil gibi nükleofilik fonksiyonel gruplarla kovalent bağlama yapılır (Sharma vd., 2003). Bu yöntemin riski kovalent bağlanmaya bazı durumlarda aktif bölge gruplarının katılmasıdır.

Biyolojik bağlama

Biyolojik bileşenin film veya tabakaya biyokimyasal bağlama ile tutturulmasıdır.



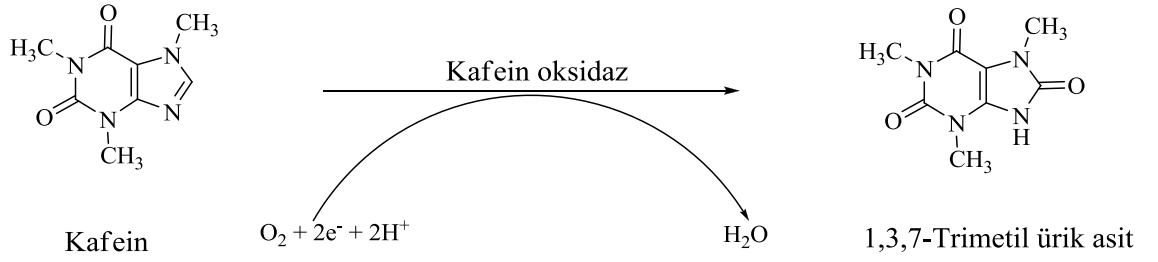
Şekil 2.12. Biyosensörlerde biyobileşen immobilizasyonunda kullanılan yöntemler

(sci.ege.edu.tr/~eubio/yaz_okulu/biyosensor.htm)

2.3.6. Kafein oksidaz enzimi

Kafein oksidaz, oksidoredüktazlar sınıfına ait, enzim kodu 1.17.5.- olan bir enzimdir. Kahve, çay, mate ve guarana gibi kafein içeren bazı bitkilerde ve *Rhodococcus* ve *Klebsiella* gibi bazı mikroorganizmalarda kafein metabolizmasının var olduğu, kafein oksidazın çeşitli dönüşümleri katalizlediği yönünde çalışmalar mevcuttur

(Mazzefera, 2004). Ancak bitkilerdeki metabolizmanın ayrıntıları henüz kesinlik kazanmamıştır. Kesin olan bilgi, kafein oksidazın kafeinin 1,3,7-trimetil ürik aside dönüşüm reaksiyonunu katalizlediğidir. Şekil 2.13.'den görüldüğü gibi kafein oksidaz, substratlarının CH-OH ve CH ya da CH₂ grupları üzerinde rol oynar (Madyastha vd., 1999).



Şekil 2.13. Kafein oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon

2.3.7. Kafein biyosensöründe kullanılan biyobileşenler

Bakla

Anayurdu Avrupa ve Asya kıtaları olan baklanın, 5000 yıl kadar önceleri Çin’de yetiştirildiği eski metinlerde görülmektedir. Ülkemizde de bol bol yetiştirilen ve tüketilen bakla, 60-100 cm boylanabilen 1 yıllık otsu bir bitkidir. Toprakta bir metre kadar derine inebilen güçlü bir kök yapısı ile dört köşe kesitli içi boş bir gövdesi vardır. Yan kökleri kuvvetli bir şekilde etrafa yayılır ve üzerinde yumrular meydana gelir. Tüysüz olan sapı bir metre kadar yükselebilir. Sap üzerinde sarmalı durumda yaprakları vardır. Çiçekleri yaprak altlarından çıkar. Çiçeklerin kendine has ve hoş bir kokusu vardır. Meyvesi, tohum araları bölmeli ve dolgun bir kapçıktır. Kapçık taze iken yeşildir, olgunlaşınca esmerleşir ve sertleşir. Besin olarak kullanılan baklanın Sakız baklası, Sultani bakla, Bayrampaşa baklası gibi çeşitleri vardır ve ülkemizin hemen her yerinde yetişir (www.nedir.cc/bitkiler/bakla).

100 g baklanın içerdği besin değerleri şöyledir: 45 kalori; 5 g protein; 6 g karbonhidrat; 0 kolesterol; 3 g yağ; 1,5 g lif; 22 mg fosfor; 20 mg kalsiyum; 4 mg demir; 85 mg sodyum; 110 mg potasyum; 150 IU A vitamini; 0.04 mg B1 vitamini; 0.03 mg B2 vitamini ve 4 mg C vitamini. Bakla, baklagillerdeki tüm sebzeler gibi içerdği antioksidan etkili fenolik bileşikler nedeniyle kansere yakalanma riskini azaltır. İnsanlarda kötü kolesterol düzeyini düşürür. Bakla içerdği insülinle kan şekerini düzene sokar. Şekil 2.14.'de taze bakla bitkisi görülmektedir (www.sagliksayfam.com/besinler-ve-ozellikleri/bakla).



Şekil 2.14. Taze bakla bitkisi (*Vicia faba*) (www.kiriktabak.com)

Jelatin

Kollajenin hidrolizi ile elde edilen bir proteindir ve karakteristik olarak yapısında glisin, prolin ve hidroksiprolin aminoasitlerini içerir. Bu aminoasitler jelatinin üçlü heliks bir yapı oluşturmada ve jelleşme özelliği kazanmasında oldukça etkilidir. Jelatin oda sıcaklığında katıdır, tamponda çözünüp ısıtıldıktan sonra oda sıcaklığına getirildiğinde jöle kıvamını alır. Bu özelliğinden dolayı iyi ve kolay kullanılabilir bir immobilizasyon materyalidir (Rose vd., 1987).

Ucuz ve kolay bulunabilir olmasının yanında, immobilizasyon materyali olarak kullanılan diğer polisakkaritlerin aksine jel oluşumu için herhangi bir moleküle, iyon, tuza ya da pH ayarlamasına gerek duymaması, jelatinin enzim, hücre ve doku

immobilizasyonunda tercih edilmesini sağlar. Biyosensör çalışmalarında, termal ve mekanik kararlılığın artırılması amacıyla immobilizasyonda çoğunlukla çapraz bağlayıcı bir reaktif olan glutaraldehit ile birlikte kullanılır (Scardi, 1987, Esposito vd., 1995).

Glutaraldehit

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

Biyosensör geliştirilmesinde kullanılan enzim, hücre, doku vb. biyobileşenlerin, jelatin, kollajen, kitosan gibi biyolojik moleküllerle birlikte glutaraldehit ile çapraz bağlar oluşturması esasına dayalı immobilizasyon yöntemi çok sık kullanılmaktadır (Guilbault ve Kauffmann, 1987; Scouten vd., 1995). Yöntem kolay uygulanabilir olmasının yanı sıra immobilize sistemin termal, operasyonel ve depo kararlılığını arttırması bakımından tercih edilir.

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Materyaller

Çalışmanın deneysel kısmında kullanılmış olan bitkisel materyaller, kimyasallar ve cihazlar kısa açıklamalarla aşağıda sıralanmıştır.

3.1.1. Bitkisel materyaller

Tez çalışmasında, biyosensörün biyobileşeni olarak kullanılmak üzere, kafein oksidaz aktivitesi olması muhtemel bazı bitkisel kaynaklar tarandı. Bitkisel materyallerden taze bakla (*Vicia faba*) ve taze fasulye (*Phaseolus vulgaris*) Lüleburgaz yerel pazarından, kahve çekirdeği (*Coffea arabica*) yerel marketlerden, çay yaprağı (*Folium theae nigrae*) ise Ordu ilinden temin edildi.

3.1.2. Kimyasallar

Denemelerde substrat olarak kullanılan kafein, teofilin, teobromin, ksantin, hipoksantin, kafeik asit, ürik asit ve biyoaktif tabakanın elektroda immobilizasyonu için kullanılan jelatin, Sigma Chemical Co. (Steinhein, Almanya) firmasından sağlandı. Çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan glutaraldehit ve tampon çözeltileri hazırlamada kullanılan, disodyum hidrojenfosfat, potasyum dihidrojenfosfat Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edildi.

3.1.3. Cihazlar

Nuve BM 302 dış sirkülasyonlu su banyosu

Eppendorf mikropipet takımı

Biosan MSH 300 manyetik karıştırıcı

Arçelik buzdolabı

WTW pH 330i pH metre

Precisa XB 220A hassas terazi

Shimadzu UV-1601 Visible UV Spektrofotometre

Elga Purelab Option-E 5/10 saf su cihazı

Palmsense potansiyostat

Camsı karbon çalışma elektrodu

Platin karşıt elektrot

Ag/AgCl referans elektrot

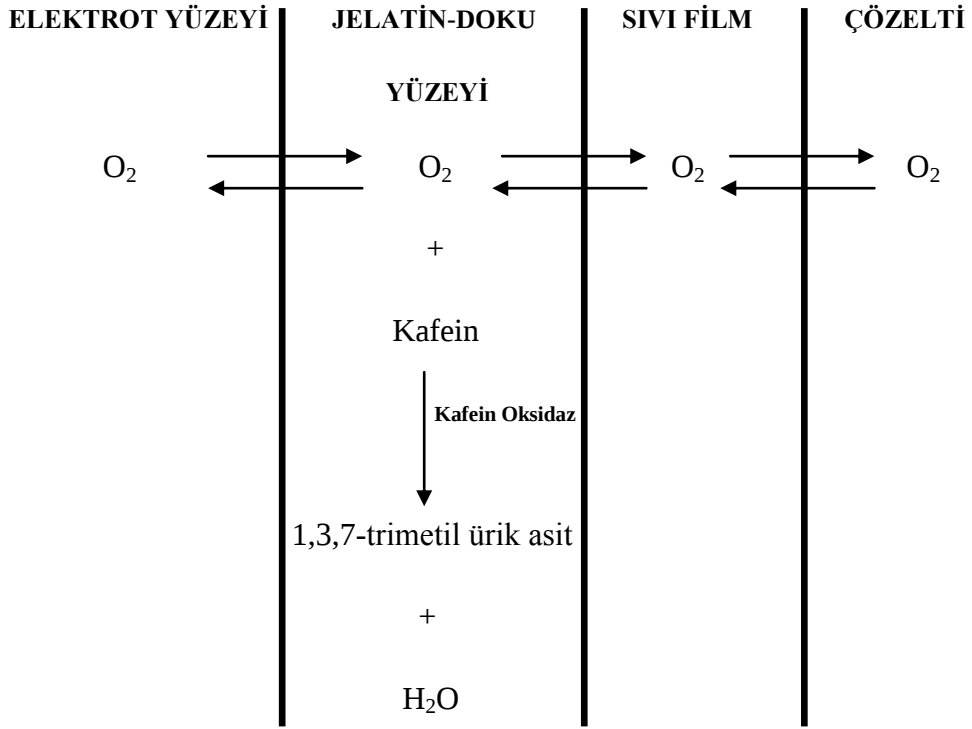
3.2. Metodlar

3.2.1. Biyosensörün çalışma ilkesi

Biyobileşen olarak kullanılan bitki dokusu, elektroda immobilize edilir. Reaksiyon ortamı substratsız olarak hazırlanır. Ortamda substrat yokken, biyobileşenin immobilize edildiği elektrot yüzeyine temas eden oksijen konsantrasyonu, devreden geçen akım şiddeti ile orantılıdır. Reaksiyon ortamına kafein substratı ilavesi yapıldığında, biyobileşenin içerdiği kafein oksidaz enzimi tarafından gerçekleştirilen enzimatik reaksiyon gereği, kafein substratı oksijen varlığında 1,3,7-trimetil ürik asite

yükseltgenirken, elektrot yüzeyindeki oksijen tüketilerek miktarı azalır ve buna bağlı olarak akım şiddeti değişir. İlave edilen kafein konsantrasyonu ile orantılı olarak devreden geçen akım şiddeti azalır ve kısa süre içinde yeniden dengeye gelir.

İlk ve ikinci denge durumu arasındaki akım şiddeti farkı, amperometrik olarak potansiyostat ile tespit edilir. Substrat konsantrasyonu arttıkça, jelatin-bitki dokusu yüzeyinde daha fazla oksijen harcanacak ve akım şiddetinde aynı oranda azalma meydana gelecektir. Şekil 3.1.'de biyosensör sisteminde meydana gelen reaksiyon zinciri gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Biyosensör sisteminde meydana gelen reaksiyon zinciri

3.2.2. Doku homojenatı biyosensörlerinin hazırlanması

Jelatin esaslı bitki dokusu temelli biyosensörlerin hazırlanması için kullanılan çalışma elektrodu camsı karbon elektrottur. Reaksiyon sonucu meydana gelen çözünmüş oksijen miktarındaki değişimler, sabit potansiyelde sistemden geçen akım

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

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

3.2.3. Kafein tayini için uygun dokunun belirlenmesi

Kafein tayinine yönelik geliştirilmek istenen biyosensör için seçilen bazı dokular, taze bakla, taze fasulye, çay yaprağı ve kahve çekirdeğı idi. Belirtilen bitkisel dokuların direkt homojenatları kullanılarak biyosensörler hazırlandı ve tamponlu reaksiyon ortamında ölçümler gerçekleştirildi.

3.2.3.1. Taze bakla dokusu biyosensörünün hazırlanması

Biyoaktif tabaka materyalinin hazırlanması için, 200 mg taze bakla dokusu 750 µL 50 mM pH 7.5 fosfat tamponu ile homojenize edildi. Bir flakona 10 mg jelatin tartıldı ve üzerine 300 µL doku homojenatı ilave edildi. İyiçe çalkalanarak 37.5°C'deki su banyosunda 15 dk bekletildi. Ardından bu karışımın 30 µL'si camsı karbon çalışma elektrodu üzerine yayıldı ve + 4 °C'de 30 dk boyunca bekletilerek katılaşması sağlandı. Sonra, hazırlanan biyosensör % 1'lik glutaraldehit çözeltisi (50 mM pH 7.5 fosfat tamponu ile hazırlanmış) içinde 5 dk boyunca çapraz bağlanmanın gerçekleşmesi için bekletildi. Daha sonra biyosensör saf su ile pek çok kez yıkanarak 30 dk boyunca çalışma sıcaklığındaki çalışma tamponunda bekletildi. Kullanıma hazır hale gelmiş olan biyosensör ile ölçümler alındı.

3.2.3.2. Taze fasulye dokusu biyosensörünün hazırlanması

Biyoaktif tabaka hazırlığı için, 200 mg taze fasulye dokusu 550 µL 50 mM pH 7.5 fosfat tamponu ile homojenize edildi. Bir flakona 10 mg jelatin tartıldı ve

üzerine 300 µL doku homojenatı ilave edildi. İyice çalkalanarak 37.5°C'deki su banyosunda 15 dk bekletildi. Ardından bu karışımın 30 µL'si camı karbon çalışma elektrodu üzerine yayıldı. + 4 °C'de 30 dk boyunca bekletilerek katılaşması sağlandı. Sonra, hazırlanan biyosensör % 1'lik glutaraldehit çözeltisi (50 mM pH 7.5 fosfat tamponu ile hazırlanmış) içinde 5 dk boyunca çapraz bağlanmanın gerçekleşmesi için bekletildi. Daha sonra biyosensör saf su ile pek çok kez yıkanarak 30 dk boyunca çalışma sıcaklığındaki çalışma tamponunda bekletildi.

3.2.3.3. Çay yaprağı dokusu biyosensörünün hazırlanması

Biyoaktif tabaka hazırlığı için, 200 mg çay yaprağı dokusu 1 mL 50 mM pH 7.5 fosfat tamponu ile homojenize edildi. Bir flakona 10 mg jelatin tartıldı ve üzerine 300 µL doku homojenatı ilave edildi. İyice çalkalanarak 37.5°C'deki su banyosunda 15 dk bekletildi. Ardından bu karışımın 30 µL'si camı karbon çalışma elektrodu üzerine yayıldı. + 4 °C'de 30 dk boyunca bekletilerek katılaşması sağlandı. Sonra, hazırlanan biyosensör % 1'lik glutaraldehit çözeltisi (50 mM pH 7.5 fosfat tamponu ile hazırlanmış) içinde 5 dk boyunca çapraz bağlanmanın gerçekleşmesi için bekletildi. Daha sonra biyosensör saf su ile pek çok kez yıkanarak 30 dk boyunca çalışma sıcaklığındaki çalışma tamponunda bekletildi.

3.2.3.4. Kahve çekirdeği dokusu biyosensörünün hazırlanması

Biyoaktif tabakanın hazırlanması için, öncelikle kahve çekirdekleri havanda dövülerek toz haline getirildi ve 150 µm'lik elekten geçirildi. Elek altında kalan 150 µm ve 150 µm'den küçük olan kahve çekirdeği tozları, biyosensör hazırlığında kullanıldı. Bundan sonraki aşamada, kahve tozunda bulunabilecek serbest kafeinin uzaklaştırılması, böylece tayin edilecek kafein ile karışmaması amacıyla iki yol izlendi. Birincisi kahve çekirdeği tozlarını suda bekletme, ikincisi tampon çözeltide bekletme idi.

a) Suda bekletilmiş kahve çekirdeği tozu ile biyosensör hazırlanması

Elekten geçirilmiş olan kahve çekirdeği tozlarından 0.15 g tartılarak üzerine 1.5 mL su eklendi ve bir gece oda sıcaklığında kafeinin suya geçmesi için bekletildi. Ardından 4500 rpm'de 10 dk süre ile ardarda 2 kez santrifüjlendi. Katı ve sıvı kısım birbirinden ayrıldı ve katı kısımdan 60 mg tartıldı. Üzerine 700 μ L 50 mM pH 7.5 fosfat tamponu eklenerek homojenize edildi. Bir flakona 10 mg jelatin tartıldı ve üzerine 300 μ L doku homojenatı ilave edildi. İyice çalkalanarak 37.5°C'deki su banyosunda 15 dk bekletildi. Ardından bu karışımın 30 μ L'si camsı karbon çalışma elektrodu üzerine yayıldı. + 4 °C'de 30 dk boyunca bekletilerek katılaşması sağlandı. Sonra, hazırlanan biyosensör % 1'lik glutaraldehit çözeltisi (50 mM pH 7.5 fosfat tamponu ile hazırlanmış) içinde 5 dk boyunca çapraz bağlanmanın gerçekleşmesi için bekletildi. Daha sonra biyosensör saf su ile pek çok kez yıkanarak 30 dk boyunca çalışma sıcaklığındaki çalışma tamponunda bekletildi.

b) Tamponda bekletilmiş kahve çekirdeği tozu ile biyosensör hazırlanması

Elekten geçirilmiş olan kahve çekirdeği tozlarından 0.15 g tartılarak üzerine 1.5 mL tampon çözelti (50 mM pH 7.5 fosfat tamponu) eklendi ve bir gece oda sıcaklığında kafeinin çözeltiye geçmesi için bekletildi. Ardından 4500 rpm'de 10 dk süre ile ardarda 2 kez santrifüjlendi. Katı ve sıvı kısım birbirinden ayrıldı ve katı kısımdan 60 mg tartıldı. Üzerine 700 μ L 50 mM pH 7.5 fosfat tamponu eklenerek homojenize edildi. Bir flakona 10 mg jelatin tartıldı ve üzerine 300 μ L doku homojenatı ilave edildi. İyice çalkalanarak 37.5°C'deki su banyosunda 15 dk bekletildi. Ardından bu karışımın 30 μ L'si camsı karbon çalışma elektrodu üzerine yayıldı. + 4 °C'de 30 dk boyunca bekletilerek katılaşması sağlandı. Sonra, hazırlanan biyosensör % 1'lik glutaraldehit çözeltisi (50 mM pH 7.5 fosfat tamponu ile hazırlanmış) içinde 5 dk boyunca çapraz bağlanmanın gerçekleşmesi için bekletildi. Daha sonra biyosensör saf su ile pek çok kez yıkanarak 30 dk boyunca çalışma sıcaklığındaki çalışma tamponunda bekletildi.

3.2.4. Doku homojenatı biyosensörü ve ölçüm ilkesi

Yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan biyosensör ilk ölçüm yapılmadan hemen önce, ayrı bir reaksiyon hücresi içerisinde biyoaktif tabaka bileşenlerinin adaptasyonunun sağlanması amacıyla, çalışma tamponu ve sabit sıcaklıkta 30 dk bekletildi. Daha sonra içinde çalışma tamponu bulunan, ölçümün yapılacağı reaksiyon hücresine, Ag/AgCl referans elektrot ve Pt karşıt elektrot ile birlikte yerleştirildi ve sabit bir karıştırma hızı ayarlandı. Ardından oksijen için indirgenme potansiyeli olan - 0.700 V potansiyel farkı uygulaması başlatıldı ve bu potansiyel farkı reaksiyon süresince sabit tutuldu. Sistem dengeye geldiğinde, ilgili programın yüklü olduğu bilgisayar programı yardımıyla sistemden geçen akım şiddeti kaydedildi ve ortama substrat ilavesi yapıldı. Kafein substratı reaksiyon ortamına ilave edildikten sonra, dokudaki kafein oksidaz enzimi kataliziyle oksitlenerek 1,3,7-trimetil ürik asite dönüştürüldü ve reaksiyon tamamlandığında sistem tekrar dengeye geldi. Sistemin denge konumundan uzaklaşıp tekrar dengeye gelmesi yaklaşık 7 dk aldı. Bu süre sonunda sistemden geçen akım şiddeti kaydedildi. Bu durumda okunan akım şiddeti değeri, susbtrat ilavesinden önce okunan değerden daha küçüktür. Çünkü elektrot yüzeyinde gerçekleşen enzimatik reaksiyonda, reaksiyon ortamındaki çözünmüş oksijen kullanılır ve kullanılan çözünmüş oksijen miktarı substrat miktarı ile orantılıdır. Azalan çözünmüş oksijen miktarı - 0.700 V potansiyelde devreden geçen akım şiddetini de azaltır.

Biyosensörün ölçüm ilkesi; çözünmüş oksijen miktarındaki azalmaya bağlı olarak akım şiddetindeki azalmanın ölçülmesi esasına dayanır. Deneysel çalışmalarda her iki denge durumu arasındaki akım farkı alındı ve substratın farklı konsantrasyonlarına karşı ölçülen akım şiddeti değerleri kullanılarak standart grafikler elde edildi.

Bitkisel temelli biyosensör ile yapılan ölçümlerde kullanılan düzenek Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Taze bakla dokusu biyosensörü ile yapılan ölçümlerde kullanılan düzenek

3.2.5. Biyosensörün biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonu

Biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonu çalışmasında, bitki dokusu biyosensöründen en iyi cevabın elde edilebileceği optimum koşulların belirlenmesi amacıyla, doku miktarı, jelatin miktarı ve glutaraldehit miktarının biyosensör cevabı üzerine etkileri araştırıldı. İmmobilizasyon parametrelerinden her birinin optimum miktarının belirlenmesi için, diğer parametreler sabit tutulup optimizasyonu yapılacak parametre değiştirilerek biyosensörler hazırlandı ve ölçümler alındı.

3.2.5.1. Doku miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Biyoaktif tabakadaki doku miktarının optimizasyonu için, 2.37 mg/cm^2 jelatin miktarı ve % 1 glutaraldehit oranı sabit tutularak, 15.43 mg/cm^2 , 20.59 mg/cm^2 ve 25.73 mg/cm^2 bitki dokusu içeren biyosensörler hazırlandı ve farklı miktardaki bitki dokularının biyosensör cevabı üzerine etkisi incelendi. Ölçümler 50 mM pH 7.5 fosfat tamponunda, 37.5°C sıcaklıkta gerçekleştirildi.

3.2.5.2. Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Geliştirilen biyosensör için en uygun doku miktarı 20.59 mg/cm^2 olarak belirlendikten sonra, biyoaktif tabakadaki jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla, 20.59 mg/cm^2 doku miktarı ve %1 glutaraldehit oranı sabit tutularak, 1.77 mg/cm^2 , 2.37 mg/cm^2 , 2.94 mg/cm^2 jelatin içeren biyosensörler hazırlandı ve jelatinin farklı miktarlarının biyosensör cevabı üzerine etkisi incelendi. Ölçümler 50 mM pH 7.5 fosfat tamponunda, $37.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirildi. Ölçümler sonucu elde edilen standart grafikler yardımıyla da en uygun jelatin miktarı tespit edildi.

3.2.5.3. Glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisi

Geliştirilen biyosensör için en uygun doku ve jelatin miktarı belirlendikten sonra, glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla, doku miktarı (20.59 mg/cm^2) ve jelatin miktarı (2.37 mg/cm^2) sabit tutularak % 0.5, % 1 ve % 2 oranında glutaraldehit kullanılarak denemeler gerçekleştirildi. 50 mM pH 7.5 fosfat tamponu ve $37.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirilen ölçümler sonucu elde edilen standart grafikler yardımıyla en uygun glutaraldehit yüzdesi belirlendi.

3.2.6. Biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyonu

Hazırlanan biyosensörün en iyi cevabı vereceği çalışma koşullarının belirlenmesi amacıyla, tampon pH'ı, tampon konsantrasyonu ve sıcaklığın biyosensör cevabı üzerine etkileri incelendi ve % biyosensör cevabına karşı grafikleri çizildi.

3.2.6.1. En uygun pH değerinin belirlenmesi

Bitki dokusu biyosensörünün optimum pH'nın belirlenmesi için, pH'ı 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 olan 50 mM fosfat tamponları ve pH'ı 9.0, 10.0 olan 50 mM glisin tamponları hazırlandı. Hazırlanan tampon çözeltiler kullanılarak yapılan denemelerde, pH'ı 5.0,

8.0, 9.0 ve 10.0 olan tampon sistemlerinde enzimin aktivite göstermediği gözlemlendi. Bu nedenle ikinci bir çalışma yapıldı. Bu çalışmada ise pH'ı 6.0, 6.3, 6.5, 6.7, 7.0, 7.3, 7.5 olan 50 mM sodyum fosfat tamponları kullanılarak en iyi biyosensör cevabının hangi pH değerlerinde elde edildiği belirlendi. Ölçümler 37.5°C'de ve 2.5 mM kafein konsantrasyonunda yapıldı. Farklı pH değerlerinde ölçüme geçilirken biyosensör, kullanılacak olan tampon içerisinde 20 dk bekletildi. Çalışma sonucunda tampon pH'ına karşı % biyosensör cevabı grafikleri çizildi.

3.2.6.2. En uygun tampon konsantrasyonunun belirlenmesi

En uygun tampon konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla, bir önceki çalışmada belirlenen optimum pH değerindeki, molar konsantrasyonu 50 mM, 100 mM ve 150 mM olan tampon sistemleri kullanılarak 37.5°C'de ölçümler gerçekleştirildi. Ölçümler sonucu elde edilen standart grafik yardımıyla en uygun tampon konsantrasyonu belirlendi.

3.2.6.3. Reaksiyon ortamının optimum sıcaklığının belirlenmesi

Geliştirilen biyosensör ile en iyi cevabın alınacağı optimum sıcaklığın belirlenmesi amacıyla, optimum pH ve optimum tampon konsantrasyonlarında, 25, 30, 35, 37.5, 40, 45, 50, 55 °C'de düşük sıcaklıktan yüksek sıcaklığa doğru ölçümler gerçekleştirildi. Denemelerde 2.5 mM kafein konsantrasyonu kullanıldı. Farklı sıcaklıklarda ölçüme geçilirken biyosensör, çalışılacak tampon içerisinde 20 dk bekletildi ve çalışma sonunda sıcaklık ve % biyosensör cevabı arasında grafik çizildi.

3.2.7. Biyosensörün karakterizasyonu

Bitki dokusu biyosensöründe kullanılmış olan biyobileşenlerin ve çalışma koşullarının optimizasyonları yapıldıktan sonra biyosensörün karakterizasyonu çalışmalarına geçildi.

3.2.7.1. Kafein tayin sınırlarının belirlenmesi

Tezin bu aşamasında, biyoaktif tabaka materyalleri ve çalışma koşullarının optimum değerlerine uygun olarak hazırlanan bitki dokusu biyosensörü ile farklı kafein konsantrasyonlarında ölçümler alınarak standart grafikler elde edildi ve lineer artışın gözlemlendiği konsantrasyon aralığı ölçüm aralığı olarak belirlendi.

3.2.7.2. Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği

Bitki dokusu biyosensöründen alınan cevapların güvenilirliği ve tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi amacıyla, 100 mM pH 6.5 fosfat tamponu içinde 37.5 °C’de 2.5 mM kafein içeren standart kullanılarak, arka arkaya ara vermeksizin aynı sensörle ölçümler yapıldı. Ölçümlere ilişkin standart sapmalar ve varyasyon katsayıları hesaplandı.

3.2.7.3. Biyosensörün işlem kararlılığı

Bu çalışmada, 100 mM pH 6.5 fosfat tamponu içinde 37.5 °C’de 2.5 mM kafein içeren standartlar kullanılarak aynı sensör ile 20 dk arayla 8 ölçüm alındı. Başlangıçta elde edilen biyosensör cevabı % 100 kabul edilerek tekrarlanan ölçümlerle aktivite incelendi ve aynı biyosensör ile aynı gün içinde kaç kez ölçüm alınabileceği saptandı.

3.2.7.4. Biyosensörün depo kararlılığı

Geliştirilen bitki dokusu biyosensörü ile aktivitesini kaybetmeden ne kadar süre ile ölçüm alınabileceğini belirlemek amacıyla, optimum koşullarda bir biyosensör hazırlandı. Aynı biyosensör ile hazırlandığı ilk günden itibaren çeşitli zaman aralıklarında 23 gün boyunca ölçümler alındı. Ölçümlerde 2.5 mM kafein içeren standartlar kullanıldı. İlk gün alınan ölçüm aktivitesi % 100 kabul edilerek, zamana karşı % aktivite grafiği çizildi. Böylece bitki dokusu biyosensörünün aktivitesini kaç gün süreyle korumuş olduğu belirlendi.

Biyosensör, ölçüm alındıktan sonra, bir sonraki ölçüme kadar fosfat tamponu buharında +4°C’de buzdolabında bekletildi. Ölçüme başlamadan önce ise, 30 dk boyunca çalışma tamponu ve sıcaklığında bekletildi.

3.2.7.5. Biyosensörün substrat spesifitesinin tayini

Bitki dokusu biyosensörü ile kafeinden farklı, purin halkası içeren çeşitli bileşiklerin tayin edilemeyeceğinin belirlenmesi amacıyla, substrat olarak **teofilin, teobromin, kafeik asit, ksantin, hipoksantin ve ürik asit** kullanılarak 100 mM pH 6.5 fosfat tamponunda 37.5 °C’de ölçümler alındı. Biyosensörün kafeine verdiği cevap % 100 kabul edilerek substrata karşı % aktivite grafiği çizildi.

3.2.7.6. Biyosensör cevabı üzerine bazı kimyasal maddelerin etkisi

Biyosensör cevabı üzerine bazı kimyasal maddelerin etkisinin belirlenmesi amacıyla, 100 mM pH 6.5 fosfat tamponu içinde 37.5 °C’de 2.5 mM kafein içeren 1 mL standart kullanılarak, sırasıyla 2.5 mM **fruktoz, glukoz, sukroz, sodyum klorür, magnezyum klorür, kalsiyum klorür** içeren 0.5 mL’lik standartların bulunduğu reaksiyon ortamında ölçümler gerçekleştirildi. Reaksiyon ortamında kimyasal madde olmaksızın alınan ölçüm aktivitesi % 100 kabul edilip, her bir kimyasal madde için % etkileşim oranları belirlendi. Sonuçta substrata karşı % aktivite grafiği çizildi.

3.2.8. Biyosensörün farklı örneklerde kafein tayini için uygulanabilirliği

Bitki dokusu biyosensörünün kafein tayini için farklı örneklerde uygulanabilirliğinin belirlenmesi amacıyla, kafein içeren 4 farklı içecek örneği kullanıldı. Ölçümler için sık kullanılan **standart ekleme metodu** tercih edildi. Bu metodun esası; örneklerin içeriğine bağlı olarak seyreltme yapılmadan ya da yapılarak, analizi yapılacak maddenin belirlenen konsantrasyonlarının, örneğe eklenip biyosensörle ölçüm alınmasına dayanır. Kullanılan örnekler ve yapılan ön işlemler aşağıda verildi:

Kola: Gazı giderildikten sonra 1/33 oranında çalışma tamponunda seyreltilerek kullanıldı.

Siyah ay: Demleme işleminden sonra 1/10 oranında çalışma tamponunda seyreltilerek kullanıldı.

Granül kahve: 1/25 oranında çalışma tamponunda seyreltilerek kullanıldı.

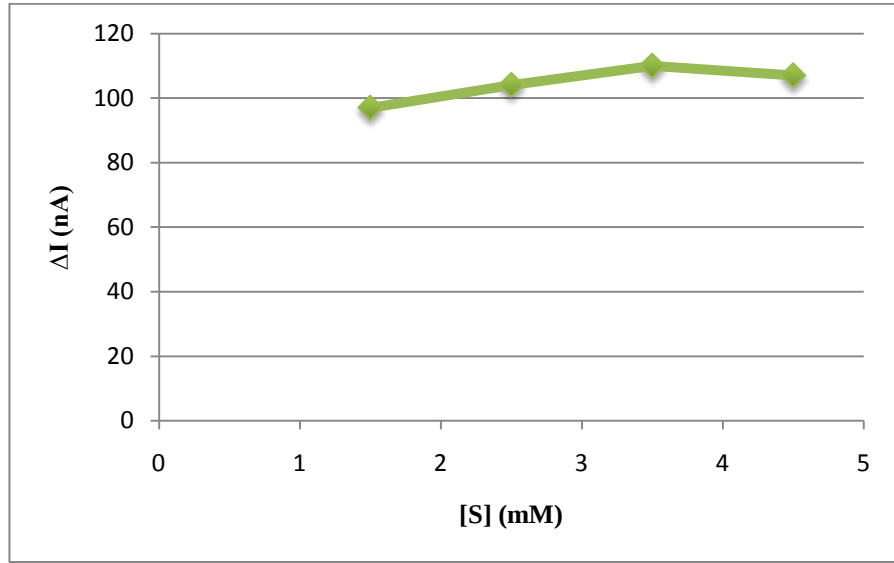
Türk kahvesi: 1/100 oranında çalışma tamponunda seyreltilerek kullanıldı.

Her bir içecek örneğine ilişkin zeltir, 2.5 mM kafein içecek şekilde 100 mM pH 6.5 fosfat tamponu içinde belirtilen oranlarda seyreltilerek hazırlandı. Denemelerde, içecek örnekleri için kafeinin 2.5 mM'lık konsantrasyonunda çalışıldı ve (n=4) lmler gerçekleştirildi.

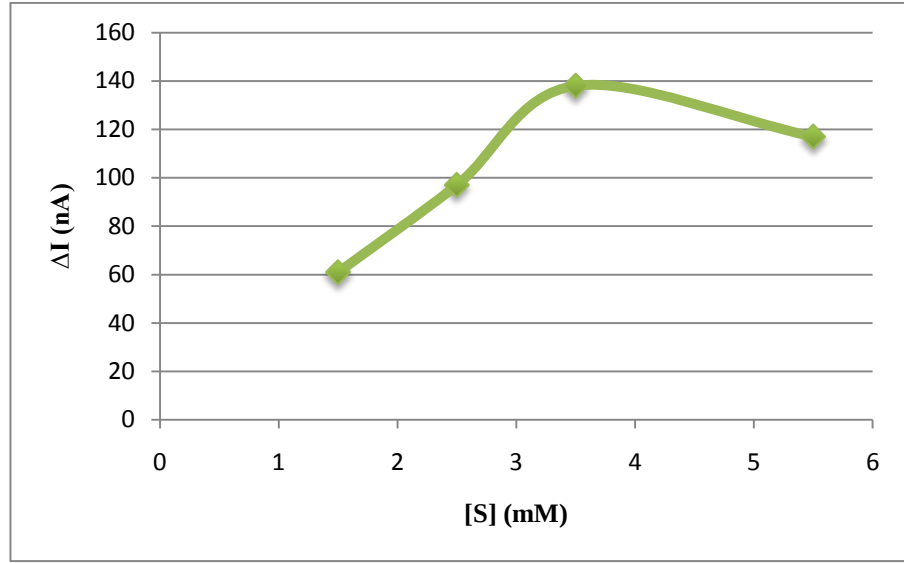
4. DENEYLER VE SONUÇLAR

4.1. Kafein Tayini İçin Uygun Dokunun Belirlenmesi

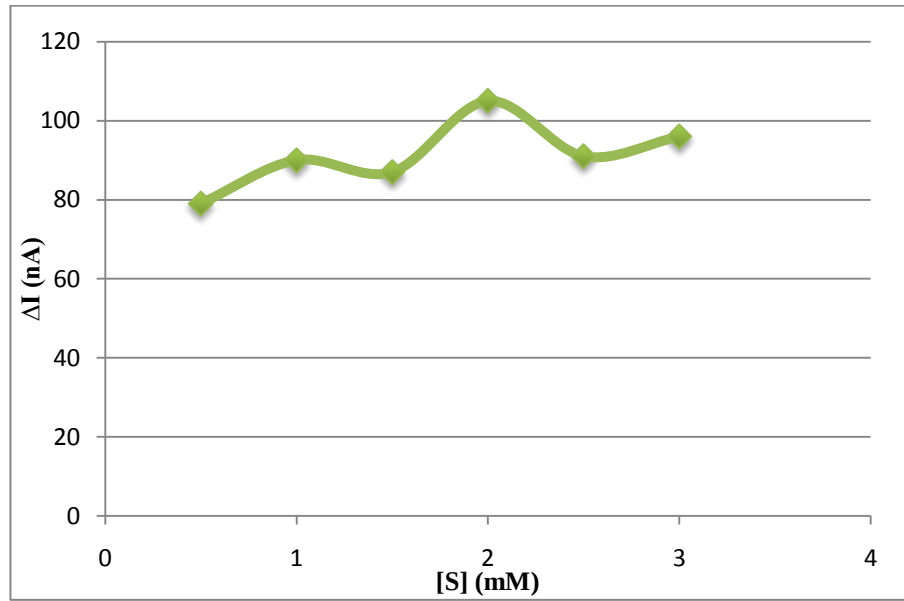
Kafein tayinine yönelik en uygun dokunun belirlenmesi amacıyla, taze bakla, taze fasulye, çay yaprağı ve kahve çekirdeği dokuları içeren 4 farklı doku homojenatı biyosensörü hazırlandı. Ölçümler 50 mM pH 7.5 fosfat tamponu içinde 37.5°C’de gerçekleştirildi. Her bir doku için, kafeinin değişen konsantrasyonlarına karşı biyosensör cevapları karşılaştırılarak en uygun doku belirlendi. Doku homojenatları ile hazırlanan biyosensörlerden elde edilen sonuçlarla hazırlanan grafikler Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.’de verilmiştir.



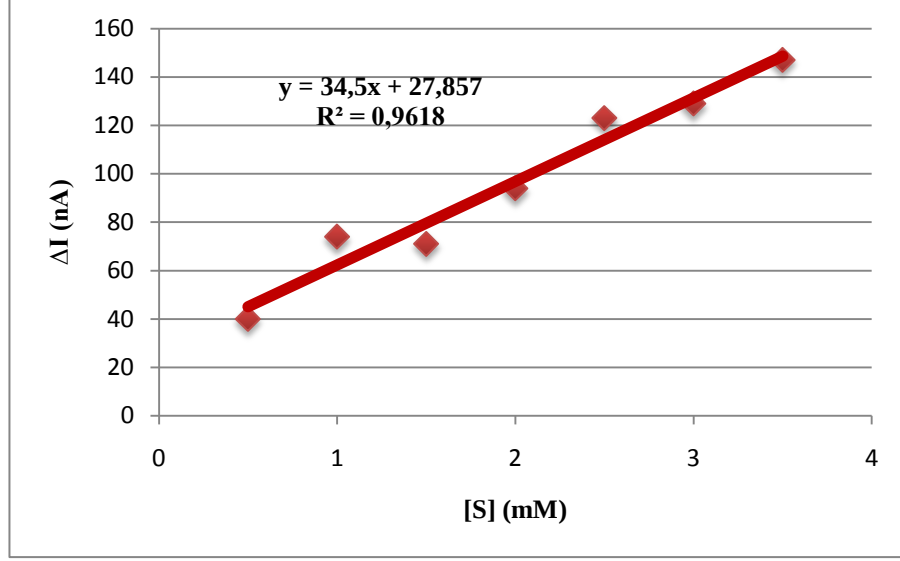
Şekil 4.1. Taze fasulye biyosensörünün değişen kafein miktarına karşı akım şiddeti değişimi



Şekil 4.2. Çay yaprağı biyosensörünün değişen kafein miktarına karşı akım şiddeti değişimi



Şekil 4.3. Kahve çekirdeği biyosensörünün değişen kafein miktarına karşı akım şiddeti değişimi



Şekil 4.4. Taze bakla biyosensörünün değişen kafein miktarına karşı akım şiddeti değişimi

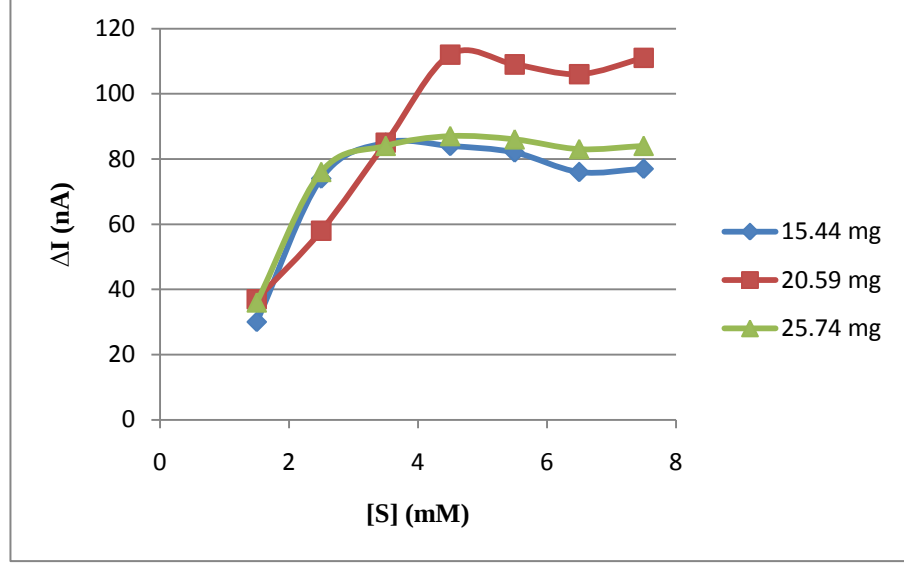
Elde edilen grafiklerden de görüleceği gibi, taze bakla dokusu biyosensörü ile hem en düşük tayin sınırına ulaşıldı hem de 0.5 – 3.5 mM konsantrasyon aralığında tam bir lineerlik elde edildi. Göreceli olarak en yüksek cevaplar da yine bu sensörden alındı. Bu üstünlüklerinden dolayı taze bakla dokusu, kafein tayini için en uygun biyosensör biyobileşeni olarak seçildi.

Bundan sonraki aşamalarda taze bakla dokusu biyosensörü kullanılarak, hazırlama ve çalışma koşulları optimize edildi.

4.2. Biyosensörün Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyon Bulguları

4.2.1. Doku miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Bu çalışmada, biyoaktif tabaka hazırlığında kullanılan taze bakla doku homojenatı miktarının, biyosensör cevabı üzerine etkisi incelendi. Bu amaçla yapılan denemeler sonucu elde edilen verilerle hazırlanan grafik Şekil 4.5.'de verilmiştir.



Şekil 4.5. Doku miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Şekil 4.5.'den de görüleceği gibi en iyi biyosensör cevabı **20.59 mg/cm²** taze bakla dokusu içeren biyosensörden alınmıştır.

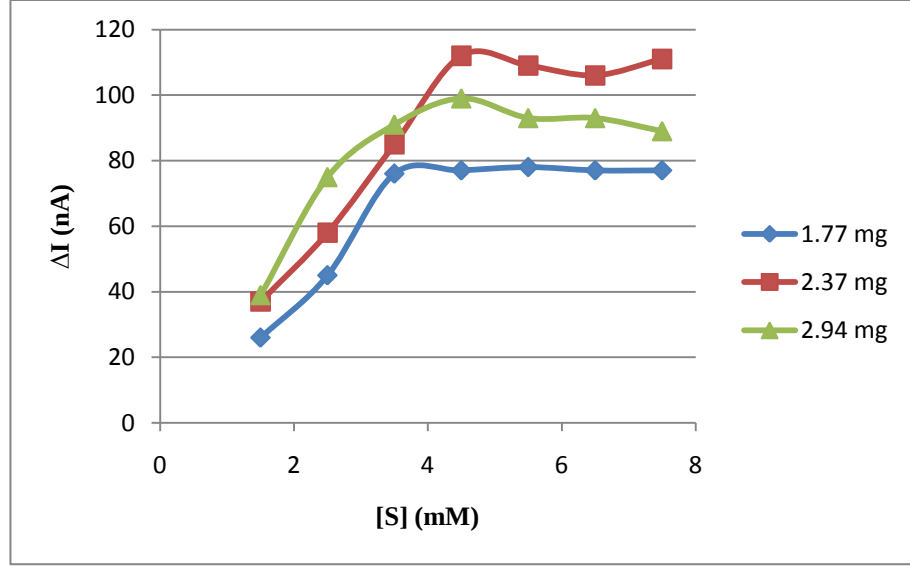
Biyoaktif tabakadaki taze bakla doku miktarının artmasıyla birlikte, elektrodun yüzey alanındaki doku miktarı ve buna bağlı olarak cm²'ye düşen enzim miktarı da artar. Bu durum biyosensör cevabını olumlu yönde etkiler. Ancak doku miktarındaki artış, biyoaktif tabakanın kalınlaşmasına ve beraberinde difüzyon problemine yol açar.

Ayrıca taze bakla doku homojenatı miktarının artması, ortamdaki protein miktarının, dolayısıyla glutaraldehitin oluşturduğu çapraz bağ sayısının artmasına yol açar. Çapraz bağ sayısının artması ise enzimin aktif merkezinin çevresinde sterik engel oluşturur. Bu durum, substratın ve oksijenin dokunun bulunduğu aktif tabakaya difüzyonunu engeller.

Tüm bu etkiler, hem biyoaktif tabakadaki taze bakla dokusu miktarı 15.43 mg/cm²'den 20.59 mg/cm²'ye çıkarıldığında biyosensör cevabında görülen artışı, hem de doku miktarı 20.59 mg/cm²'den 25.73 mg/cm²'ye çıkarıldığında biyosensör cevabında gözlenen düşüşü açıklamaktadır.

4.2.2. Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Çalışmanın bu aşamasında immobilizasyon için kullanılan jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi incelendi. Biyosensörü hazırlamada kullanılan jelatin miktarları ile biyosensör cevabı arasındaki ilişki Şekil 4.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi

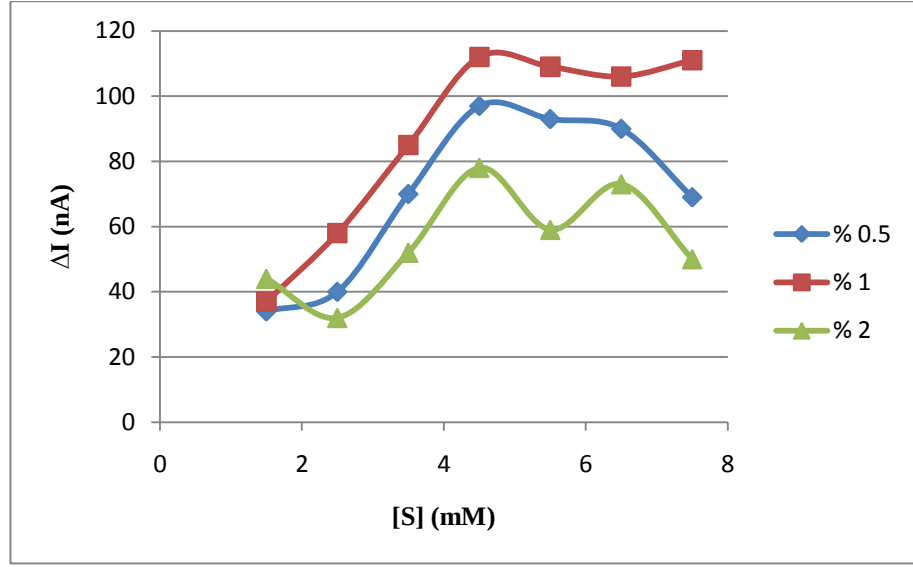
Biyoaktif tabakadaki jelatin miktarının artması, tabakanın kalınlaşmasına, hem oksijen hem de substrat difüzyonunda problemlere ve biyosensör cevabının düşmesine neden olur. Bu durum, jelatin miktarı 2.37 mg/cm²'den 2.94 mg/cm²'ye çıkarıldığında, biyosensör cevabında gözlenen düşüşü açıklamaktadır.

Ayrıca, jelatin miktarı 2.37 mg/cm²'den 1.77 mg/cm²'ye düşürüldüğünde substrat konsantrasyonu arttıkça biyosensör cevabının düşmesi, biyoaktif tabakanın yeterli yoğunlukta olmaması, substrat ve oksijen kaçışlarının olmasından kaynaklanabilir.

Sonuç olarak Şekil 4.6'dan da görüleceği gibi doğrusal aralığı en iyi olan biyosensör cevabı **2.37 mg/cm²** jelatin kullanılarak hazırlanan biyosensörden alınmıştır.

4.2.3. Glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisi

Optimum doku miktarı ve jelatin miktarının yanı sıra değişen glutaraldehit miktarları ile hazırlanan biyosensörlerle denemeler yapılarak, çapraz bağlayıcı glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisi incelendi. Elde edilen sonuçlarla hazırlanan grafik Şekil 4.7.'de verilmiştir.



Şekil 4.7. Glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisi

Glutaraldehit konsantrasyonundaki artış, enzim-enzim, enzim-jelatin ve jelatin-jelatin arasında oluşan çapraz bağ sayısının artmasına, beraberinde de difüzyon problemlerine yol açar. Bu nedenle ki % 2'lik en yüksek glutaraldehit oranı kullanıldığında, biyosensörden alınan cevaplar hem düşük hem de doğrusallıktan uzaktır.

Bunun aksine, glutaraldehit yüzdesinin düşük olması durumunda, çapraz bağ sayısının daha az olması nedeniyle biyoaktif tabaka geniş gözenekli olabilecek ve bu durum kafeinin biyoaktif tabakaya difüzyonunu kolaylaştıracaktır. Bu nedenle, % 0.5 oranında glutaraldehit ile hazırlanan biyosensörün, % 2 oranında glutaraldehit ile hazırlanan biyosensöre nazaran daha yüksek cevaplar vermesi beklenen bir sonuçtu.

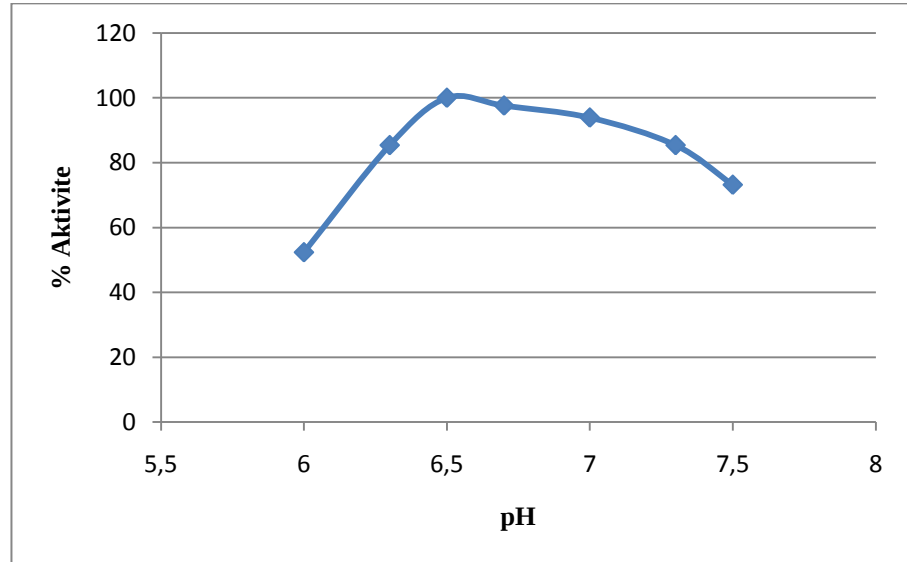
Ayrıca % 0.5 oranında glutaraldehit ile hazırlanan biyosensörün cevabı 4 mM'a kadar artış gösterirken, bu noktadan sonra düşüş kaydedildi.

Tüm bu veriler göz önünde bulundurulduğunda, % 1 glutaraldehit oranının optimum değer olduğuna karar verildi.

4.3. Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyon Bulguları

4.3.1. En uygun pH değeri

Biyoaktif tabaka bileşenlerinin belirlenen optimum değerleri ile yeni bir taze bakla biyosensörü hazırlanarak, farklı pH değerlerindeki reaksiyon ortamında ölçümler alındı. Bunun için pH'ı 6.0, 6.3, 6.5, 6.7, 7.0, 7.3 ve 7.5 olan 50 mM fosfat tamponları kullanıldı. Alınan ölçümler sonucu en iyi biyosensör cevabının **pH 6.5** değerinde olduğu Şekil 4.8.'de görülmektedir.

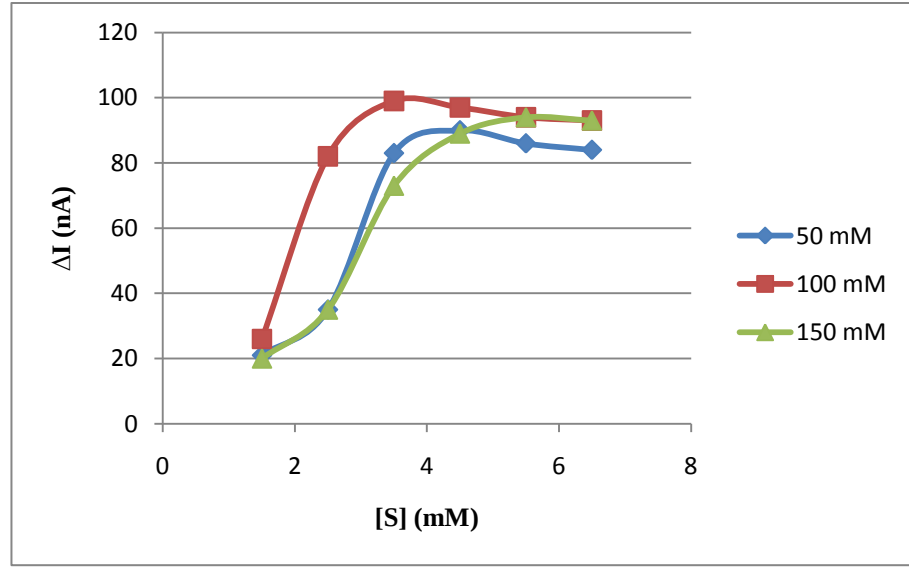


Şekil 4.8. Taze bakla biyosensörü için optimum pH grafiği.

4.3.2. En uygun tampon konsantrasyonu

En uygun tampon konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla, reaksiyon ortamında, optimum pH'ta ancak farklı konsantrasyonlara sahip tamponlar kullanılarak denemeler yapıldı ve en iyi biyosensör cevabının hangi tampon konsantrasyonunda olduğu incelendi. Bu çalışma, aynı zamanda ortamın iyonik şiddetinin biyosensör cevabına etkisinin de optimizasyonudur.

Denemelerde pH 6.5 fosfat tamponunun 50 mM, 100 mM ve 150 mM konsantrasyona sahip çözeltileri kullanıldı. Deneme sonuçları en uygun çalışma tamponu konsantrasyonunun **100 mM** olduğunu gösterdi. Elde edilen sonuçlarla hazırlanan grafik Şekil 4.9.'da verildi.

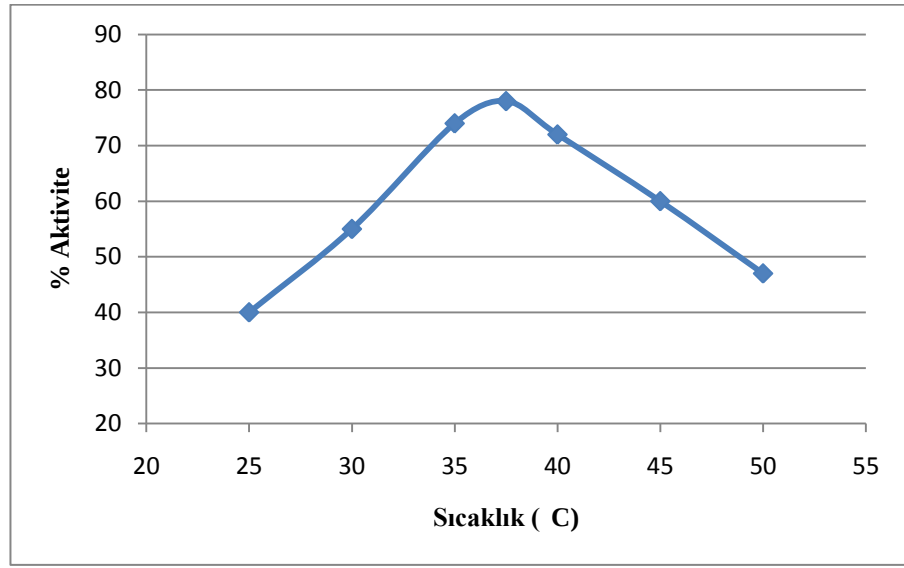


Şekil 4.9. Taze bakla biyosensörü için optimum tampon konsantrasyonu grafiği.

Tampon konsantrasyonlarının artışı, iyon konsantrasyonu ve iyon şiddetinin artmasına neden olur. İyon şiddetinin artması ise çoğu zaman enzim aktivitesinin azalması ile sonuçlanır. Bu durum, 150 mM konsantrasyona sahip tampon ile çalışıldığında elde edilen biyosensör cevabının, 100 mM konsantrasyona sahip tampon ile çalışıldığında elde edilen biyosensör cevabından daha düşük olmasını açıklar.

4.3.3. Reaksiyon ortamının optimum sıcaklığı

Geliştirilen biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyonuna yönelik bu çalışmada, optimum sıcaklığın belirlenmesi için denemeler yapıldı. Taze bakla dokusu biyosensörü ile reaksiyon ortamı sıcaklığı sırasıyla 25-30-35-37.5-40-45-50-55°C'ye değiştirilerek denemeler yapıp, sıcaklığın biyosensör cevabı üzerine etkisi incelendi. Optimum sıcaklık değerinin 37.5°C olduğu verilerle elde edilen Şekil 4.10.'daki eğriden anlaşılmaktadır.



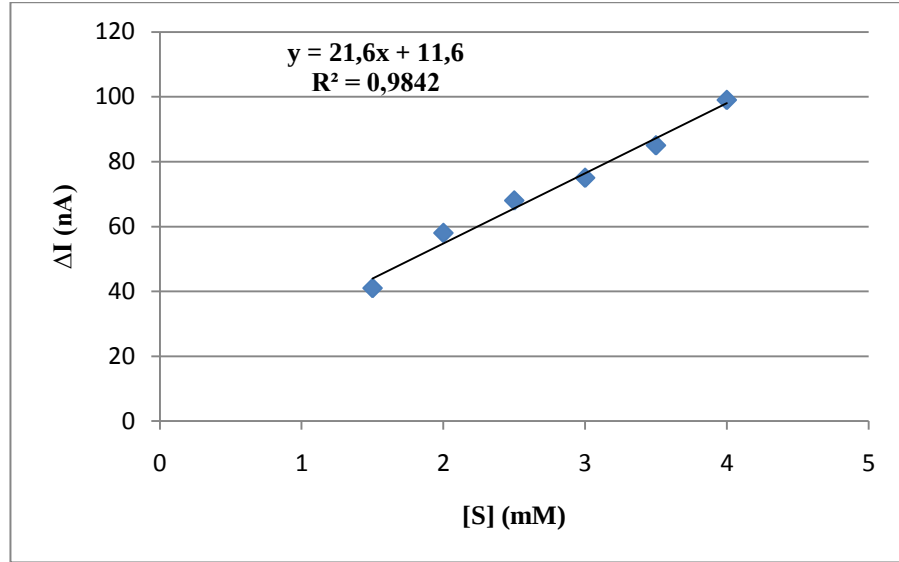
Şekil 4.10. Taze bakla biyosensörü için optimum sıcaklık grafiği.

Şekil 4.10.'da görüldüğü gibi 37.5°C sıcaklığa kadar biyosensörden alınan cevaplarda doğrusal bir artış gözlenirken, bu sıcaklığın üzerindeki sıcaklıklarda yine doğrusal bir azalma meydana geldi. Sıcaklık artışı ile paralel olarak, çözünmüş oksijen konsantrasyonunda azalma dolayısıyla biyosensör cevabında düşme beklenirken, bunun aksine 37.5°C'ye kadar biyosensör cevabında artış gözlenmesi, enzim aktivitesinin optimum sıcaklığına kadar ulaşıldığı anlamına gelir. 37.5°C'den daha yüksek sıcaklıklarda biyosensör cevabında gözlenen düşüş ise optimum sıcaklığın aşılması ile birlikte enzim yapısındaki deformasyona bağlı olarak aktivitesindeki azalma ve sıcaklık artışı ile birlikte çözünmüş oksijen konsantrasyonundaki azalma ile açıklanabilir.

4.4. Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları Bulguları

4.4.1. Kafein lineer tayin aralığı

Taze bakla biyosensörünün optimizasyon çalışmalarında belirlenen koşullarda hazırlanan taze bakla dokusu biyosensörünün, kafeinin farklı konsantrasyonlarına karşı vereceği cevapları tespit etmek ve kafeinin standart ölçüm aralığını belirlemek amacıyla, optimum çalışma koşullarında ölçümler alındı. Elde edilen sonuçlarla hazırlanan grafik Şekil 4.11.'de verildi.



Şekil 4.11. Taze bakla biyosensörü için kafein kalibrasyon grafiği.

Şekil 4.11.'de de görüldüğü üzere, taze bakla dokusu biyosensörü için kafeinin doğrusal tayin sınırları **1.5 – 4.0 mM** olarak belirlendi. Dolayısıyla kafeinin reaksiyon ortamında 1.5 – 4.0 mM aralığında olduğu durumda, doğrusal (lineer) olarak tayin edilebileceği anlaşıldı. Bu demektir ki; 1 L örnekte en az 290 mg ve en yüksek 780 mg kafein doğru olarak tayin edilebilecektir. Dolayısıyla kafeince derişik örnekler seyreltilerek, seyreltik örnekler standart ekleme metodu kullanılarak bu biyosensörle ölçülebileceklerdir.

4.4.2. Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği

Geliştirilen taze bakla biyosensörü ile yapılan analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi amacıyla, kafeinin 2.5 mM sabit konsantrasyonunda aynı biyosensör ile ardı ardına, aktivite kaybı olmadan **5 ölçüm** alınabildi. Biyosensör cevaplarından, standart sapma (S.S) ve varyasyon katsayısı hesaplandı ve sonuçlar Tablo 4.1.'de gösterildi.

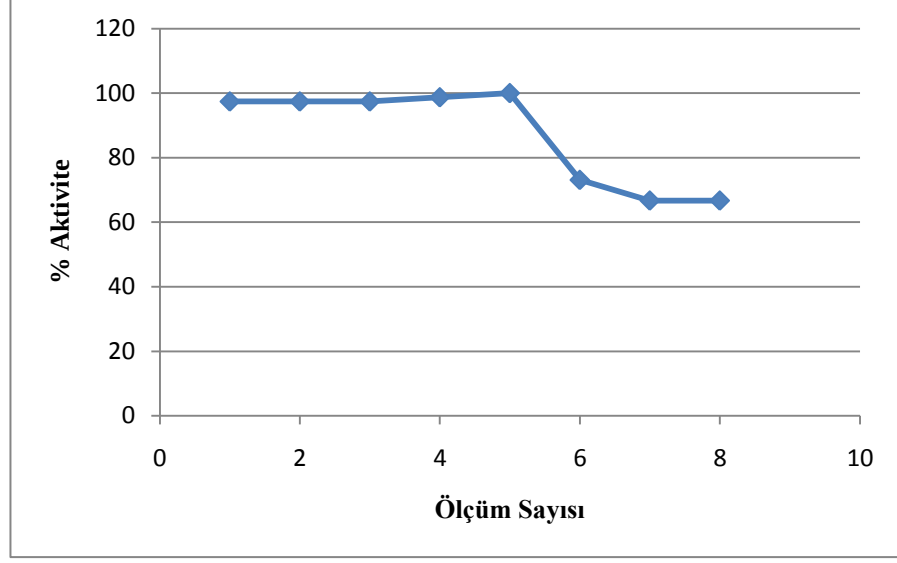
Tablo 4.1. Taze bakla biyosensöründe analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği

Kafein Kons. (mM)	Ortalama Değer (mM)	Standart Sapma (mM)	Varyasyon Katsayısı (%)
2.5	3.008	± 0.040866	1.36

Bir biyosensör sisteminin güvenilirliğinin belirlenmesinde standart sapma ve varyasyon katsayısı önem taşır. Biyosensör sisteminin kullanılabilir olduğunu söyleyebilmek için varyasyon katsayısının % 5' den küçük olması istenir. Tablo 4.1'de verilen sonuçlardan da görüldüğü üzere, hazırlanan taze bakla biyosensörü ile elde edilen standart sapma değerinin düşük olması ve varyasyon katsayısı değerinin kabul edilebilir sınırlar içerisinde olması sonuçların oldukça iyi olduğunu göstermektedir.

4.4.3. Biyosensörün işlem kararlılığı

Biyosensörün işlem kararlılığını belirlemek amacıyla, belirlenmiş optimum koşullarda hazırlanan taze bakla biyosensörü ile sabit kafein konsantrasyonlarında, 100 mM pH 6.5 fosfat tamponunda 37.5°C'de ölçümler alındı ve sonuçlar Şekil 4.12.'de verildi.

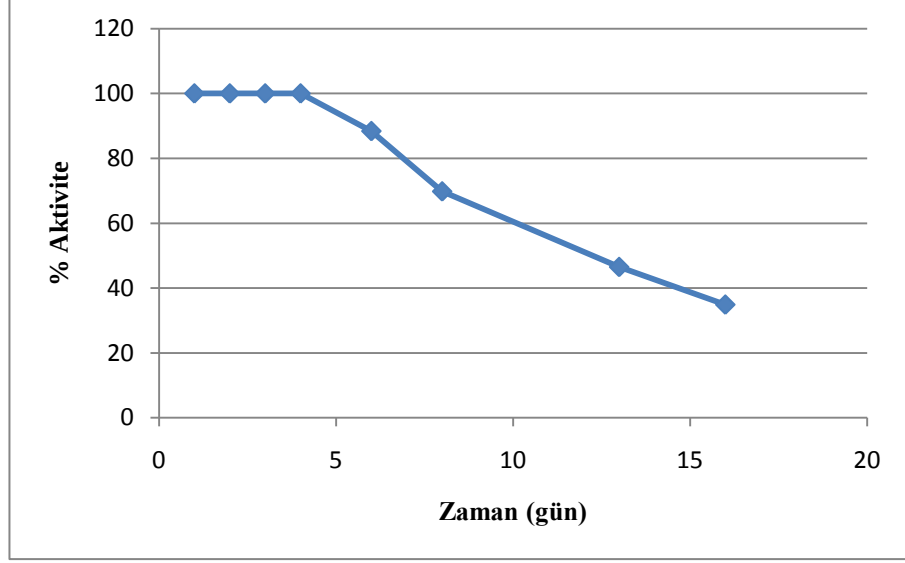


Şekil 4.12. Taze bakla biyosensörünün işlem kararlılığı grafiği.

Şekil 4.12.'de görüldüğü gibi, taze bakla biyosensörünün, 5 ölçüm boyunca aktivitesinin tamamını, 6 ölçüm sonunda ise % 73.1'ini koruduğu gözlemlendi. 8 ölçüm sonunda aktivite % 66.7'ye düştü. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, biyosensörün işlem kararlılığı bakımından iyi derecede olduğu söylenebilir.

4.4.4. Biyosensörün depo kararlılığı

Biyosensörün depo kararlılığını belirlemek amacıyla, daha önce belirlenmiş olan optimum koşullarda bir biyosensör hazırlandı. Bu biyosensör ile farklı zaman aralıklarında, kafeinin 2.5 mM sabit konsantrasyonu için, optimum çalışma koşullarında ölçümler alındı. Ölçümlerde ilk gün alınan biyosensör cevabı % 100 kabul edilerek zamana karşı bağlı aktivite grafiği çizildi ve Şekil 4.13.'de gösterildi.

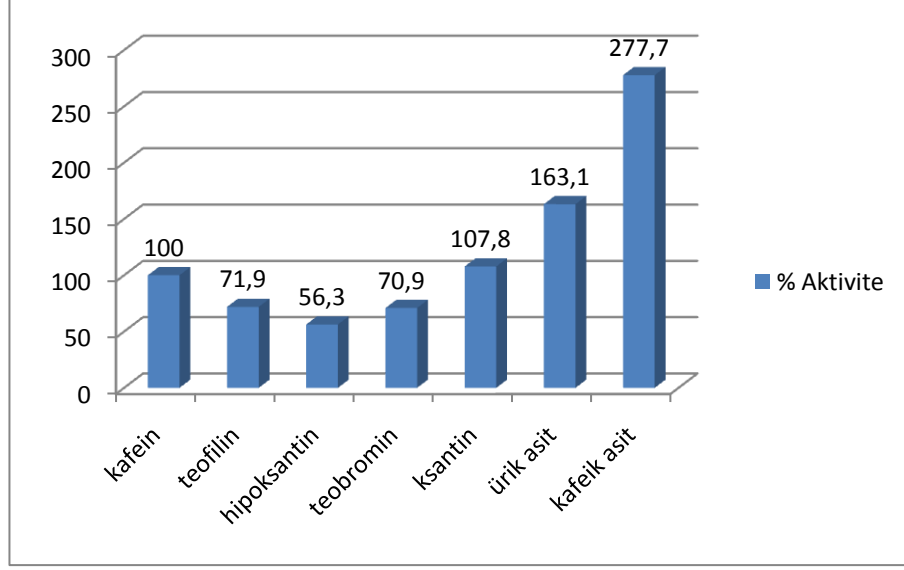


Şekil 4.13. Taze bakla biyosensörünün depo kararlılığı

Şekil 4.13,'den anlaşılacağı üzere, taze bakla biyosensörünün sabit kafein (2.5 mM) varlığında, 6 gün boyunca yaklaşık % 90 oranında güvenilir olarak kullanılabileceği görüldü. Biyosensör 16 günlük zaman dilimi sonunda aktivitesinin yaklaşık % 35'ini korudu. 23. gün biyoaktif tabakada deformasyon gözlemlendi ve ölçümler durduruldu.

4.4.5. Biyosensörün substrat spesifitesi

Geliştirilen taze bakla dokusu biyosensörü ile purin halkası içeren farklı bileşiklerin tayin edilebilirliğini tespit etmek amacıyla, kafein dışında teofilin, teobromin, ksantin, hipoksantin, kafeik asit ve ürik asit olmak üzere 6 farklı bileşik substrat olarak kullanıldı. Her bir substratın 2.5 mM konsantrasyonunda, 100 mM pH 6.5 fosfat tamponunda ve 37.5°C'de ölçümler gerçekleştirildi. Substrat olarak kafein kullanıldığında, biyosensörden alınan cevap % 100 kabul edilerek, biyosensörün diğer substratlara göstereceği aktivite bağli olarak karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4. 14.'de verildi.

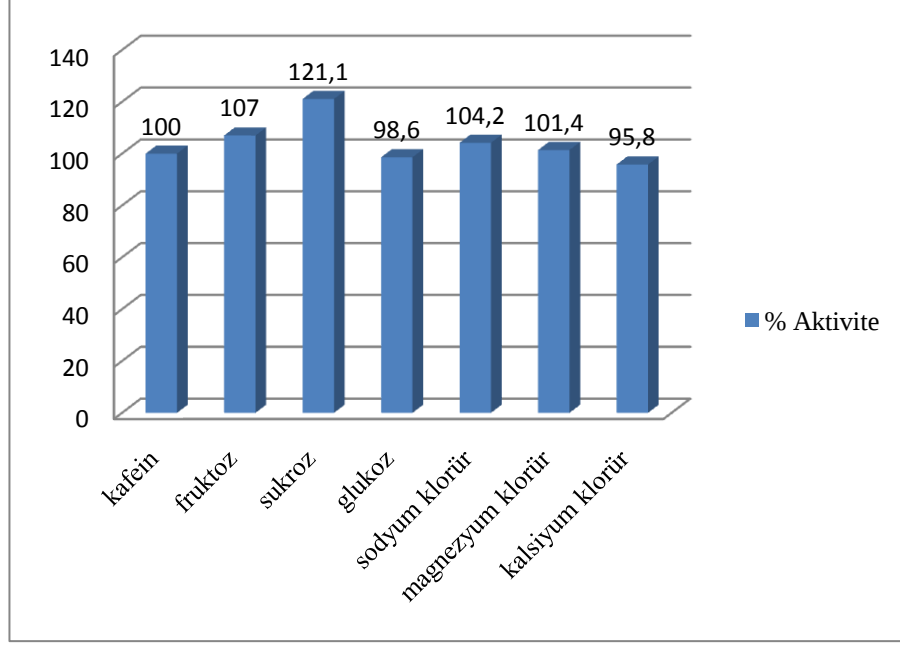


Şekil 4.14. Taze bakla dokusu biyosensörü için farklı substrat denemeleri

Şekil 4.14.'den de görüldüğü üzere, geliştirilen taze bakla biyosensörü kullanılan substratlardan teofilin, teobromin ve hipoksantine kafeine nazaran daha düşük cevaplar verirken, ksantin, ürik asit ve kafeik asite daha yüksek cevaplar vermiştir. Özellikle kafeik asite verdiği cevap dikkat çekicidir. Asiditenin biyosensör cevabını arttırdığı söylenebilir.

4.4.6. Biyosensör cevabı üzerine bazı kimyasal maddelerin etkisi

Taze bakla dokusu biyosensöründen alınacak cevabı etkileyebilecek bazı kimyasal maddeler reaksiyon ortamına eklenerek denemeler yapıldı. Bu amaçla doğal içecek örneklerinde çoğunlukla bulunan bazı şekerler (**fruktoz, sukroz, glukoz**) ve kullanılan suda bulunabilecek bazı tuzlar (**NaCl, MgCl₂, CaCl₂**) seçilerek biyosensör cevabı üzerindeki etkileri gözlemlendi. Biyosensörün ortamda herhangi bir kimyasal madde yokken kafeine verdiği cevap % 100 kabul edildi. Reaksiyon ortamında sırasıyla fruktoz, sukroz, glukoz, sodyum klorür, magnezyum klorür ve kalsiyum klorür varken kafeine karşı alınan biyosensör cevapları ölçüldü ve sonuçlar Şekil 4.15.'te çubuk grafik şeklinde gösterildi.



Şekil 4. 15. Biyosensör cevabına farklı kimyasal maddelerin etkisi

Şekil 4.15.'den de görüldüğü gibi, reaksiyon ortamına ilave edilen kimyasal maddeler, biyosensörün ortamda kimyasal madde yokken kafeine gösterdiği aktiviteyi az miktarda etkilemiştir. Bu durumun sebebi, bitkisel doku kullanılması nedeniyle enzimlerin doğal çevreleri ile birlikte immobilize edilmeleri, böylece enzimin korunmasından dolayı ortamda bulunması muhtemel kimyasal maddelerden çok düşük düzeyde etkilenmeleridir.

Grafikten görüldüğü üzere, biyosensör cevabını nispeten en çok etkileyen madde sukroz şekeridir. Diğer şeker ve tuzların etkisi ihmal edilebilir düzeylerde dir. Elde edilen bu sonuç, taze bakla biyosensörü ile içeceklerdeki kafein tayin edilirken, bu şeker ve tuzların ölçümün doğruluğunu önemli ölçüde etkilemeyecekleri anlamına gelir.

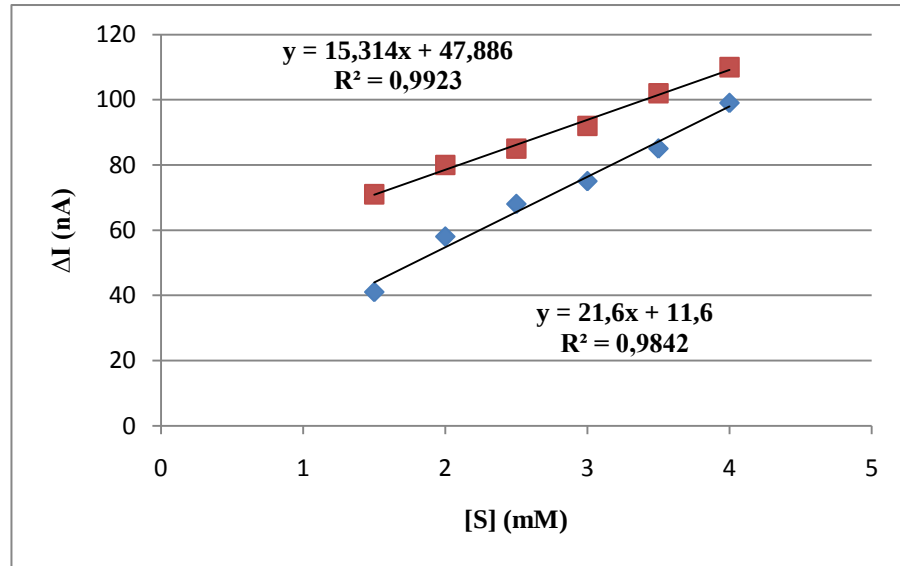
4.5. Biyosensörün farklı örneklerle uygulanabilirliğinin incelenmesi

Geliştirilen ve çalışma koşulları optimize ve karakterize edilen taze bakla biyosensörünün, içecek örneklerindeki kafeinin tayini için kullanılabilirliğini tespit etmek amacıyla, **kola, siyah çay, granül kahve ve Türk kahvesi** içecek örnekleri

kullanılarak, standart ekleme metoduyla, optimum koşullarda ölçümler gerçekleştirildi. Lineer kafein standardı aralığında doğru ölçüm yapılabilmesi için, içecek örneklerinin ön denemeler ile uygun seyreltme oranları belirlendikten sonra ölçümler gerçekleştirildi.

Kolada kafein tayini

Ticari olarak satılan koladaki (Coca cola) kafeinin tayini ile ilgili olarak elde edilen verilerin grafiği ve kafein standardı grafiği Şekil 4.16.'da verilmiştir.

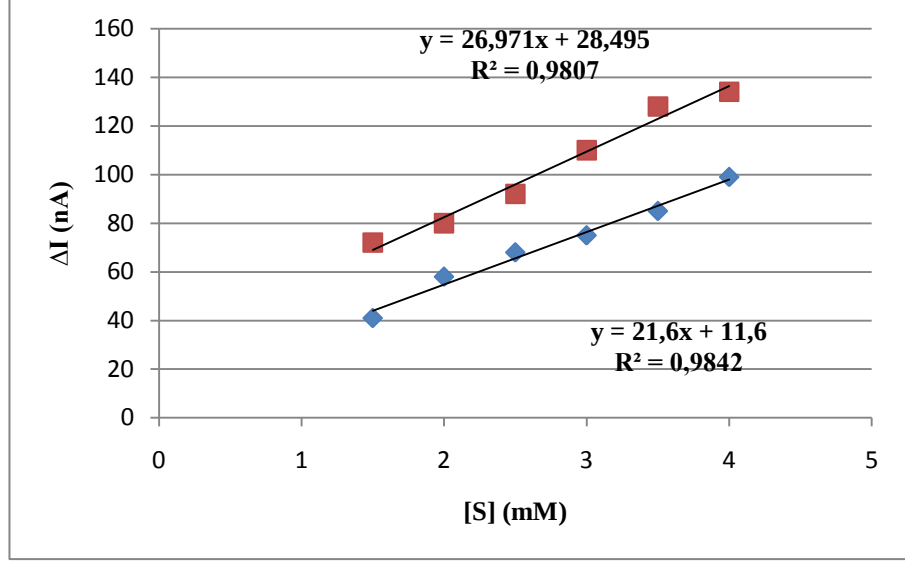


Şekil 4.16. Taze bakla biyosensörü ile koladaki kafein analizi

◆ Kafein standart grafiği ■ Kola standart grafiği

Granül kahvede kafein tayini

Ticari olarak satılan granül kahvedeki (nescafe classic) kafeinin tayini ile ilgili verilerin grafiği ve kafein standardı grafiği Şekil 4.17.'de verilmiştir.

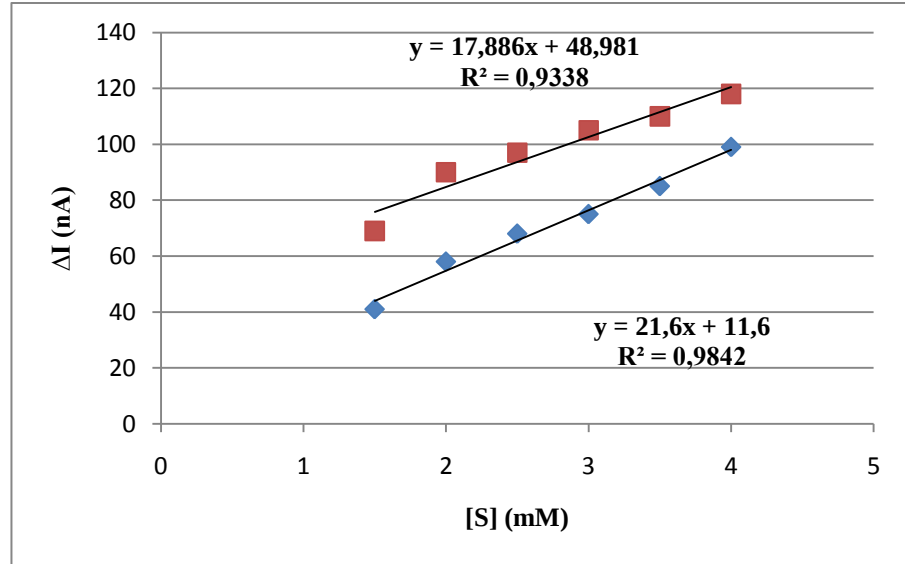


Şekil 4.17. Taze bakla biyosensörü ile granül kahvedeki kafein analizi

◆ Kafein standart grafiği ■ Granül kahve standart grafiği

Siyah çayda kafein tayini

Ticari olarak satılan siyah çaydaki (Çaykur turist çayı) kafeinin tayini ile ilgili verilerin grafiği ve kafein standardı grafiği Şekil 4.18.'de verilmiştir.

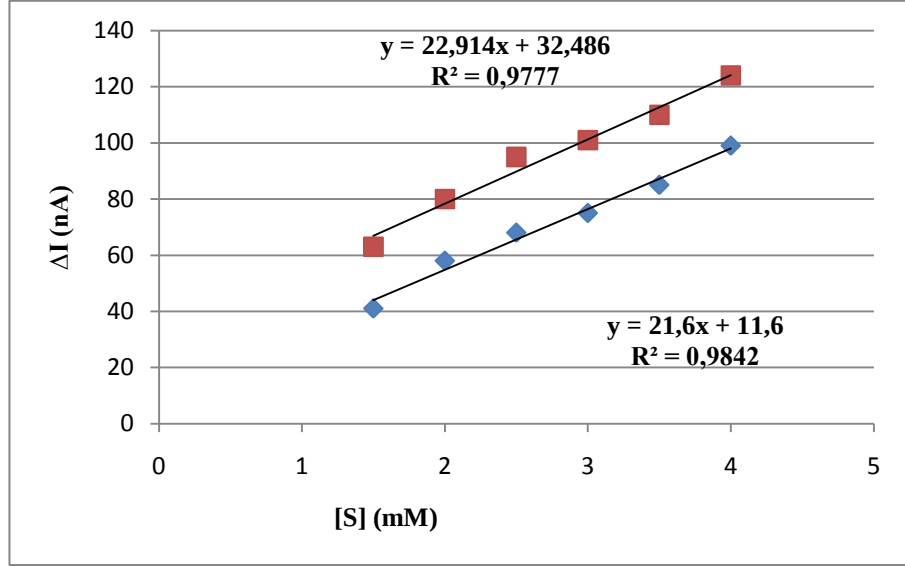


Şekil 4.18. Taze bakla biyosensörü ile siyah çaydaki kafein analizi

◆ Kafein standart grafiği ■ Siyah çay standart grafiği

Türk kahvesinde kafein tayini

Ticari olarak satılan Türk kahvesindeki kafeinin tayini ile ilgili verilerin grafiği ve kafein standardı grafiği Şekil 4.19.'da verilmiştir.



Şekil 4.19. Taze bakla biyosensörü ile Türk kahvesindeki kafein analizi

◆ Kafein standart grafiği

■ Türk kahvesi standart grafiği

Örnekler seyreltme yapılmadan kullanıldıklarında oldukça yüksek biyosensör cevaplarına neden olmaktadır. Bu nedenle her bir örnek, çeşitli denemeler sonucu bulunan belirli oranlarda seyreltilerek kullanıldı. Seyreltilmiş örneklerle, standart ekleme yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafikleri kafein kalibrasyon grafiği ile uyumludur. Bu durum, taze bakla biyosensörünün incelenen içecek örneklerinde kafein tayini için kullanılabilirliğini gösterdi.

Ayrıca biyosensörün optimum çalışma koşullarında içecek örneklerine ilave edilen ve analiz sonucunda standart grafikler yardımıyla hesaplanan kafein standardı miktarları, belli bir konsantrasyonda 4 kez tekrarlanan analizlerin sonucu ve geri dönüşüm oranları Tablo 4.2.'de verildi.

Tablo 4.2. Taze bakla biyosensörü ile çeşitli örneklerde kafein tayini

ÖRNEK	EKLENEN MİKTAR (mM)	BULUNAN MİKTAR (mM)	GERİ KAZANIM (%)
Kola	2.57	2.86±0.35	111.28
Siyah çay	2.57	2.84±0.14	110.51
Granül kahve	2.57	2.59±0.31	100.78
Türk kahvesi	2.57	2.78±0.04	108.17

Tablo 4.2’den görüldüğü gibi taze bakla biyosensörü ile standart ekleme metoduyla elde edilen sonuçların iyi olduğu söylenebilir. Bu durum, taze bakla biyosensörünün belirtilen içecek örneklerinde mevcut olan kafeini doğrulukla analiz edebileceğini göstermiştir.

5. TARTIŞMA

Kafein, 60'dan fazla bitki türünün meyvesinde, tohumlarında ya da yapraklarında bulunan, uyarıcı etkiye sahip doğal bir alkaloiddir. Özellikle insan sağlığı üzerindeki etkilerinden dolayı araştırmacıların ilgisini her geçen gün daha fazla çekmekte ve kafein üzerine sayısız çalışma yapılmaktadır (Hansen, S.A. vd., 2000).

Kafein, merkezi sinir, kardiyovasküler, gastrointestinal, solunum ve renal sistemler gibi farklı vücut sistemleri üzerinde çeşitli fizyolojik etkilere sahiptir. Merkezi sinir sisteminin güçlü bir uyarıcısıdır ve kalp kaslarını uyarır. Bu alkaloidin yüksek miktarları, mide – bağırsak yolunda tahrişe neden olur. Kafeinin daha yüksek dozları, mide bulantısı, anksiyete ve gerginliğe neden olabilir. Vücuttaki kalsiyum atılımını hızlandırdığından osteoporoz riskini artırabilir. Bunlar ve benzeri olumsuz etkilerinden dolayı içeceklerdeki kafein miktarının tayini oldukça önemlidir (Juliano ve Griffiths, 2004, Lane vd., 2002).

Biyolojik, farmasötik ve bitkisel materyallerdeki kafein miktarları UV spektrofotometrik, türev spektrofotometrik, HPLC, kapiler elektroforez gibi tekniklerle tayin edilmiştir. Spektrofotometre hızlı ve basit bir metoddur. Ancak, spektrum girişimleri nedeniyle geleneksel UV absorpsiyon ölçümüyle kahve çekirdeğindeki kafeini direkt olarak tayin etmek mümkün değildir. Türev spektrofotometre göreceli olarak kolaydır, ancak kafeinin küçük konsantrasyonları için güvenilir bir ölçüm metodu değildir. HPLC metodları, pahalı ekipmanlar ve laboratuvar uygulamaları için uzman personele ihtiyaç duyar. FTIR gibi diğer metodlar ise pahalı kimyasallar gerektirmez ama böyle cihazlar çok pahalı olduğu için en iyi laboratuvarlarda bile mevcut değildir (Akyılmaz ve Türemiş, 2010).

Bu nedenle son yıllarda bu tür bileşiklerin analizi için, pratik ve çabuk sonuç veren biyosensörük metodların önemi artmıştır. Özellikle ticari saf enzimlerle oluşturulan biyosensörlerin yerine, analiz edilecek bileşik için uygun olan enzimi içeren bitkisel dokunun kullanılması ile hazırlanan doku biyosensörleri, materyal bolluğu ve ekonomik bakımdan avantajlar sağlamaktadır.

Bu yüksek lisans tezinde, kafeini substrat olarak kullanan, kafein oksidaz enzimini bulundurması muhtemel, taze bakla, taze fasulye, çay yaprağı ve kahve çekirdeği dokuları kafein oksidaz aktivitesi bakımından incelendi. Denemeler sonucunda, kafein tayinine yönelik gerekli enzimi içeren en uygun dokunun taze bakla olduğuna karar verildi. Taze bakla dokusu camısı karbon elektrot yüzeyine immobilize edilerek, hazırlanan biyosensörün standart olarak kullanılan kafeine karşı verdiği cevaplar incelendi. Ayrıca, hazırlanan taze bakla dokusu biyosensörünün optimizasyonu, karakterizasyonu, substrat spesifitesi, farklı kimyasal maddelerden etkilenme derecesi ve çeşitli içecek örneklerindeki kafeini tayin amacıyla kullanılabilirliği araştırıldı.

Biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonu çalışmasında; biyosensörü hazırlamada kullanılan taze bakla dokusu ve jelatin miktarı ile çapraz bağlayıcı glutaraldehitin yüzdesi optimize edildi. Taze bakla biyosensörü için optimum doku miktarı 20.59 mg/cm^2 , optimum jelatin miktarı 2.37 mg/cm^2 ve optimum glutaraldehit oranı % 1 olarak bulundu.

Bu sonuçlar; aynı Biyokimya anabilim dalında yapılmış olan, yine taze bakla dokusunun biyoaktif tabaka bileşeni olarak kullanıldığı, fenolik bileşiklerin tayini için geliştirilmiş amperometrik esaslı bir biyosensörün, biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyon sonuçları ile karşılaştırıldığında uyumlu görüldü. Bu çalışmada optimum doku miktarı 10.6 mg/cm^2 , optimum jelatin miktarı 0.98 mg/cm^2 , optimum glutaraldehit oranı % 1.25 olarak bulunmuştur. Tez çalışmasında bulduğumuz optimum doku miktarının nispeten yüksek oluşu, canlı bitki dokusunda bulunan enzim cinsinin ve aktivitesinin farklılığına, jelatin miktarının fazla olması ise jelatin miktarının doku miktarına bağlı olarak artışına bağlanabilir. (Özcan, 2010).

Biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyonu çalışmasında; en iyi biyosensör cevabı reaksiyon ortamındaki tampon çözeltinin pH'ı 6.5 ve konsantrasyonu 100 mM olduğunda alındı. Sıcaklık optimizasyonu denemelerinde, taze bakla biyosensörü için optimum sıcaklık değerinin 37.5°C olduğu görüldü. Bu sıcaklık fizyolojik sıcaklık değeri olduğu için ulaşılması kolay, ekstra enerji gerektirmeyen bir değerdir. 45°C 'den itibaren ise biyoaktif tabakada deformasyon gözlemlendi.

Klebsiella ve *Rhodococcus* cinslerine ait suşları içeren bir karışık kültür ortamından, kafein oksidaz enziminin saflaştırılması ve kısmi karakterizasyonu çalışmasında, enzim aktivitesine ait optimum pH 7.8, optimum sıcaklık 30°C bulunmuştur (Madyastha K.M. vd., 1999).

Göl suyundan izole edilmiş *Alcaligenes* türünden elde edilen kafein oksidaz enziminin saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarında, enzimin maksimum aktivite gösterdiği optimum pH 7.5, optimum sıcaklık 35 °C olarak bulunmuştur (Mohapatra vd., 2006).

Saf kafein oksidaz enzimine ait optimum pH değeri ile biyosensördeki dokunun immobilize enzime ait optimum pH değeri karşılaştırıldığında, enzimin doku ile birlikte immobilize edilmesinin düşük pH'da daha aktif olmasını sağladığı anlaşılmaktadır. Benzer şekilde sıcaklık değerleri arasındaki fark göz önüne alındığında, optimum sıcaklık değerinin immobilizasyon işleminin etkisiyle yükseldiği görülmüştür. Dolayısıyla bu sonuçlar, saf enzime ait optimum değerlerin, immobilizasyon işlemleri ile değişebileceği düşünüldüğünde son derece normaldir.

Biyosensörün karakterizasyon çalışmaları; ilk olarak kafeinin tayin aralığının belirlenmesine çalışıldı. Biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimum değerlerine uygun olarak hazırlanan taze bakla biyosensörü ile optimum çalışma koşullarında yapılan denemeler sonucunda kafein için lineer ölçüm aralığı 1.5-4.0 mM (0.3-0.8 mg/mL) olarak belirlendi.

Çözeltilerdeki kafeinin tayini için, kafeini yıkabilen bir mikroorganizmadan (*Pseudomonas alcaligenes*) yararlanılarak hazırlanan amperometrik biyosensörde kafein tayin aralığı 0.1-1 mg/mL olarak bulunmuştur (Sarath Babu vd., 2006). Kafein tayini için, alkalen fosfataz (ALP) enziminin inhibisyonuna dayalı bir biyosensörün geliştirildiği diğer bir çalışmada, kafein tayin aralığı 0.1-10 µM olarak kaydedilmiştir (Akyılmaz ve Türemiş, 2010).

Bulduğumuz lineer ölçüm aralığının, literatürdeki diğer kafein biyosensörlerinin lineer ölçüm aralığı ile karşılaştırıldığında, yüksek olduğu söylenebilir. Ancak geliştirilen biyosensörlerin, ya saf enzim ya da mikroorganizma kullanılarak hazırlandığı göz önüne alınırsa, geliştirdiğimiz biyosensörün bitkisel doku temelli

olması nedeniyle hazırlama kolaylığı, ön işlem gerektirmemesi, maliyetinin son derece düşük olması ve biyobileşen materyalinin kolay bulunabilirliği önemli avantajlarındandır.

Karakterizasyon çalışmasının ikinci bölümünde, analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği araştırıldı. Bu amaçla taze bakla biyosensörünün kafeinin sabit konsantrasyonuna karşı ardarda, aktivite kaybı olmadan kaç kez doğru ölçüm alabileceği incelendi. Denemeler sonucunda sensör ile aynı konsantrasyonda 5 ölçüm alınabileceği saptandı. Elde edilen verilerden standart sapma ve varyasyon katsayıları sırasıyla ± 0.040866 ve % 1.36 olarak bulundu. Hesaplama sonuçlarına bakıldığında, düşük bir standart sapma değerinin elde edildiği ve varyasyon katsayısının biyosensörler için kabul edilebilir sınır olan % 5'in altında olduğu görülmektedir. Bu durum taze bakla biyosensörünün içeceklerdeki kafeini tayin etmek için yüksek doğrulukla kullanılabileceğini göstermektedir.

Biyosensörün işlem kararlılığını belirlemek amacıyla yapılan denemelerde, taze bakla biyosensörünün 5 ölçüm boyunca aktivitesinin tamamını, 6 ölçüm sonunda ise % 73.1'ini koruduğu gözlemlendi. 8 ölçüm sonunda aktivite % 66.7'ye düştü. Bu verilere göre biyosensör 8 ölçüm sonunda aktivitesinin sadece % 33.3'ünü kaybetmiştir. Sonuçlar göz önüne alındığında, biyosensörün işlem kararlılığı bakımından iyi derecede olduğu söylenebilir.

Depo kararlılığı çalışmasında; taze bakla biyosensörünün kullanılmadan, ideal koşullarda saklandığı durumdaki ömrü tespit edilmeye çalışıldı. Bu amaçla 23 gün boyunca farklı zaman aralıklarında ölçümler alındı ve biyosensörün 6 gün boyunca yaklaşık % 90 oranında güvenilirlikle kullanılabileceği anlaşıldı. 16 gün sonunda biyosensörle yaklaşık % 35 doğrulukla ölçüm yapılabildiği görüldü. 23. gün yapılan ölçümde, biyoaktif tabakanın tamamen kuruması nedeniyle ölçüm alınamadı. Genel olarak immobilizasyon materyali olarak jelatinin kullanıldığı biyosensörlerde, uygun koşullarda korunma sağlansa bile tabakanın kısmen kuruması nedeniyle depo kararlılıkları 10-30 gün arasında bulunmuştur (Topcu vd., 2004).

Biyosensörün substrat spesifitesini tayin etmek amacıyla, taze bakla biyosensörünün kafeinin yanı sıra purin halkası içeren kafeine benzer 6 farklı bileşiğe,

optimum koşullarda verdiği cevaplar incelendi. Biyosensörün kafeine verdiği cevap % 100 kabul edilerek diğer substratlara verdiği cevaplar gözlemlendi. Hipoksantin, teobromin ve teofilin substratlarına % 56-72 aralığında değişen nispeten daha düşük cevaplar verdiği görüldü. Ksantin, ürik asit ve kafeik asit substratlarına ise diğer substratlara oranla % 107-227 aralığında değişen daha yüksek cevaplar verdi. Buradan biyosensörün en az % 56 oranında olmak üzere bütün substratlara karşı ilgili olduğu anlaşılmıştır. Asidik substratlara ilgisinin daha yüksek olduğu da görüldü.

Kullanılan sistemin bitkisel doku temelli olması ve dokuların farklı enzim ve enzim sistemleri içermesi, saf enzim biyosensörlerine oranla daha fazla sayıda substrata duyarlı olmasına neden olmaktadır. Bu durum göz önüne alındığında taze bakla biyosensörünün kullanılan substratlara verdiği cevaplar bir dezavantaj olarak değerlendirilmemelidir.

Karakterizasyon çalışmasının son aşamasında, taze bakla biyosensörünün kafeine karşı vereceği cevabı etkileyebilecek, doğal içecek örneklerinde çoğunlukla bulunan bazı şekerler ve kullanılan suda bulunabilecek bazı tuzlar ile çalışıldı. Denemeler sonucu elde edilen verilerden de anlaşılabileceği üzere, şeker ve tuzların etkisi genel olarak düşük bulunduğu için ihmal edilebilir düzeydedir. Bu sonuç, içeceklerde bulunan kafein tayin edilirken, çalışılan şeker ve tuzların ölçümün doğruluğunu büyük ölçüde etkilemeyeceği anlamına gelir. Bir biyosensör hazırlanırken bitkisel dokunun kullanılmasıyla, enzim doğal mikro çevresi ile birlikte elektroda immobilize edilir. Böylece enzimin doğal korunaklılığının yanı sıra immobilizasyon yoluyla da kimyasal maddelerden etkilenme oranı düşer. Bu durum, çalışmamızda da görüldüğü gibi doku biyosensörlerinin bir avantajıdır.

Bu çalışmada, sodyum klorür, magnezyum klorür ve kalsiyum klorür tuzları kullanılarak Na^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} iyonlarının biyosensör cevabı üzerindeki etkisi incelendi ve sonuç olarak üç iyonun da biyosensör cevabını ihmal edilebilecek kadar az etkilediği görüldü. Bu sonuç, *Alcaligenes* türünden saflaştırılan kafein oksidaz enzimi üzerinde, farklı metal iyonlarının etkisi üzerine yapılan çalışmanın sonuçları ile uyumludur (Mohapatra vd., 2006).

Örnek analizi çalışmalarında, kafein içeren kola, granül kahve, siyah çay ve Türk kahvesi içecekleri, taze bakla biyosensörünün kafein tayini için kullanılabilirliğini test etmek amacıyla kullanıldı. İçecek örnekleri seyreltmeler yapılarak ve standart ekleme metodu kullanılarak analiz edildi.

Tez çalışması kapsamında;

- Taze bakla sebzesinde kafein oksidaz enzimi varlığı ve oldukça aktif olduğu tespit edildi.
- Bakla dokusunun biyoaktif tabaka bileşeni olarak kullanıldığı bir biyosensör, kafein tayininde kullanılmak üzere hazırlandı.
- Hazırlanan taze bakla biyosensörünün hazırlama koşulları, çalışma koşulları kafein tayini için optimize ve karakterize edildi.
- Optimize koşullarda aynı biyosensör ile bazı kafeinli içeceklerde kafein tayininin, yeterli işlem ve depo kararlılığında yapılabileceği gösterildi.
- Geliştirilen biyosensörde biyoaktif tabaka bileşeni olarak saf enzim ya da gerekli enzimi içeren bir mikroorganizmanın yerine, bünyesinde kafein oksidaz enzimini bulunduran bakla dokusunun kullanılması, biyosensöre, materyalin kolay bulunabilirliği, hazırlama kolaylığı, ön işleme ihtiyaç duyulmaması ve düşük maliyet gibi önemli avantajlar sağlar.

KAYNAKLAR

- Aizawa, M.**, Khan, G.F., Kobatake, E., Haruyoma, T., Ikariyama, Y., 1994, In Interfacial Design and Chemical Sensing, 305-313
- Akyılmaz, E.**, Turemis, M., 2010, “An inhibition type alkaline phosphatase biosensor for amperometric determination of caffeine”, *Electrochimica Acta* 55, 5195-5199
- Alpdoğan G.**, Karabina K., Sungur S., 2002, “Derivative Spectrophotometric Determination of Caffeine in Some Beverages”, *Turk J Chem* 26, 295-302
- Başaran A.**, Sarıbay G.F., Akın S., Korkusuz F., 2005, “Relation Between Caffeine Consumption and Bone Mineral Density”, *Turkish Journal of Geriatrics*, 8 (2: 61-68)
- Brett, A.M.**, Oliveira, Macedo, T.R.A., Raimundo, D., Marquez, M.H., Serrano, S.H.P., 1998, Voltammetric Behaviour of Mitoxantrone at a DNA-Biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 13: 861-867
- Clark, L. C.**, Lyons, C., 1962, Electrode system for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Ann. NY Acad.Sci.*102:29-45.
- Coulet, P.R.**, “What is a Biosensor?” Chapter 1 “Biosensor principles and applications”, Ed: Blum, L. J., Coulet, P. R., (1991), Marcel Dekker Inc.,New York, sayfa1-6.
- Deng, I.**, Enke, C., 1980, “Adenosine-selective electrode”, *Anal. Chem.*, 52, 1937-1940
- Dinçkaya E.**, 1999, Enzim sensörleri, Biyosensörler (Ed. Azmi Telefoncu), Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir, 81-142
- Eggins, B.R.**, 1996, Biosensors: An introduction, John Wiley and Sons Ltd. and B.G. Teubner, West Sussex
- Esposito E.**, Cortesi R., Nastrozzi C., 1995, Gelatin Microspheres: Influence of Preparation Parameters and Thermal Treatment on Chemico-Physical and Biopharmaceutical Properties, *Biomaterials*, (20), 2009-2020.

Guilbault G. G., Kauffmann J. M., 1987, Enzyme-based Electrodes as Analytical Tools, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, (9), 95-113.

Hansen, S.A., Folsom, A.R., Kushi, L.H., Sellers, T.A., 2000, “Association of fractures with caffeine and alcohol in postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study”, *Pub. Health Nutr.* 3, 253

Hurst W.J., Martin R.A., 1993, “The Quantitative – Determination of Caffeine in Beverages Using Capillary Electrophoresis”, *Analisis (Imprimé) Y.* 1993, vol. 21, No. 9, pages 389-391

Juliano, L.M., Griffiths, R.R., 2004, “ A critical review of caffeine withdrawal: empirical validation of symptoms and signs, incidence, severity, and associated features”, *Psychopharmacology*, 176(1):1-29

Kaufmann, J.M., Guilbault, G.G., 1992, “Enzymes electrode biosensors: Theory and applications”, *Bioanal. Appl. Enzymes*, Vol 36, pp 63-113

Kayır, H., Uzbay,T., 2004, Santral adenozerjik sistem klinik önemi, *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni* 14: 159-167

Klinger, M., Freissmuth, M., Nanoff, C., Adenosine receptors: G protein- mediated signalling and the role of accesory proteins. *Cellular Signalling* 14: 99-108 (2000)

Killard, A.J., Smith, M.R., 2000, “Creatin Biosensors: Principles and Desings, *Reviews, TIBTECH*, 18, 433-437

Lane, J.D., Pieper, C.F., Phillips-Bute, B.G., Bryant, J.E., Kuhn, J.M., 2002, “Caffeine affects cardiovascular and neuroendocrine activation at work and at home”, *Psychosomatic Medicine* Jul-Aug; 64 (4): 595-603

Macholan L., 1987, Recent Progress in Developing Enzyme and Tissue-based Membrane Electrodes, *Acta-Biotechnol*, 7(69), 547-553.

Madyastha, K.M., Sridhar, G.R., Vadiraja, B.B., Madhavi, Y.S., 1999, “Purification and partial characterization of caffeine oxidase--A novel enzyme from a mixed culture consortium”, *Biochem Biophys Res Commun*, 263(2): 460-4

Mazzafera, P., “Catabolism of Caffeine in Plants and Microorganisms”, *Frontiers in Bioscience* 9, 1348-1359, May 1, 2004

McGown, L.B., Joseph, M.J., Pitner, J.B., Vonk, G.P., Linn, C.P., 1995, “The Nucleic Acid Ligand: A new tool for molecular recognition”, *Anal. Chem.*, 67: 663A-668A

Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Ozsoz, M., 2002, “Indicator – Free DNA Biosensor Based on Adenine and Guanine Signals, *Electroanalysis*, 14 (18): 1245-1250

Mohapatra, B.R., Harris, N., Nordin, R., Mazumder, A., 2006, “ Purification and characterization of a novel caffeine oxidase from *Alcaligenes species*”, *Journal of Biotechnology*, 125, 319-327

Mumin A., Akhter K.F., Abedin Z., Hossain Z., 2006, “Determination and Characterization of Caffeine in Tea, Coffee and Soft Drinks by Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography (SPE-HPLC), *Malaysian Journal of Chemistry*, Vol. 8, No.1, 045-051

Nishitani, E. and Sagesaka, Y.M., 2004, “Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method”, *J. Food Compos. Anal.* Vol.17, no 5, pp. 675-685

Ofluoğlu F.E., “ Ratlarda Beyin L-Arginin Metabolizması Üzerine Kafeinin Etkileri” Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya ABD,Doktora Tezi, 2007

Ohnsmann, J., Quintas, G., Garrigues, S., Guardia, M., 2002, “Determination of caffeine in tea samples by Fourier transform infrared spectrometry” , *Anal Bioanal Chem*, 374: 561-565

Pizzariello, A., Svorc, J., Stred'ansky, M., Miertus, S., “A biosensing method for detection of caffeine in coffee”, *J Sci Food Agric* 79: 1136-1140 (1999)

Polat, K., 2005, “Soxhlet Yöntemi İle Çaydan Kafein Eldesi”, Ankara Üniversitesi, Ankara, İleri Organik Kimya Laboratuvar Öğrenci Föyü

Rose P. J., Mark H. F., Bikales N. M., Overberg C. G., Menges G., Kroschwitz J. I., 1987, Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, 2nd. Ed., Wiley Interscience, New York, (7), 89.

Sağiroğlu A., 2003, Bitkisel Doğal Bileşikler Kimyası, Trakya Üniversitesi, Edirne, 157-160

Özcan, H.M., “Fenolik Bileşiklerin Tayinine Yönelik Amperometrik Esaslı Biyosensör Geliştirilmesi” Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya ABD, Doktora Tezi, 2008

Sarath Babu V.R., Patra S., Karanth N.G., Kumar M.A., Thakur M.S., 2007, “Development of a Biosensor for Caffeine”, Analytica Chimica Acta, 582, 329-334

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

Scouten H. W., Luong J. H. T., Brown R. S., 1995, Enzyme or Protein Immobilization Techniques for Application in Biosensor Design, Trends in Biotechnology, (13), 178-185.

Sharma S. K., Sehgal N., Kumar A., 2003, Biomolecules for Development of Biosensor and their Applications, Current Applied Physics, (3), 307-316.

Sidwell, J.S., Rechnitz, G.A., 1986, Progress and Challenges for Biosensors Using Plant Tissue Materials, Biosensors, 221-233

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

Telefoncu A., 1999a, Biyosensörlere Genel Bakış, Biyosensörler (Ed. Azmi Telefoncu), Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir, 1-9.

Timur, S., Pazarlıoğlu, N., Pilloton, R., Telefoncu, A., 2003, “Detection of Phenolic Compounds by Thick Film Sensors Based on *Pseudomonas Putida*”, Talanta, 61, 87-93

Topçu, S., Sezgintürk, M.K., Dinçkaya, E., 2004, Evaluation of a new biosensor- based mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate: Investigation of certain phenolic compounds and some inhibitor effects, *Biosensors and Bioelectronics* 20, 592-597

Turner, A.P.F., “Biosensors: Fundamentals and Applications” Ed: Turner A.P.F., Karube, I. And Wilson, G.S., Oxford University Press (1987) , Oxford, Sayfa 5-7

TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi, ABD Kalp Derneği Basın Bülteni, Kasım 2005

TS 5389, Kafein Miktar Tayini

Uddike, S.J., Hicks, G.P., 1967, “The Enzyme Electrode”, *Nature*, 214, 986-988

Uslan, A.H., 1999, İmmunosensörler, Biyosensörler (Ed. Azmi Telefoncu), 194-205

Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Shirashi, H., Dontha, N., Luo, D., Valera, F.S., 1997a, Sequence – Specific Electrochemical Biosensing of M. Tuberculosis DNA, *Anal. Chem. Acta.*, 337: 41-48

Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Palecek, E., Nielsen, P., Shirashi, H., Dontha, N., Luo, D., Parrado, C., Chicharro, M., farias, P.A.M., Valera, F.S., Grant, D.H., Ozsoz, M., Flair, M.N., 1997b, DNA Electrochemical Biosensors Environmental Monitoring, A review, *Anal. Chem. Acta.*, 347: 1-8

Wang, J., Nielsen, P., Jiang, M., Cai, X., Fernandes, J.R., Grant, D.H., Ozsoz, M., Beglieter, A., Mowat, M., 1997c, Mismatch Sensitive Hybridization Detection by Peptide Nucleic Acids Immobilized on a Quartz Crystal Microbalance, *Anal. Chem. Acta.*, 69: 5200-5202

Wang, J., Rivas, G., Nielsen, T.W., Fernandes, J.R., Jiang, M., Paz, J.L.L., Waymire, R., Getts, R.C., 1998, Adsorption and Detection of DNA Dendrimers at Carbon Electrodes, *Electroanalysis*, 10 (8): 553-556

Yıldız, A., 1999, Elektrokimyasal Biyosensörler, Biyosensörler (Ed. Azmi Telefoncu) 66-80, Ege Üniversitesi Yayınları

<http://www.cellscience.com>

<http://www.mumcu.com>

<http://www.turkiyedoktorlari.com>

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

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

sci.ege.edu.tr/~eubio/yaz_okulu/biyosensor.htm

<http://www.kiriktabak.com>

ÖZGEÇMİŞ

29 Mart 1978 tarihinde İstanbul'da doğdum. 1988 yılında Kılıçarslan İlkokulu'ndan, 1991 yılında Lüleburgaz Ortaokulu'ndan mezun oldum. Lüleburgaz Lisesi'ni bitirdiğim 1994 yılında Trakya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'ne girmeye hak kazandım. 1998 yılında mezun olduktan sonra Mebal Tekstil Fabrikası'nda Proses Kontrol Sorumlusu olarak bir yıl görev aldım. 2000-2001 yılları arasında Zorlu-Korteks Tekstil Fabrikası'nda İşletme Mühendisi olarak çalıştım. Ardından 4 yıl boyunca Özel Eğitim Kurumları'nda Kimya Öğretmeni olarak görev aldım. 2007-2009 yıllarında Kırklareli Üniversitesi Lüleburgaz Meslek Yüksekokulu Kimya Programı'nda Serbest Öğretim Görevlisi olarak görev aldım.

2008 yılı Şubat ayında Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans yapmaya hak kazandım.