

**GIDA ÜRÜNLERİNDE MİKROBİYAL BOZULMAYA
NEDEN OLAN *PSEUDEOMONAS* SPP. BAKTERİSİNİN
YÜZEY PLAZMON REZONANS (SPR) TEMELLİ
BİYOSENSÖR KULLANILARAK BELİRLENMESİ**

**DETERMINATION OF *PSEUDOMONAS* SPP BACTERIA
THAT CAUSE MICROBIAL DETERIORATION IN FOOD
PRODUCTS USING SURFACE PLASMON RESONANCE
(SPR) BASED BIOSENSORS**

TUĞÇE YILMAZ

PROF. DR ADİL DENİZLİ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

GIDA ÜRÜNLERİNDE MİKROBİYAL BOZULMAYA NEDEN OLAN PSEUDEOMONAS SPP. BAKTERİSİNİN YÜZEY PLAZMON REZONANS (SPR) TEMELLİ BİYOSENSÖR KULLANILARAK BELİRLENMESİ

Tuğçe YILMAZ

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof Dr. Adil DENİZLİ

Haziran 2021, 111 sayfa

Beslenme, bireylerin sağlıklı ve kaliteli yaşam koşullarına devam edebilmeleri için ihtiyaçları olan besin öğelerini yeterli ve dengeli miktarlarda almasıdır. 2050 yılında 9 milyarı aşması beklenen dünya nüfusunun beslenme ihtiyaçlarının karşılanabilmesi için, küresel mücadele başlatılmış ve ülkeler artan beslenme talebi için gıda üretimini endüstriyellemiştir. Gıda üretiminde gelişen teknoloji, çevre kirliliği, küreselleşme sürecinde değişen tüketim alışkanlıkları, eğitim ve gelir düzeyinin düşüklüğü taşeronlaşma gıda üretim birimlerinde gerekli fiziki yatırımların yapılmaması gibi nedenlerden dolayı bireylerde, endüstriyel gıdalara karşı güvensizlik olmuştur. Gıda güvenliği, gıdada oluşabilecek fiziksel, kimyasal ve biyolojik zararların engellenmesi için alınan tedbirlerin bütünüdür. Dünya nüfusunun %17.2'sinin gıdaya karşı güvensizlik yaşadığı ve gıda güvensizliğinin en önemli nedenlerinden birisinin gıda bozulması nedeniyle karşılaşılan gıda zehirlenmelerine bağlı olduğu bilinmektedir.

Tüketim amaçlı gıdalarda kalitenin ve güvenilirliğin korunabilmesi için gıda ürünlerinin belirli sürelerde belirli depolama koşullarında muhafaza edilmesi gerekmektedir. Taze tahıl ürünlerinde, et ve et ürünlerinde, süt ve süt ürünlerinde, meyve ve sebzelerde raf ömrü olarak belirlenen gıda muhafaza süresi sonunda genellikle kötü koku, lezzet, renk ve dokuda değişikliklere neden olan protein, karbohidrat, yağlar, çeşitli organik asitler, alkoller, aldehitler, selüloz ve pektin gibi bileşiklerin yıkılması sebebiyle gıdalar da mikrobiyolojik, otolitik-enzimatik ve oksidatif bozulma süreci gözlemlenmektedir. Yapılan farklı araştırmalarda, gıda ürünlerinde bozulmaya neden olan en önemli bakteri popülasyonunun Psikrotrof olarak adlandırılan mikroorganizmalardan, özellikle *Pseudomonas* spp. tarafından gerçekleştiğini rapor etmişlerdir.

Pseudomonas türleri, su, toprak ve bitkilerle yaygın olarak bulunması nedeniyle yumurta, et, süt, kümes hayvanları, deniz ürünleri ve sebzeler gibi taze yiyeceklerle kontamine olmaktadır. Psikrotrof grupta yer alan *Pseudomonas* bakterileri, enerji kaynağı olarak karbonhidrat yerine, asitler, amino asitler, lipidler, pektin, peptitler, proteinler ve triasilgliserelleri kullanabilmeleri nedeniyle özellikle soğutulmuş gıdalarda önemli mikrobiyal bozuculardır. Mikrobiyallerin insan sağlığı üzerindeki etkileri göz önüne alındığında, mikrobiyal tespitin hızlı tanı ve tespiti, gıda kaynaklı hastalıkların kontrolü için kritik öneme sahiptir.

Yüzey plazmon rezonans biyosensörler günümüzde, geleneksel kültürel yöntemlere alternatif olarak kullanılabilir yöntemlerdendir. Moleküler baskılanmış polimer temelli yüzey plazmon rezonans biyosensörler; düşük maliyetli, hızlı ve kaliteli tespit, yetkin personel gerektirmeyen yüksek analiz hassasiyetine sahip olması ve herhangi işaretleme basamağına ihtiyaç duymadan, eş zamanlı olarak ölçüm yapabilmeleri, Yüzey plazmon rezonans (SPR) temelli biyosensörlerin mikrobiyal tespitlerde kullanımının önemini artırmıştır.

Yapılan çalışmada, *Pseudomonas* spp. bakterisinin tespiti ve kantitatif analizinin yapılabilmesi için Moleküler baskılanmış polimer temelli yüzey plazmon rezonans biyosensör hazırlanmıştır. Mikrotemas baskılama metodu ile oluşturulan polimer yapı, SPR sensör yüzeyine baskılanmıştır. Hazırlanan moleküler baskılanmış polimer temelli yüzey plazmon biyosensörde etkin baskılanma işlemlerinin kontrolü için, karakterizasyon analizleri yapılmıştır.

Biyosensörün, seçicilik, afinitesi, tekrar kullanılabilirliği ve bağlanma-ayırılma hız kinetiğinin belirlenebilmesi için baskılanmış ve baskılanmamış polimer temelli biyosensörlerde karşılaştırmalı çalışmalar yapılmıştır. *Pseudomonas* spp. bakterisinin analizinde kullanılan kültürel yöntem ve hazırlanılan MIP temelli SPR biyosensörüne ait verilerin güvenilirliği ve doğrulunun karşılaştırılabilmesi için, piliç bonfile ürününde eş zamanlı Ankara Gıda Kontrol Laboratuvarında yapılan kültürel metot ile SPR biyosensöründe elde edilen veriler değerlendirilmiştir.

Tez çalışmasında elde edilen verilere göre, hazırlanılan *Pseudomonas* spp, baskılanmış yüzey plazmon rezonans biyosensörün etkin baskılama kalitesi, seçiciliği ve afinitisine sahip olmasının yanı sıra, güncel olarak tercih edilen kültürel yöntem alternatif olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelime: Beslenme, Gıda güvenliği, Mikrobiyal Bozulma, *Pseudomonas* spp, Moleküler Baskılanmış Polimer, Yüzey Plazmon Rezonans.

ABSTRACT

DETERMINATION OF *PSEUDOMONAS* SPP BACTERIA THAT CAUSE MICROBIAL DETERIORATION IN FOOD PRODUCTS USING SURFACE PLASMONIC RESONANCE (SPR) BASED BIOSENSORS

Tuğçe YILMAZ

Master of Science, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof Dr. Adil DENİZLİ

June 2021, 111 pages

Nutrition is the intake of the nutrients they need in sufficient and balanced amounts in order to maintain healthy and quality living conditions. In order to meet the nutritional needs of the world population, which is expected to exceed 9 billion in 2050, a global struggle has been started and countries have industrialized food production so that food can meet the needs of the population. Industrialization caused insecurity against food due to reasons such as developing technology in food production, environmental pollution, changing consumption habits in the globalization process, low level of education and income, subcontracting, and lack of necessary physical investments in food production units. Food safety is the totality of measures taken to prevent physical, chemical and biological damages in food. It is known that 17.2% of the world population is insecure about food and one of the most important causes of food insecurity is due to food poisoning due to food spoilage.

In order to maintain the quality and reliability of food for consumption, food products must be stored under certain storage conditions for certain periods of time. Fresh cereal products, meat

and meat products, milk and dairy products, fruits and vegetables, protein, carbohydrate, fats, various organic acids, alcohols, aldehydes, which usually cause malodor, flavor, color and texture changes at the end of the shelf life. Due to the breakdown of compounds such as cellulose and pectin, microbiological, autolytic-enzymatic and oxidative deterioration processes are observed in foods. They reported that it was realized by.

Pseudomonas species are contaminated with fresh foods such as eggs, meat, milk, poultry, seafood and vegetables due to their widespread presence with water, soil and plants. *Pseudomonas* bacteria, which are in the psychrotroph group, are important microbial disruptors, especially in refrigerated foods, as they can use acids, amino acids, lipids, pectin, peptides, proteins and triacylglycerels as energy sources instead of carbohydrates.

In order to accelerate industrial production and to meet the consumption needs of a sufficient amount of reliable food, techniques that allow fast, reliable and precise determinations are required in order to determine food quality and contaminated products. Rapid diagnosis and detection in food products is critical for foodborne disease control.

Surface plasmon resonance biosensors are among the methods that can be used today as an alternative to traditional cultural methods. Molecular imprinted polymer based surface plasmon resonance biosensors; Because of its low cost, fast and high quality detection, not requiring competent personnel and having high analysis sensitivity, the ability of surface plasmon resonance (SPR) based biosensors to measure simultaneously without the need for any marking step has increased the importance of their use in microbial detections.

In the study, *Pseudomonas* spp. Molecularly imprinted polymer-based surface plasmon resonance biosensor has been prepared in order to perform quantitative analysis of bacteria bacteria simultaneously. The polymer structure is imprinted on the SPR sensor surface with the microcontact printing method. Characterization analyzes were carried out in order to control the effective suppression processes in the prepared molecular imprinted polymer-based surface plasmon biosensor. In order to determine the selectivity, affinity, reusability and binding-dissociation rate kinetics of the biosensor, comparative studies were carried out in suppressed and non-suppressed polymer-based biosensors. *Pseudomonas* spp. In order to compare the

reliability and accuracy of the cultural method used in the analysis of the bacteria bacteria and the prepared MIP-based SPR biosensor, the data obtained in the SPR biosensor with the cultural method performed simultaneously in the Ankara Food Control Laboratory in the chicken fillet product were evaluated.

According to the data obtained in the thesis study, the prepared *Pseudomonas* spp, suppressed surface plasmon resonance biosensor can be used as an alternative to the current cultural method, as well as having effective suppression quality, selectivity and affinity.

Keywords: Nutrition, Food safety, Microbial Spoilage, *Pseudomonas* spp, Molecular Imprinted Polymer, Surface Plasmon Resonance.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitime başladığım ilk günden itibaren beni laboratuvarına kabul eden, bana bambaşka bir dünyanın kapılarını açan, bilimi bu kadar çok sevmemde çok büyük katkısı olan, desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, kendisinden bilimsel olarak çok fazla şey öğrendiğim, değerli katkılarından ötürü, değerli hocamlarım Prof. Dr. Adil Denizli'ye, Doç. Dr. Deniz Türkmen'e, Monireh Bakhshpour'a sonsuz teşekkür ederim

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1 <i>Pseudomonas</i> spp.	6
2.2 Moleküler Baskılama.....	13
2.2.1 Moleküler Baskılama Teknolojisi ve Çeşitleri.....	14
2.2.2 Moleküler Baskılama Tekniğinde Kullanılan Materyaller.....	16
2.2.3 Moleküler Baskılama Teknolojisinde Kullanılan Baskılama Teknikleri.....	20
2.2.4 Moleküler Baskılama Teknolojisinde Kullanılan Polimerizasyon Çeşitleri	22
2.2.5 Moleküler Baskılama Teknoloji İle Hazırlanan Polimerlerin Kullanım Alanları	27
2.3 Biyosensörler.....	29
2.3.1 Biyosensörlerin Temeli ve Çeşitleri.....	32
2.3.2 YüzeY Plasmon Rezonans Biyosensör	35
3. KİMYASAL DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	43
3.1 Kimyasal Malzemeler.....	43
3.2 Ekipmanlar.....	43
3.3 Deneysel Yöntemler	46
3.3.1 Fonksiyonel Monomer Sentezi ve Karakterizasyonu.....	46
3.3.2 Ön-Kompleks Hazırlanması.....	47

3.3.3	Nanofilm Temelli SPR Biyosensörlerin Hazırlanması	47
3.3.4	SPR Çipin Yüzey Modifikasyonu	48
3.3.5	Nanofilm Temelli Baskılanmış ve Baskılanmamış SPR Biyosensörlerin Karakterizasyonu	50
3.3.6	Nanofilm Temelli SPR Biyosensörler İle Kinetik Analizler.....	50
3.3.7	Nanofilm Temelli SPR Biyosensörün Tekrarlanabilirliğinin İncelenmesi	51
3.3.8	Nanofilm Temelli SPR Biyosensörlerin Baskılama Seçiciliğinin İncelenmesi .	51
3.3.9	Nanofilm Temelli SPR Biyosensörün Gerçek Örnek Analizi.....	52
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	54
4.1	Fonksiyonel Monomerinin Karakterizasyonu	54
4.2	Nanofilm Temelli SPR Biyosensörlerin Karakterizasyonu.....	54
4.3	Nanofilm Temelli SPR Biyosensörler ile Kinetik Analizler	57
4.4	Nanofilm Temelli SPR Biyosensörlerinin Seçiciliğinin İncelenmesi	62
4.5	Nanofilm Temelli SPR Biyosensörün Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi	67
4.6	Nanofilm Temelli SPR Biyosensörün Gerçek Örnek Analizleri.....	68
5.	YORUM.....	76
6.	KAYNAKLAR	81
7.	EKLER.....	93
7.1	EK 6 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	93
8.	ÖZGEÇMİŞ	94

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Pseudomonas</i> spp. cinsi bakterilerin habitat üzerindeki dağılımları.	6
Şekil 2.2. Moleküler baskılanmış polimer tasarımı.	15
Şekil 2.3. Fonsiyonel monomeler.	17
Şekil 2.4. Çapraz bağlayıcılar.	18
Şekil 2.5. Kimyasal başlatıcılar.....	19
Şekil 2.6. Moleküler baskılama teknikleri.	20
Şekil 2.7. Kovalent ve kovalent olmayan baskılama teknikleri.	21
Şekil 2.8. Yığın polimerizasyon prosesi.	23
Şekil 2.9. Süspansiyon polimerizasyon prosesi.	25
Şekil 2.10. Yüzey baskılama prosesi.	26
Şekil 2.11. Moleküler baskılanmış polimerlerin uygulama alanları.	27
Şekil 2.12. Biyosensörlerin yapıları.	30
Şekil 2.13. Bisensörlerin kullanıldığı farklı uygulama alanları.	31
Şekil 2.14. Biyosensör çeşitleri.	32
Şekil 2.15. Yüzey plazmon rezonans çalışma prensibi.	35
Şekil 2.16. Yüzey plazmon rezonans çalışma prensibi.	36
Şekil 2.17. Yüzey plazmon rezonans biyosensörlerin kırılma indisinin gösterimi.	37
Şekil 2.18. Kırılma açısının zamana bağlı değişimi sensörgram grafiğinde eş zamanlı gösterimi.	38
Şekil 2.19. Yüzey plazmon rezonans ölçüm aşamaları.	39
Şekil 2.20. Bakteri analizinde kullanılan tespit yöntemleri.	41
Şekil 3.1. FTIR-ATR spektrofotometre cihaz görseli.	44
Şekil 3.2. Elipsometre cihaz görseli.	45
Şekil 3.3. Temas açısı ölçüm cihaz görseli.	45
Şekil 3.4. Yüzey plazmon rezonans (SPR) cihazgörseli.	46
Şekil 4.1. MIP: (A), NIP: (B) nanofilm temelli SPR biyosensörlerin temas açısı ölçümleri. .	55
Şekil 4.2. MIP: (A), NIP: (B) nanofilm temelli SPR biyosensörlerin elipsometre görüntüleri.	56
Şekil 4.3. MIP nanofilm temelli SPR biyosensörlerin SEM görüntüleri.	57
Şekil 4.4. Farklı derişimlerdeki <i>Pseudomonas</i> spp. çözeltileri ve MIP nanofilm temelli SPR biyosensör arasındaki etkileşimlerin zamana göre kırılma değerleri.	58

Şekil 4.5. Nanofilm temelli SPR biyosensörü için adsorpsiyon Freundlich izoterm modeli... 60	60
Şekil 4.6. Nanofilm temelli SPR biyosensörü için adsorpsiyon Langmuir izoterm modeli. ... 61	61
Şekil 4.7. Nanofilm temelli SPR biyosensörü için adsorpsiyon Langmuir- Freundlich izoterm modeli..... 61	61
Şekil 4.8. MIP ve NIP nanofilm temelli SPR biyosensörlerinin 1×10^4 kob/mL derişiminde, zamana karşı verdiği kırılma değeri (%). 64	64
Şekil 4.9. MIP SPR biyosensörlerinin <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella paratyphi</i> ve <i>Escherichia coli</i> bakterilerinin 1×10^4 kob/mL derişiminde, zamana karşı verdiği kırılma değeri (%). 66	66
Şekil 4.10. A. MIP nanofilm temelli SPR biyosensörlerinin tekrarlanabilirliği, B. Farklı Aylarda MIP nanofilm temelli SPR biyosensörlerinin tekrarlanabilirliği. 68	68
Şekil 4.11. MIP nanofilm temelli SPR Biyosensörünün, Piliç Bonfile ürünündeki 2., 5., 8., 10., 12., ve 15. günlerindeki sensorgramın doğrusal garfiği. 69	69
Şekil 4.12. MIP nanofilm temelli SPR Biyosensörünün, Piliç Bonfile ürünündeki 2., 5., 8., 10., 12., ve 15. günlerindeki sensorgram garfiği..... 70	70

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Kültürel yöntem avantajları ve dezavantajları	4
Çizelge 2.1.	Et ve et ürünlerinde <i>Pseudomonas</i> spp. maksimum ve minimum değerleri (kob/g).	9
Çizelge 2.2.	Tavuk eti ürünlerinin, 3 farklı paketlenme sisteminde 1.2±1 C'deki 8 günlük analiz sonuçları (kob/g).	10
Çizelge 2.3.	Piliç etinin kesim işlem basamaklarında, 10. ve 14. günlerdeki <i>Pseudomonas</i> sonuçları (kob/g).	10
Çizelge 2.4.	4 farklı gruba ayrılan tavuk eti numunelerinin et üzerindeki 0. 3. ve 8. günlerdeki %'lik dağılımları.	11
Çizelge 2.5.	Steril tam yağlı sütte, 0-24-48-72-96 saatlerdeki <i>Pseudomonas</i> spp. bakteri değerleri (kob/g).	12
Çizelge 2.6.	Yapılan 7 farklı çalışmadaki saptanan bakteri değerleri (kob/g).	12
Çizelge 2.7.	Yapılan 6 farklı çalışmadaki saptanan bakteri değerleri (kob/g).	13
Çizelge 2.8.	MIP'in katı faz ekstraksiyon uygulamaları.	28
Çizelge 2.9.	MIP'in kromatografik uygulamaları.	28
Çizelge 2.10.	MIP'in sensör uygulamaları.	29
Çizelge 2.11.	Elektrokimyasal sensör uygulamaları.	33
Çizelge 2.12.	Optik biyosensör uygulamaları.	34
Çizelge 2.13.	Piezoelektrik biyosensör uygulamaları.	34
Çizelge 2.14.	Yüzey plazmon rezonans sensörlerin bakteri tayininde kullanımı hakkında yapılan çalışmalar.	42
Çizelge 4.1.	Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich adsorpsiyon izoterm modellerinin hesaplaması.	62
Çizelge 4.2.	MIP SPR biyosensörlerinin <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella paratyphi</i> and <i>Escherichia coli</i> bakterileri için seçicilik (k) ve bağıl seçicilik (k') katsayıları.	63
Çizelge 4.3.	Piliç bonfile ürününde farklı günlerde yapılan kültürel yöntem ve MIP SPR biyosensöre ait <i>Pseudomonas</i> spp. analiz sonuçları.	71
Çizelge 4.4.	Biyosensör temelli cihazlarla tespit edilen <i>Pseudomonas</i> bakterilerine ait literatür çalışmaları.	72

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Kob	Koloni Oluşturan Birim
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
g	Gram
mg	Miligram
cm	Santimetre
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
mM	Milimolar
°C	Santigrat
H ₂ S	Hidrojen sülfür
ppm	Milyonda bir
CO ₂	Karbondioksit
C	Karbon
mV	Milivolt
Eh	Redoks Potansiyeli
PCA	Plate Count Agar
CFC	Cetrimide Fucidin Cephaloridine Agar
log	Logaritma
Cu	Bakır
NaOH	Sodyum hidroksit

HCl	Hidroklorik Asit
W	Watt
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
H	Proton
ΔR	Delta kırılma
Rmaks	Maksimum SPR sinyal kayması
C	Analit derişimi (RU/mL),
ka	Bağlanma hız sabiti (RU/mL.s)
kd	Ayrılma hız sabiti (1/s)
KA	Bağlanma sabiti (RU/mL)
KD	Ayrılma sabiti (mL/RU)
1/n	Freundlich yüzey heterojenite indeksi
k	Seçicilik katsayısı
k'	Bağlı seçicilik katsayısı
t	Zaman

Kısaltmalar

FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
ABD	Amerikan Birleşik Devletleri
SPR	Yüzey plazmon rezonans
MIP	Moleküler Baskılanmış Polimerler
SPE	Katı Faz Ekstraksiyonu
NIP	Moleküler Baskılanmamış Polimerler

HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
GC-MS	Gaz Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi
QCM	Kuvars Kristal Mikrodenge
MAH	N-Metakriloil-(L)-histidin metil ester
FTIR-ATR	Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi-Azaltılmış Toplam Yansıma
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
H-NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans
SEM	Taramalı Elektron Mikroskop
AIBN	Azobisisobütironitril
EGDMA	Etilen Glikol Dimetakrilat
APTES	Aminopropil-Trietoksisilan
GA	Gluteraldehit
PBS	Fosfat Tamponlu Çözelti
UV	Ultraviyole
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
cDNA	Tamamlayıcı Deoksiribo Nükleik Asit
LPS	Lipopolisakkarit
PHB	Poli-B-Hidroksibutirat
LOD	Tespit Limiti
THF	Tetrahidrofur
DMF	N, N-Dimetilformamid
ATCC	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
LSPR	Lokalize Yüzey Plazmon Rezonans

MI-MSPD Matris Katı Faz Dağılımı
PDA-PEI Polidopamin-Polietilenimin

1. GİRİŞ

Beslenme, bireylerin sağlıklı ve kaliteli yaşam şartlarına devam edebilmeleri için ihtiyacı olan besin öğelerinin yeterli ve dengeli miktarlarda almasıdır. Günümüzde yetersiz beslenmenin insanlık üzerindeki olumsuzlukları, farklı etkiler ile kendisini göstermektedir. Dünya nüfusunun yaklaşık %30'u temel besin öğelerini yeterli düzeyde alamamasına bağlı sağlık problemleriyle mücadele etmektedir. Hastalık yükünün yarısından fazlası açlığa, dengesiz ve yetersiz vitamin ve mineral alınımına bağlanabilmektedir. Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)'a göre, dünyadaki yetersiz beslenen birey sayısı 2017'de 821 milyona yükselerek, insan yaşamının kaliteli ve sosyal gelişimindeki olumsuz etkilerinin yanı sıra yıkıcı hastalık ve ölümcül etkilere neden olmaktadır.

Dünya genelinde beslenme sorununa problemine uygun müdahale ile çözüm önerileri geliştirilmektedir. Birleşmiş Milletler 2030 gündemi dahilinde kimsenin geride bırakılmadığı bir dünya inşa etmek için açlığı sona erdirmeye, gıda güvenliğini sağlama, beslenmeyi iyileştirme ve sürdürülebilir tarımı teşvik etmek için Sürdürülebilir Kalkınma Hedef 'iyle açlık ve kötü beslenmeye karşı küresel mücadeleye başlamıştır [1].

Küresel nüfusun 2050 yılına kadar en az 9 milyara ulaşması ve artan nüfusun beslenme ihtiyacının karşılanması için mevcut gıda kaynaklarından %70'den daha fazla gıda talebi oluşması beklenmektedir. Bu nedenle gıda ihtiyacının yeterli düzeyde karşılanabilmesi için gıda endüstrisi büyük önem kazanmıştır. Ülkeler, gıda üretiminde sadece kendi ihtiyaçlarını göz önünde tutmakla yetinmeyip, insanlık refahı için, gıda üretimine elverişli bulunan bütün imkânlarını kullanmak ihtiyacı duymaktadırlar. Gıda üretim sistemlerinin ve gıda zincirinin tamamen sürdürülebilir olması bir dizi problemi de beraberinde getirmektedir. Gıda endüstriyellesmesinin yaygınlaşmasıyla, gıda tedarik zincirlerinin karmaşıklığının artması, çevresel kısıtlamalar, büyüyen yaşlanan bir nüfus, tüketici tercihlerinin değişmesi ve gıda tüketiminin de dahil olduğu pek çok problemi ortaya çıkarmıştır.

Gıda üretim sistemlerinde karşılaşılan en önemli sorunlardan birisi de gıda güvensizliğidir. Gıda güvenliği tüm insanların sağlıklı ve aktif yaşamlarını sürdürebilmeleri için her zaman yeterli güvenli besin değeri yüksek gıdalara ulaşabilmeleri olarak tanımlanmaktadır. Gıda

güvenliğine ilişkin riskler, gelişen teknolojiye bağlı çevre kirliliği, küreselleşme sürecinde değişen tüketim alışkanlıkları, eğitim ve gelir düzeyinin düşüklüğü, taşeronlaşma, gıda üretim birimlerinde gerekli fiziki yatırımların yapılmaması ve nüfus artışı gibi nedenlerle artmaktadır.

Toplumlar yetersiz doğal gıda kaynağı eksikliğine bağlı beslenme problemleriyle mücadele ederken bir yandan da gıda kaynağı elde etmek amacıyla geliştirilen gıda endüstrine karşı oluşan güvensizlik problemleriyle de mücadele etmektedir. Son tahminlere göre, dünya nüfusunun %9.2'si (700 milyondan fazla kişi) 2018'de şiddetli gıda güvensizliğine maruz kalmıştır ve bu durum gıda güvensizliği yaşayan bireylerin besin kaynaklarından yeterli düzeyde faydalanamadığı anlamına gelmektedir.

Gıda güvensizliğinin şiddetli seviyeleri ve açlık ötesindeki boyutu, dünya nüfusunun %17.2'sinin ya da 1.3 milyar insanın ek düzeyde gıda güvensizliği yaşadığını, yani besleyici ve yeterli gıdaya düzenli erişemediklerini göstermektedir [2]. Tüm ülkeler, ulusal gıda kaynaklarının güvenli, iyi kalitede olmasını ve tüm nüfus grupları için kabul edilebilir bir beslenme ve sağlık durumu sağlamak için uygun fiyatlarla yeterli miktarda temin edilmesini sağlamak için yeterli gıda kontrol programlarına ihtiyaç duymaktadır. Gıda kontrolü, gıdaların kalite, güvenlik ve dürüst sunumunu sağlamak için birincil üretimden işleme, depolamaya, pazarlama ve tüketime kadar tüm faaliyetleri içerir. Gıda kontrolü, hükümetler arasında bütüncül bir yaklaşımı içeren toplam ulusal çabayı tanımlamak için kullanılmıştır. Gıda endüstrisinin tüm bölümleri ve sektörleri, gıda kontrolü, nüfus sağlığının iyileştirilmesi, bir ülkenin ekonomik kalkınması potansiyeli ve bozulma ve gıda kayıplarının azaltılması ile bağlantılıdır.

Gıdalarda olabilecek fiziksel, kimyasal, biyolojik her türlü zararın ortadan kaldırılması için alınan tedbirlerin bütünü gıda güvenliği olarak tanımlanmaktadır. Gıda Güvenliği, gıdaların üretiminden son tüketiciye güvenli bir şekilde ulaşması için gereken bütün aşamaları prosesleri kapsamaktadır. Küresel dünyada artan gıda güvensizliğinin, nedenlerinden biri de gıda bozulmasına bağlı karşılaşılan gıda zehirlenmelidir. Kontamine olmuş gıdalar nedeniyle ortaya çıkan hastalık ve zehirlenmeler ciddi sağlık sorunları ve iş gücü kaybı yanında tedavi giderleri nedeniyle de önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Dünya Bankası tarafından yapılan

bir araştırmaya göre, düşük ve orta gelirli ülkelerdeki gıda kaynaklı hastalıklar yılda en az 100 milyar ABD Doları maddi kayba neden olmaktadır, bu maliyetin 28 ülke için 500 milyon ABD dolarını aştığı belirtilmiştir [3]. Dünyada FAO verilerine göre yıllık et üretiminin %20 sinde (263 milyon ton) gıda kaybı ile karşılaşılmaktadır [4]. Dünya genelinde yıllık ortalama, 122 milyon ton tavuk üretilmektedir ve bunların %80'i taze ürün olarak pazarlanmaktadır. Taze tavuk etinde bozulmaya bağlı üretim %2 ile %4'ünün imha edildiği tahmin edilmektedir [5,6].

Tüketim amaçlı üretilen gıdalarda kalitenin ve güvenirliğinin korunabilmesi için gıda ürünlerinin belirli sürelerde belirli depolama koşullarında muhafaza edilmesi gerekmektedir. Taze tahıl ürünleri, et ve et ürünleri, süt ve süt ürünleri, meyve ve sebzeler raf ömrü olarak belirlenen gıda muhafaza süresi sonunda genellikle kötü koku, lezzet, renk ve dokuda değişikliklere neden olan protein, karbohidrat, yağlar, çeşitli organik asitler, alkoller, aldehitler, selüloz ve pektin gibi bileşiklerin yıkılması sebebiyle gıdalar da mikrobiyolojik, otolitik-enzimatik ve oksidatif bozulma süreci gözlemlenmektedir [7].

Et ve et ürünlerinin su aktivite oranının fazla olması nedeniyle bozulma süreci daha hızlı gerçekleşmektedir. Yapılan farklı araştırmalarda, et ve et ürünlerinde bozulmaya neden olan en önemli bakteri popülasyonunun Psikrotrof olarak adlandırılan mikroorganizmalar, özellikle *Pseudomonas* spp. tarafından gerçekleştiğini rapor etmişlerdir [8].

Pseudomonas türleri, su, toprak ve bitkilerle yaygın olarak bulunması nedeniyle yumurta, et, süt, kümes hayvanları, deniz ürünleri ve sebzeler gibi taze yiyeceklerle kontamine olmaktadır. Psikrotrof grupta yer alan *pseudomonas* bakterileri, enerji kaynağı olarak karbohidrat yerine, asitler, amino asitler, lipidler, pektin, peptitler, proteinler ve triailgliserollerini kullanabilmeleri nedeniyle özellikle soğutulmuş gıdalarda önemli mikrobiyal bozuculardır [8].

Gıda florasında önemli yere sahip olan *Pseudomonas* bakteri türlerinin kontamine gıdadaki miktarının belirlenmesi gıdanın kalitesini belirlemede önemli bir etmendir. *Pseudomonas* spp bakterisinin tespitinde tercih edilen en yaygın metot kültürel yöntemdir. Et ve et rnlerinde *Pseudomonas* spp analizinin kültürel yöntem ile analizi toplamda 2 günde tamamlanmaktadır.

Gıdalardaki bakteri türlerinin tespit etmeye yönelik kullanılan geleneksel kültürel yöntemler; besleyici ortamda canlı bakteri büyümesine dayanır. Gıda ürünlerinin kültürel analizinde, numune homojen hale getirilir, sonrasında türe özgü besiyeri ortamında kültüre (çoğaltılması) edilir ve bakterinin varlığının kesinleştirilebilmesi için biyokimyasal test uygulanır.

Kültürel bakteri tanıma metotları, teknik ve yetkin personele ihtiyaç duyulan biyokimyasal testlerden oluşması ve bu yöntemlerin analiz ortam, personel yetkinliği gibi farklı koşullara bağlı olarak uzun sürede tamamlanması, yüksek analiz maliyetine neden olması ve analizin tekrarlanabilirliğinde sorunlarla karşılaşılması gibi dezavantajlara sahiptir [9]. Kültürel yöntemle yapılan çalışmaların avantajları ve dezavantajları Çizelge-1’de gösterilmektedir.

Çizelge 1.1. Kültürel yöntem avantajları ve dezavantajları

Avantajları	Dezavantajları
Kültürelenebilir mikroplar	Kontaminasyon riski
Bir numunedeki canlı hücreleri tanıyabilirlik	Personel yetkinliği
Analiz yönteminin kolay olması	Analiz tamamlanma süresinin uzun olması
Uygun ortam ile yüksek hassasiyet	Fenotipik biyokimyasal karakterizasyona ihtiyaç duyulması

Endüstriyel üretimin hız kazanması ve yeterli miktarda güvenilir gıdanın tüketim ihtiyaçlarına cevap verilebilmesi için, gıda kalitesinin ve kontamine ürünlerin belirlenebilmesi için hızlı, güvenilir ve hassas tespitlere olanak sağlayan tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Gıda ürünlerinde hızlı tanı ve analiz, gıda kaynaklı hastalık kontrolü için kritik öneme sahiptir.

Biyosensörler günümüzde, geleneksel kültürel yöntemlere alternatif olarak kullanılabilen yöntemlerdendir. Biyosensör temelli yöntemler; yetkin personel gerektirmeyen, hızlı tespit ve yüksek analiz hassasiyetine sahiptir. Yüzey plazmon rezonans (SPR) temelli biyosensörlerin herhangi işaretleme basamağına ihtiyaç duymadan, eş zamanlı olarak ölçüm yapabilmesi, mikrobiyal tespitlerde kullanımının önemini artırmıştır.

Tez çalışması kapsamında; *Pseudomonas* spp. bakterisinin eş zamanlı kantitatif analizinin yapılabilmesi için moleküler baskılanmış polimer temelli yüzey plazmon rezonans biyosensör hazırlanmıştır. Mikrotemas baskılama metodu ile polimer yapı, SPR sensör yüzeyine baskılanmıştır. Hazırlanan moleküler baskılanmış polimer temelli yüzey plazmon biyosensörde etkin baskılanma işlemlerinin kontrolü için, karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Biyosensörün, seçicilik, afinitesi, tekrar kullanılabilirliği ve bağlanma-ayrılma hız kinetiğinin belirlenebilmesi için baskılanmış ve baskılanmamış polimer temelli biyosensörlerde karşılaştırmalı çalışmalar yapılmıştır. *Pseudomonas* spp. bakterisinin analizinde kullanılan kültürel yöntem ve hazırlanan MIP temelli SPR biyosensörüne ait verilerin güvenilirliği ve doğruluğunun karşılaştırılabilmesi için, piliç bonfile ürünüde eş zamanlı Ankara Gıda Kontrol Laboratuvarı'nda yapılan kültürel metot ile SPR biyosensöründe elde edilen veriler değerlendirilmiştir.

Elde edilen verilere göre; hazırlanan nanofilm temelli biyosensör $1.0 \times 10^2 - 1.0 \times 10^4$ kob/mL aralığında doğruluğu %99 ve tayin limiti 0.50×10^2 kob/mL olarak tespit edilmiştir.

Adsorpsiyon izoterm modelleriyle yapılan hesaplar sonucunda, yüzeyindeki etkileşimler; tek tabakalı, homojen dağılımlı, minimum yanal etkileşimli ve eş enerjili olduğu görülmüştür. Yapılan çalışma sonucunda tayin limiti 0.50×10^2 kob/mL olarak bulunmuştur.

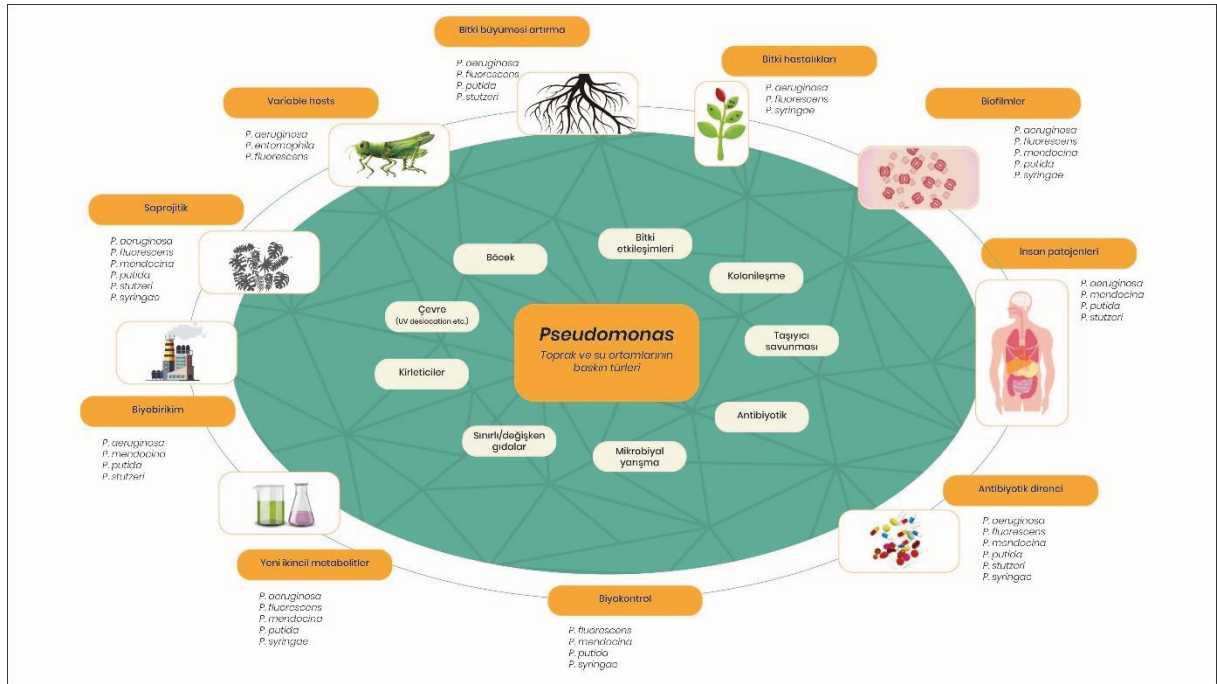
Nanofilm temelli SPR biyosensör ile yapılan seçicilik analizleri sonucunda, *Pseudomonas* spp. bakterisine karşı verdiği tepkinin baskılanmamış biyosensörün, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi* and *Escherichia coli* bakterilerine verdiği tepkiye göre sırasıyla 27, 9 ve 8 fazla olması hazırlanan polimerin gerçekten yüksek özgül kaliteye sahip olduğunu göstermektedir

Biyosensörün tekrarlanabilirliğinin değerlendirilebilmesi için, adsorpsiyon-desorpsiyon-rejenerasyon basamaklarındaki döngülerinin yeniden kullanıma uygunluğunun belirlenebilmesi için 1.0×10^3 kob/mL konsantrasyonundaki süspansiyon SPR sisteminden arka arkaya 5 defa tekrarlanmıştır ve tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 *Pseudomonas* spp.

Proteobacteria şubesinin Gammaproteobacteria sınıfının pseudomonadales takımının Pseudomonadacea ailesine dahil olan *Pseudomonas* cinsi bakteriler bakteriler ilk kez Gessard tarafından 1882’de bulunmuştur [10-12]. Toprak ve suda yaygın olarak bulunan *Pseudomonas* cinsi bakterilerin, bitki, hayvan ve insan için patojen özelliklerde içermektedir [13]. Şekil-1’de *Pseudomonas* spp. cinsi bakterilerin doğadaki yaygın olarak bulunduğu ortamlar gösterilmektedir.



Şekil 2.1. *Pseudomonas* spp. cinsi bakterilerin habitat üzerindeki dağılımları.

Yunanca pseudo (yanlış) latince mono (tek birim) kelimelerinden türetilen *Pseudomonas* kelimesi, en geniş bakteri sınıftan olan Gammaproteobacteria sınıfına dahildir. 16s ribozomal ribonükleik asit (rRNA) gen dizilimlerine ve pigment oluşumuna göre alt türlerine sınıflandırılan *Pseudomonas* cinsi bakterilerin en yaygın olarak bilinen alt türleri; *P.aeruginosa*, *P.alcaligenes*, *P.fluorescens*, *P.fragi*, *P.mendocina*, *P.oleovorans*, *P.pseudoalcaligenes*, *P. putida*, *P.stutzeri* ve *P.syringae*'dir [10,11].

Pseudomonas cinsi; gram negatif, çubuk (basil) şekilli, geniş, pürüzsüz, düz kenarlı mukoid koloni şekilli, 0.5-0.8 µm çapında ve 1.5-3.0 µm boyutlarında tek veya çoklu polar flagellaya sahip hareketli, bakterilerdir. Mukoid koloni yapısı nedeniyle kolonileşme ve virülans ile ilişkilidir. *Pseudomonas* cinsi çoğu alt türlerde zorunlu aeroblardır, metabolizma için fermantasyon zorunlu değildir. Oksijenin bulunmadığı ortamlarda nitratı solunumda kullanabilmektedirler. *Pseudomonas* cinsi bakteriler, glikoz ve karbohidratlardan oksijenli ortamlarda asit üretebilmektedir. Genellikle katalaz ve oksidaz pozitifdir, üremeleri için minimum besin ögesi yeterli olmaktadır. Karbon kaynağı olan asetat ve nitrojen kaynağı olan sülfatın bulunduğu ortamlar *Pseudomonas* cinsinin büyümesi için yeterlidir. Nemli ortamlarda kolaylıkla gelişebildiği için, toprak ve suda kolaylıkla üreyebilmekte ve toprak, su ile temas etmiş yüzeylerde üremeye devam edebilirler [14].

Pseudomonaslar 4°C ile 43°C arasında gelişebilen, aside direnç göstermeyen pH 5-6 altında nadiren büyüyen bakteriler farklı fizikokimyasal koşullara dayanıklıdır. Türlerinin çoğu pigment üreten *Pseudomonaslar*ın sınırlı demir koşullarında pyoverdin (florosein) adı verilen floresan siderofor salgılar. Radyasyon ve ısıya karşı dirençli değildirler. İndol ve H₂S oluşturamamaktadırlar. Metil kırmızısı ve Voges proskauer testleri negatiftir. *Pseudomonas* bakterileri, lipoprotein yapı, hidrokarbon zinciriyle akışkanlık veren özel bir lipid (LPS)'den oluşur. Lipopolisakkarit, hücreye spesifik bir antijenik özellik kazandırmaktadır. % 0.010-0.50 konsantrasyonlardaki asetik asit ve tuzları türe karşı etkilidir. Gıdalara 200 ppm nitrit eklenmesi, *Pseudomonas* üzerine azaltma özelliği göstermektedir. En önemli bozulma etkenlerinden biri olan CO₂ gazına karşı *Pseudomonas* cinsi hassastır.

Pseudomonas cinsi bakterilerin bazı türleri proteolitik ve lipolitik aktiviteye sahiptir. *Pseudomonas* bakterileri, poli-β-hidroksibutirat (PHB) granüllerine sahiptir. PHB granüllerini geliştikleri ortamlarda besin eksikliği olduğunda kullanarak, yaşamlarının devamlılığını sağladıkları saptanmıştır. Çeşitli karbon kaynakları içeren azotun yetersiz ortamlarda endosellüler granüllerde biriken PHB granülleri, *Pseudomonas* cinsine ait üyelerini birbirinden ayırt etmede kullanılmaktadır.

Pseudomonas'ların floresan üyeleri glukonat, alkan, alkenler gibi karbon kaynaklarında geliştirildiklerinde, C6-C12 zincir ortasındaki monomerlerden oluşan polihidroksialkanatları oluşturabilmektedir. *Pseudomonas* bakterileri lipoprotein yapıları içerir, bu yapılar tanımlanmalarında kullanılmıştır. Lipopolisakkaritin iç kısmı hidrokarbon zinciriyle akışkanlık veren özel bir lipid (LPS)'den oluşur. Lipopolisakkarit, hücreye özgü bir antijenik kimlik kazandırır. Böylelikle bakterilerin dış membranı antibiyotiklere karşı bariyer özelliği kazanır [11-16].

Mezofilik bakteri grubunda yer alan psikofilik bakteriler, gıda maddeleri üzerinde fosfolipidleri ve nötr lipitleri sentezleyerek, mikroorganizmaların lipitlerinin erime noktalarının azalmasını sağlayarak, mikroorganizmanın soğuk ortam koşullarında da gelişebilmesine neden olur. Soğuk ortam koşullarında mikroorganizmanın lipit yapısını muhafaza edebilmesi, mikroorganizmanın gıda üzerinde canlılığını ve işlevselliğini devam ettirebilmesine olanak sağlamaktadır. Psikrotrof grubu mikroorganizmalar, gıdalarda hücre dışı proteaz ve lipaz üreterek gıda ürünleri üzerinde çoğalmaya olanak sağlamaktadır [10,11].

Psikotrofilik grup içerisinde yer alan *Pseudomonas* spp. özellikle beyaz et ve et ürünlerinde bozulmaya neden olan ana mikroorganizmadır. Yapılan çalışmalar sonucunda, beyaz et ürününde kesimin hemen sonrasında, mikroorganizma yükü kontrol edildiğinde, sırasıyla; *Mikrokoklar* (%50), gram-pozitif çubuklar (%14), *Flavobacteria* (%14), *Enterobacteriaceae* (%8), *Pseudomonas* (%2), *Acinetobacter* (%7) ve tanımlanamayan organizmalar (%5). Örnekler, 1°C-10°C -10 gün muhafaza edilmesinin ardından mikrobiyal yükü tekrar kontrol edildiğinde %90 *Pseudomonas* spp. (*Pseudomonas* ve *Shewanella*), %7 *Acinetobacter* ve %3 *Enterobakteria* içerdiği saptanmıştır [12].

Pseudomonas türleri yumurta, balık, et, süt ve kümes hayvanlarında proteaz, lipaz ve pektinaz enzimlerini kullanarak karbonhidratın olmadığı ortamlarda enerji kaynağı olarak asit, aminoasitleri, lipit, peptit, ve proteini parçalayabilmektedir [17].

Bozulmaya neden olan *Pseudomonas* spp. bakterisi, glukoz metabolizması sonucu kötü koku oluşturmeyen kısa zincirli yağ asitleri, ketonlar ve alkoller açığa çıkmaktadır. Kötü kokuyu

oluşturacak bileşenler, mikroorganizma sayısı $>1.0 \times 10^7$ kob/cm² olduğu zaman, glukoz seviyesi azalır, laktat ve amino asitler gibi bileşenler kullanılmaya başlandığında açığa çıkmaktadır. Bunlar arasında tipik kokuşma kokusunu oluşturanlar hidrojen sülfid, metil merkaptan, dimetil sülfid gibi bileşenlerdir. Bunların dışında amino asit parçalanması sonucu kötü kokuya neden olan başta amonyak olmak üzere 40'a yakın uçucu metabolitin olduğu bildirilmektedir [18].

Mikroorganizma yükü $1.0 \times 10^8 - 1.0 \times 10^9$ kob/g ulaştığında gıda maddesi üzerinde mukoza yapı oluşmaktadır. *Pseudomonaslar* etin yüzeyinde +100/+500 mV düzeyindeki Eh (Redoks Potansiyeli) değerinde kötü koku oluşumuna sebebiyet vermektedir [19]. Et kalitesini etkileyen bakteri limiti değerlendirme çalışmasında 4°C'de muhafaza edilen kanatlı eti ürünlerinin 2/3'ünün mikrobiyal yükü log 3-8 kob/g değerleri arasında değişiklik göstermiştir [18].

M.Akan 2009 yılında gerçekleştirdiği çalışmada, et ve et ürünlerine ait farklı ürünlerin maksimum ve minimum *Pseudomonas* spp. sonuçları değerlendirildiğinde, $<1.0 - 1.0 \times 10^4$ kob/g'lık üreme saptanmıştır [20]. Çizelge 2.1'de yapılan çalışmaya ait veriler gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Et ve et ürünlerinde *Pseudomonas* spp. maksimum ve minimum değerleri (kob/g).

Mikroorganizma	Ürün	N	n	i	Min	Max	Ortalama
<i>Pseudomonas</i> spp.	Tavuk But	15	12	14	<1	8.0×10^4	2.0×10^4
	Tavuk Göğüs	15	12	16	<1	5.0×10^4	4.0×10^3
	Tavuk Sis	10	8	11	<1	2.0×10^4	4.0×10^3
	Tavuk İnegöl Köfte	10	9	11	<1	5.0×10^4	7.0×10^3
	Tavuk Burger Köfte	10	8	10	<1	8.0×10^4	3.0×10^3

(N: çalışılan örnek sayısı, n: İzolat sayısı i: tanımlanan tür sayısı <1: üreme olmadı (P<0.05))

N. Charles ve ark. yaptıkları çalışmada farklı et ürünleri pakatleme sistemlerindeki 8 günlük *Pseudomonas* spp. analiz sonuçları gözlemlenmiştir. Analizde ilk gününde 3.0×10^3 kob/g 8.

Gün sonunda 4.0×10^6 kob/g değerinde üreme saptanmıştır [21]. Çizelge 2.2’de yapılan çalışmaya ait veriler gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Tavuk eti ürünlerinin, 3 farklı paketlenme sisteminde 1.2 ± 1 C’deki 8 günlük analiz sonuçları (kob/g).

Mikroorganizma	Paketleme Sistemi	Depolanma Süresi				
		0	2	4	6	8
Pseudomonas	FRP	7.0×10^3	7.0×10^3	6.0×10^4	1.0×10^6	1.0×10^6
	STY	5.0×10^3	8.0×10^3	2.0×10^5	2.0×10^6	5.0×10^6
	PAD	3.0×10^3	4.0×10^4	3.0×10^5	8.0×10^5	4.0×10^6
Psychrotrophs	FRP	5.0×10^4	7.0×10^4	2.0×10^6	1.0×10^7	5.0×10^8
	STY	3.0×10^4	1.0×10^2	5.0×10^6	4.0×10^7	2.0×10^6
	PAD	1.0×10^4	5.0×10^6	6.0×10^6	4.0×10^7	5.0×10^8

Arthur Hinton ve ark. Yaptıkları çalışmada, Piliç etinde kesim işlemi esnasında *Pseudomonas* bakteri yükü ve 10.-14. Günlerdeki *Pseudomonas* yükleri karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda, iç çıkarma ve dondurma işlemleri esnasında minimum 1.0×10^3 kob/g değerinde elde edilen sonuçlar, 14. gün sonunda 2.0×10^6 kob/g değerinde saptanmıştır [22]. Çizelge 2.3’de yapılan çalışmaya ait veriler gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Piliç etinin kesim işlem basamaklarında, 10. ve 14. günlerdeki *Pseudomonas* sonuçları (kob/g).

Tavuk Eti İşlemleri	<i>Pseudomonas</i> Agar	Demir Agar	Streptomycin-Thallos Acetate-Actidion Agar
İşlem Görmemiş Tavuk Eti	1.0×10^3	2.0×10^1	0,00
Kesim İşlemi Esnasında Tavuk Eti	7.0×10^4	4.0×10^3	0,00
İç çıkarılma İşlemi Esnasında Tavuk Eti	5.0	2.0×10^1	0,00
Dondurulma İşlemi Esnasında Tavuk Eti	1.0	0,00	0,00

Dondurulmuş 10. Gündeki Tavuk Eti	4.0×10^5	5.0×10^3	6.0×10^5
Dondurulmuş 14. Gündeki Tavuk Eti	2.0×10^6	2.0×10^6	3.0×10^6

Isabelle Arnaut-Rollier ve ark. yaptıkları çalışmada, 4 farklı gruba ayrılan tavuk etlerinde, PCA (Plate Count Agar) agarda Toplam Mezofilik Aerobik Koloni ve CFC (Cetrimid Fucidin Cephaloridin Agar) agarda *Pseudomonas* spp. analizler ilk 8 gündeki değişimleri incelenmiştir. 0. Günde et yüzeyinde %85 oranında yayılma gösteren *Pseudomonas* spp. 8. Günün sonunda % 98.3 değerine ulaşmıştır [23]. Çizelge 2.4’de yapılan çalışmaya ait veriler gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. 4 farklı gruba ayrılan tavuk eti numunelerinin et üzerindeki 0. 3. ve 8. günlerdeki %’lik dağılımları.

Depolama Günleri	Besiyeri	Toplam Flora Yüzdesi (%)	1.Grup	2.Grup	3.Grup	4.Grup
0.gün	PCA	19.2	2	14	2	5
	PSA	85.0	22	79	1	0
3.gün	PCA	44.2	20	28	4	1
	PSA	94.2	34	77	2	0
8.gün	PCA	87.5	36	69	0	0
	PSA	98.3	25	92	1	0

Ana Cristina Pinesso Ribeiro ve ark. Başlangıç değerleri 1.0×10^2 ve 1.0×10^6 olan tam yağlı sütün ilk 96 saatteki mikrobiyolojik bozulması kontrol edilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, maksimum 1.0×10^7 ve 3.0×10^9 kob/g değerine ulaşılmıştır [24]. Çizelge 2.5’de yapılan çalışmaya ait veriler gösterilmiştir.

Çizelge 2.5. Steril tam yağlı sütte, 0-24-48-72-96 saatlerdeki *Pseudomonas* spp. bakteri değerleri (kob/g).

Başlangıç Mikrobiyal Yükü	Sıcaklık °C	0 saat	24 saat	48 saat	72 saat	96 saat
10 ²	2	2.0×10 ²	1.0×10 ⁵	2.0×10 ⁵	3.0×10 ⁵	3.0×10 ⁵
	4	2.0×10 ²	5.0×10 ⁴	2.0×10 ⁵	5.0×10 ⁵	6.0×10 ⁵
	8	2.0×10 ²	2.0×10 ⁶	3.0×10 ⁶	2.0×10 ⁶	1.0×10 ⁷
10 ⁶	2	4.0×10 ⁶	4.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	2.0×10 ⁷	1.0×10 ⁷
	4	4.0×10 ⁶	2.0×10 ⁸	6.0×10 ⁷	4.0×10 ⁷	8.0×10 ⁷
	6	4.0×10 ⁶	5.0×10 ⁷	1.0×10 ⁸	3.0×10 ⁸	3.0×10 ⁹

Amélie Rouger ve ark. yaptıkları çalışmasında tavuk etine ait 13 farklı akademik çalışmanın değerlendirilmesi yapılmıştır. Çizelge 2.6’de tavuk etindeki ortalama *Pseudomonas* bakteri yükü 3.0×10³ kob/g değerinde saptanırken kokuşma işlemi gerçekleşen tavuk eti ürünlerinin sonuçlarının gösterildiği Çizelge 2.7 ’de maksimum 1.0×10⁶ kob/g değeri tespit edilmiştir [25].

Çizelge 2.6. Yapılan 7 farklı çalışmadaki saptanan bakteri değerleri (kob/g).

YAPILAN ÇALIŞMALAR	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
Toplam Koloni Sayısı	1.0×10 ⁵	8.0×10 ⁵	ND	8.0×10 ⁴ - 3.0×10 ⁵	2.0×10 ⁴	5.0×10 ⁵	ND
Psikrotrofik Bakteriler	ND	ND	2.0×10 ⁵ - 3.0×10 ⁵	ND	ND	ND	2.0×10 ⁴
Mezofilik Bakteriler	ND	ND	5.0×10 ⁵ -2.0×10 ⁶	ND	ND	ND	1.0×10 ⁵
<i>Pseudomonas</i>	3.0×10 ³	2.0×10 ⁵	ND	ND	2.0×10 ³	ND	5.0×10 ⁴
<i>Enterobakteriler</i>	ND	ND	ND	4.0×10 ² - 3.0×10 ³	ND	ND	6.0×10 ²
<i>Escherichia coli</i>	2.0×10 ²	ND	5.0- 2.0×10 ²	4.0×10 ² - 4.0×10 ³	ND	ND	ND

<i>Koliform</i>	2.0×10^2	ND	3.0×10^3 - 4.0×10^4	ND	ND	1.0×10^3	7.0×10^2
<i>Stafilokok Aureus</i>	ND	ND	4.0- 3.0×10^2	ND	ND	ND	ND

(ND = Tespit Edilemeyen)

Çizelge 2.7. Yapılan 6 farklı çalışmadaki saptanan bakteri değerleri (kob/g).

YAPILAN ÇALIŞMALAR	8.	9.	10.	11.	12.	13.
Depolama Süresi (gün)	4	5	9	11	15	Kokuşana Kadar
Sıcaklık °C	4-10	7	4	3	4	6
Toplam Koloni Sayısı	4.0×10^7	2.0×10^8	4.0×10^7	3.0×10^6	1.0×10^8	1.0×10^9
<i>Enterobakteriler</i>	2.0×10^8	ND	ND	ND	1.0×10^6	4.0×10^7
<i>Pseudomonas</i>	1.0×10^6	ND	1.0×10^7	1.0×10^5	1.0×10^6	ND
<i>Koliform</i>	ND	2.0×10^4	ND	5.0×10^3	ND	ND

(N.D.= Tespit Edilemeyen)

2.2 Moleküler Baskılama

Antijen-antikör, enzim substrat vb., doğal biyomolekül tanıma elemanlarının anahtar-kilit gibi mükemmel uyum gösteren biyolojik tanıma sistemi canlılık için büyük öneme sahiptir. Biyolojik olayların temel iskeletini oluşturan biyolojik tanıma, doğal biyomolekül tanıma elemanlarının ideal olmayan ortamlarda (yüksek basınç, sıcaklık, farklı pH aralığı ve ...) kararsızlaşmaları bilim dünyasında sentetik biyo-tanıma elemanlarının geliştirilmesi konusunda ilham kaynağı olmuştur [26,27].

Bu fikir, 1949'da boya moleküllerinin silikaya basılabileceğini bildiren Dickey için ilham kaynağı oldu. Bu erken çalışma, Pauling'in konseptinin çok geniş bir anlamda deneysel olarak uygulamaya konulabileceğini gösterdi. Bu alan, yaygın olarak kabul edilen görüş olana kadar geri plan çalışmalarında devam ettirildi [28].

Moleküler baskılama teknolojisi (Molecular Imprinting Technology MIT), ilk olarak 1970'li yıllarda Wulff ve arkadaşları tarafından, şeker türevleri için reseptör özelliklerine sahip sentetik polimerlerin hazırlanmasına ilişkin deneylerinin anlatılmaya başlanmasıyla modern alanda ileriye doğru çalışmaların hız kazandığı bir alan oluşturmuştur [29].

Moleküler baskılama teknolojisi ile yapılan çalışmalarda geliştirilen sentetik polimerler, doğal tanıma elemanlarını taklit ederek, doğada bulunan tanıma süreçlerinde doğal biyomoleküllerin yerini alabilecek potansiye sahiptir [30].

Moleküler baskılanmış polimerler; Farklı sıcaklık, basınç ve pH değerlerinde stabil kalabilmeleri, doğal tanıma elemanlarından daha uygun maliyete temin edilmesi ve hazırlanması, organik çözücüler içerisinde çalışabilmesi, herhangi bileşik için kolayca hazırlanabilmesi asgari çalışma koşullarının yeterli olması ve farklı sistemlere kolayca uygulanabilmesi en önemli avantajlarıdır [31,32].

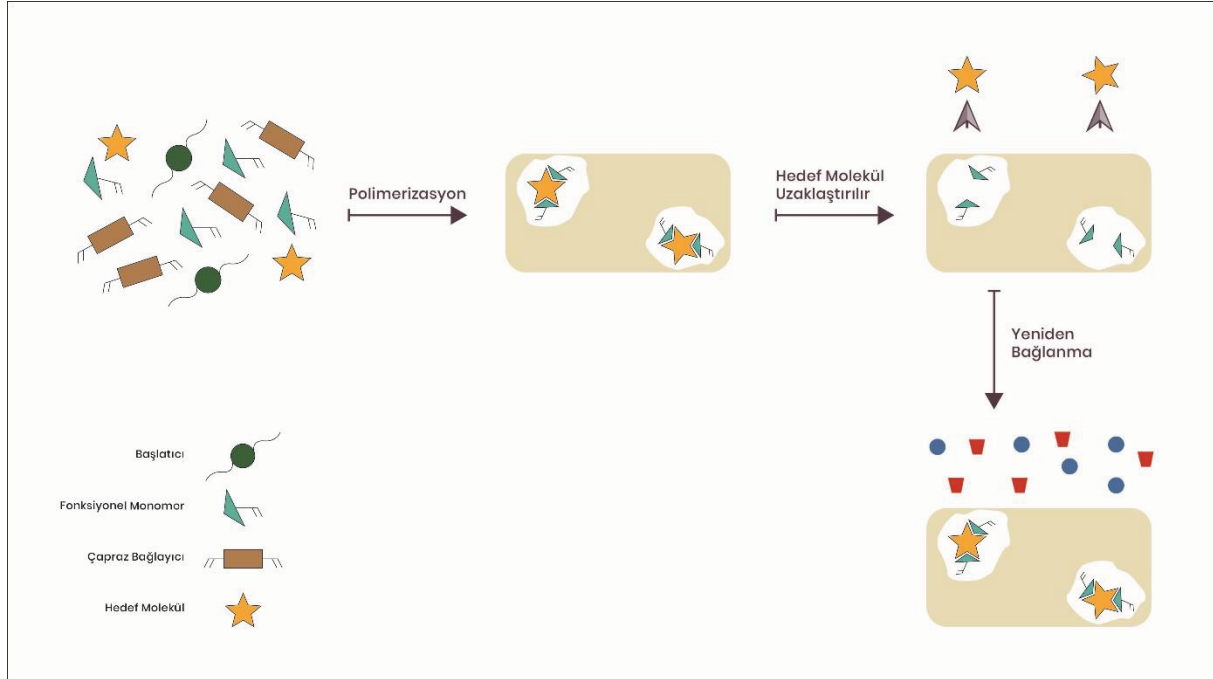
Bu tekniği kullanarak, çok yüksek seçiciliklere sahip malzemeler elde edilebilir ve yöntem şu anda birkaç potansiyel uygulama için düşünüldüğü noktaya kadar olgunlaşmıştır. katalitik aktiviteyi moleküler olarak baskılı materyallere dönüştürmek için girişimlerde bulunulmuştur. Baskılı malzemelerle elde edilebilecek yüksek seçicilik ve sağlamlığın kombinasyonu göz önüne alındığında, zorlu işlemlerde kullanımları, yüksek sıcaklık ve basınçta işlemler, asidik veya bazik koşullar altında reaksiyonlar ve organik çözücülerdeki reaksiyonlar gibi birçok zorlu koşula uyum sağlayabilmektedir [33].

Moleküler Baskılama Teknolojisi; kataliz, ayırıştırma, saflaştırma, tespit, ilaç, aminoasitler, karbohidratlar, nükleotidler, peptitler, hormonlar ve toksinler, pestisitler gibi yaygın olarak pek çok alanda kullanılmaktadır.

2.2.1 Moleküler Baskılama Teknolojisi ve Çeşitleri

Moleküler baskılama teknolojisi (MIT), seçici tanıma özelliğine sahip, çapraz bağlı sentetik polimerlerin oluşturulduğu bir tekniktir. MIT teknolojsinin temelinde, analit ve fonksiyonel

monomer arasında çapraz bağlanma maddesi sayesinde 3 boyutlu polimer yapının oluşmasına dayanmaktadır (Şekil-2.2). Polimerizasyon işlemi sonrasında analit, boyut, şekil ve işlevsel özellik bakımından özel tanıma bölgelerini şablona bastırarak polimerden uzaklaştırılır. Son durumda elde edilen polimer yalnızca analite özel moleküllerin tanınmasında kullanılır [34].



Şekil 2.2. Moleküler baskılanmış polimer tasarımı.

Moleküler baskılama işlemi temelde 3 aşama oluşmaktadır;

- 1- **Ön kompleksleşme:** Hedef analit ile fonksiyonel monomerler, kovalent ya da kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanarak polimerize olabilir yapı oluşturur. Hedef analitin karakteristik yapısı bu aşamada önem arz etmektedir.
- 2- **Polimerizasyon:** hedef analit ile fonksiyonel monomerin birleşerek oluştuğu yapıya, çapraz bağlayıcıların eklenmesiyle polimerizasyon işlemi başlatılır.
- 3- **Uzaklaştırma:** Polimerizasyon işlemi sonrasında oluşan 3 boyutlu yapıdan, hedef analitin uzaklaştırılması işlemidir. Bu işlemde çözücü, matriks yapıdaki boşlukların oluşmasını (kalıp yapı) sağlar. Uygun koşullar altında bu kalıp yapı, hedef yapının boyutunu, yapısını ve kimyasal özelliklerini tanımaktadır [35].

2.2.2 Moleküler Baskılama Tekniğinde Kullanılan Materyaller

Moleküler baskılanmış polimerlerin tasarlanabilmesi için gerekli 5 temel element; Hedef analit (şablon), fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcılar, başlatıcılar ve çözücülerdir.

2.2.2.1 Hedef Analit

Baskı işlemi için hedef analit, fonksiyonel organizasyonunu yönlendirmesi nedeniyle temel öneme sahiptir. Hedef analitin ideal polimerizasyon için, kimyasal olarak inert olması gerekmektedir. İdeal hedef analitlerin tercih edilmesinde, 3 duruma dikkat edilmesi gerekmektedir. (1) Hedef analit, polimerize olacak fonksiyonel grup içeriyor mu?. (2) Hedef analit, serbest radikallerle etkileşim kurabilecek işlevsellik taşıyor mu (3) Hedef analit ideal olmayan koşullarda (örn: Yüksek sıcaklık, Uv ışınına maruz kalma ve kimyasal başlatıcılar) kararlı kalabiliyor mu? [36].

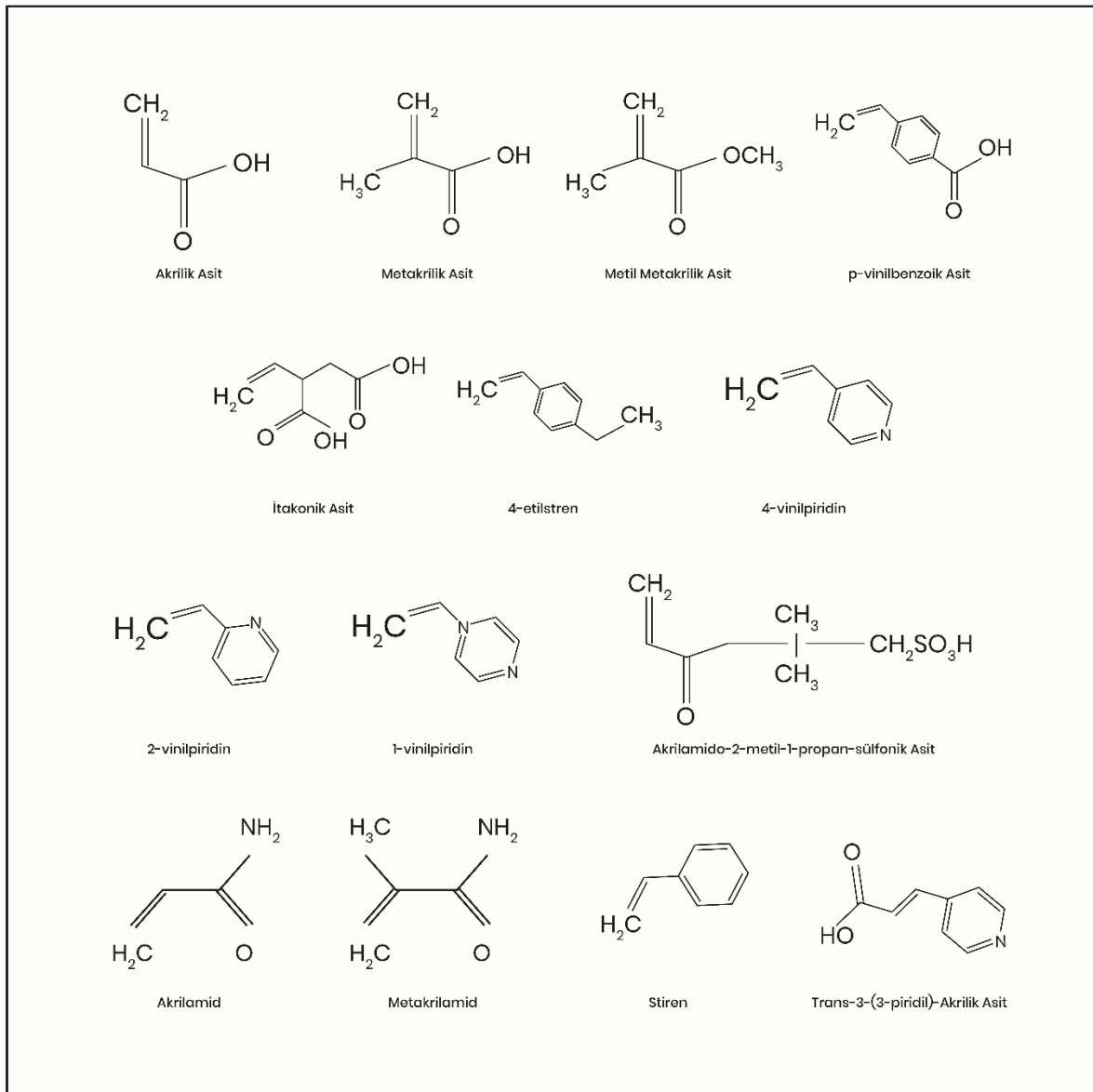
Küçük boyutlu moleküllerin moleküler baskılanmış polimer olarak kullanılabilirliği, başarıyla uygulanmıştır. Optimizasyon esnasında çoğu durumda aktif analitler kullanılmaktadır. Bu durum baskılamanın doğruluğunun test edilebilmektedir.

Büyük boyutlu moleküller, hedef analitin baskılanması küçük moleküllere göre daha zordur. Büyük moleküllerin daha yumuşak olması ve bu nedenle baskılamanın tam oluşmasına engel olabilmektedir. Termal ve fotolitik işlemler sırasında büyük moleküller etkilenebilmektedir. Ayrıca tekrarlanan çalışmada etkili bağlanma oluşmayabilmektedir [37].

2.2.2.2 Fonksiyonel Monomerler

Fonksiyonel monomerler, hedef analit ve çapraz bağlayıcılar ile bağlanma etkileşimlerinden sorumludur. Moleküler baskılamada kullanılan fonksiyonel monomerlerin sayısı sınırlıdır. Bu durum, MIP'lerin seçiciliğini sınırlar. Fonsiyonel monomerler, 2 farklı tip birimden oluşur. Biri tanıma birimi, diğeri vinil çift bağ ve silikon hidroksil gibi polimerize edilebilir birimdir. En sık kullanılan asidik ve bazik fonksiyonel monomerler metakrilik asit ve 4-vinilpiridin olarak belirtilebilir [36-41].

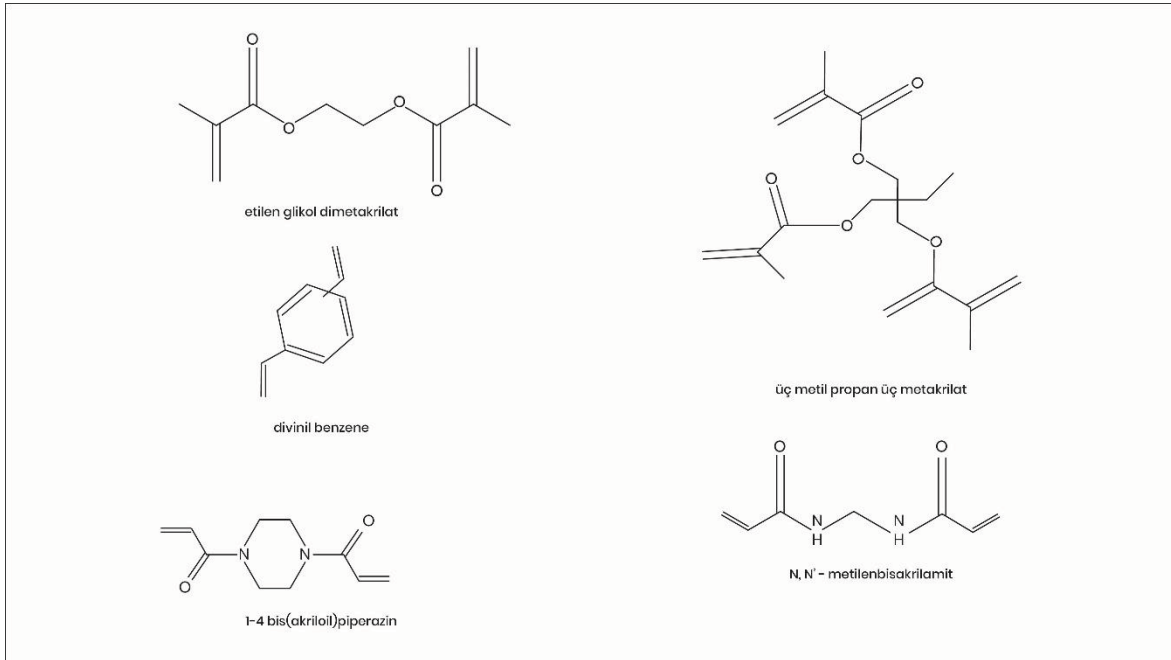
Fonksiyonel monomerler ortama stoikiometrik olarak eklenir. Kovalent bağlanmalarda, analit bağlanma için gerekli monomer sayısı bellidir. Fakat kovalent olmayan bağlanmalarda, monomerler analit oranından daha fazla miktarda ortamda bulundurulur. (1:4 oranında) Bu durum, farklı formülasyonlarda polimer oluşumuna neden olduğu gibi farklı heterojen bağlanma bölgelerini oluşturmaktadır. Le Chatelier'in ilkesine göre bu durum yönetilen işlevsel monomerler ve hedef analit arasındaki çözüm kompleksinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Şekil 2.3) [38].



Şekil 2.3. Fonsiyonel monomerler.

2.2.2.3 Çapraz Bağlayıcılar

Polimer baskılanmasında çapraz bağlayıcılar 3 işlem için kullanılmaktadır. (1) Polimer matriksin morfolojik özelliklerinin kontrol edilmesinde önemlidir. (2) Baskılama ortam koşullarının kararlı kalmasını sağlar. (3) Polimer matriksine mekanik dayanıklılık kazandırır (Şekil 2.4). Çapraz bağlayıcılar hazırlanan polimer yapının biyo- tanıma özelliği üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır. Bu nedenle baskılanan polimerlerde mikro boşlukların oluşması, analitin geri çıkarılabilmesi ve baskılanan yapının hem şekil hemde kimyasal işlevsellik bakımından 3 boyutlu yapısının dayanıklı olabilmesi için çapraz bağlantı oranları %80 aşan polimer yapıları tercih edilmektedir [36-38].



Şekil 2.4. Çapraz bağlayıcılar.

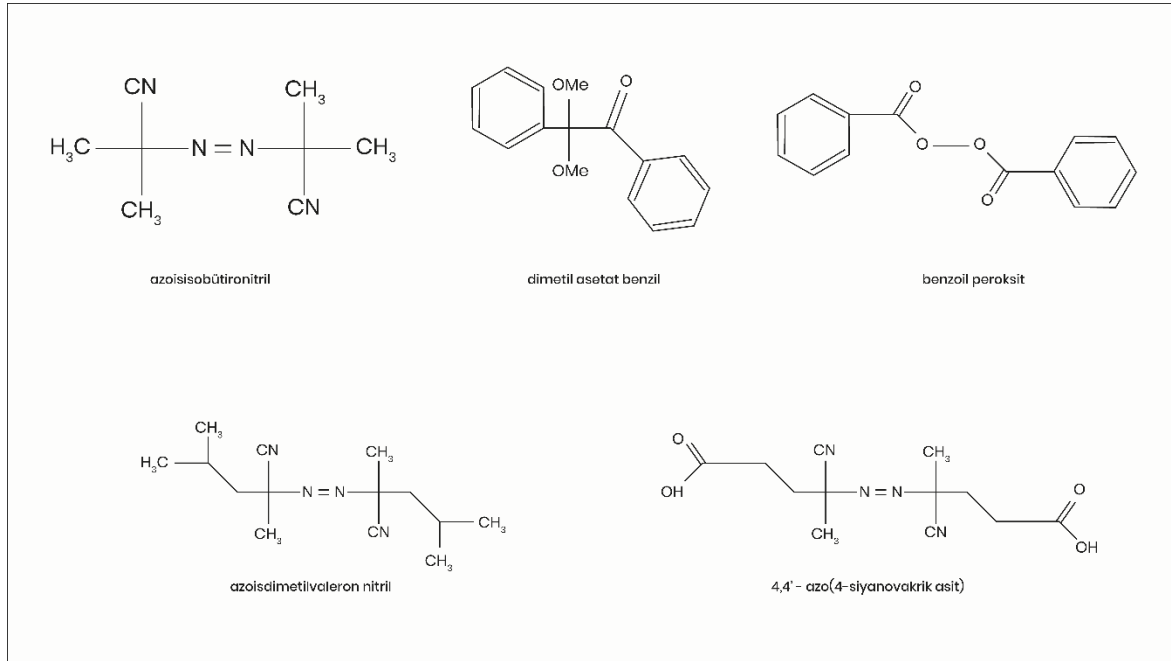
2.2.2.4 Çözücüler (Porojenler)

Çözücüler, hedef analit, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı ve başlatıcıların, polimerizasyon işlemi esnasında çözünerek aynı faza gelmesine yardımcı olur. Aynı zamanda polimer matrikde gözenekli yapının oluşmasında önemli etkisi bulunmaktadır. Yaygın olarak kullanılan çözücüler 2-metoksietanol, metanol, tetrahidrofuran (THF), asetonitril, dikloroetan, kloroform, N, N-dimetilformamid (DMF) ve toluendir.

Çözücünün seviyesi ve yapısı büyük gözenekli polimerler hazırlarken gözenek hacmini belirlemede kullanılabilir. İyi bir çözücünün kullanılması, polimerde özel yüzey alanlarına ve gelişmiş gözeneklere sahip olmak için kullanılabilir. Zayıf bir çözücünün kullanılması ise düşük etkinlikte yüzey alanlarına ve zayıf gelişmiş gözeneklere sahip polimer oluşumuna neden olabilecektir. Çözücüler aynı zamanda, kovalent olmayan baskılamalarda, analit-fonksiyonel monomer etkileşimini etkilemektedir [36- 38].

2.2.2.5 Başlatıcılar

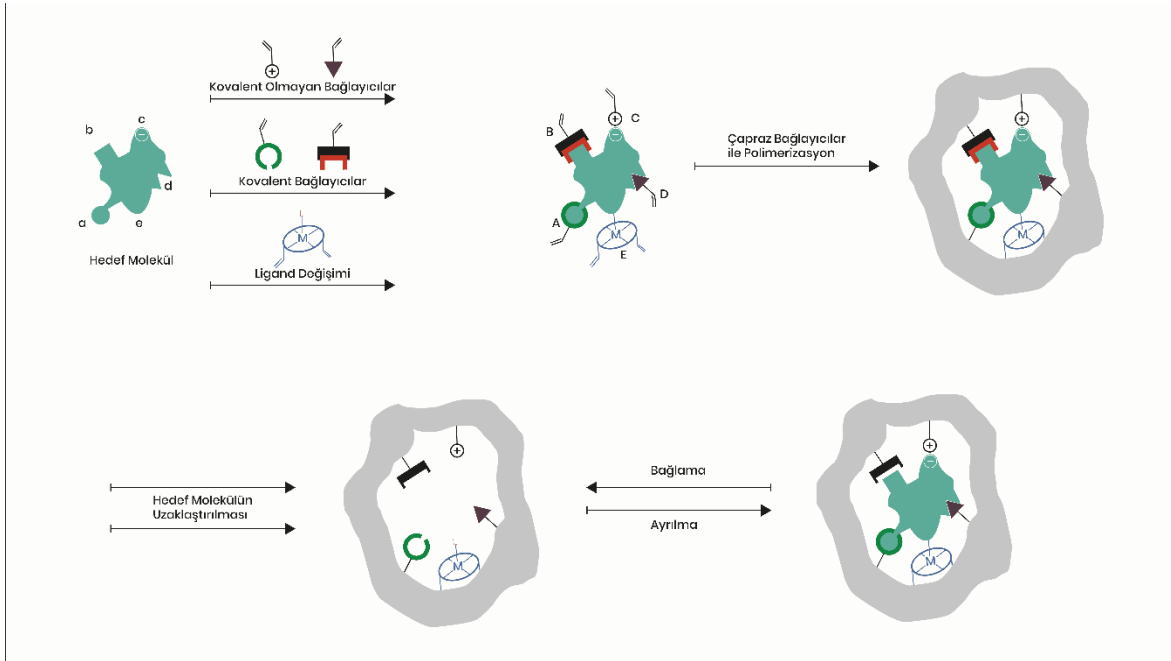
Fonksiyonel monomere bağlı polimer bileşik oluşturabilmek için, reaksiyonu başlatan kimyasallardır. Başlatıcılar, fonksiyonel monomer arasında matriks yapı oluşuma yardımcı olan etkileyen kimyasal türlerdir (Şekil 2.5). Başlatıcılar, hedef analit ve polimerizasyon tipine göre seçilmelidir. Hedef analit kararsız olması halinde, başlatıcı ve polimerizasyon yöntemi hedef analitin karakterizasyonuna göre tercih edilmelidir [36-38].



Şekil 2.5. Kimyasal başlatıcılar.

2.2.3 Moleküler Baskılama Teknolojisinde Kullanılan Baskılama Teknikleri

Yukarıda işlevleri detaylı anlatılan moleküler baskılama elemanlarının seçiminin etkin şekilde yapılması moleküler baskılama işleminin başarılı olması için çok önemlidir. Moleküler baskılama işlemi hedef molekül, fonksiyonel monomerlerin ve uygun çapraz bağlayıcıların aynı ortamda bulunması ile sentezlenebilmektedir. Oluşan matriks yapının boyut, şekil, fiziksel ve kimyasal özellikleri bakımından hedef molekül ile birebir aynı yapıda oluşmaktadır. Hedef molekülün polimere bağlanabilmesi veya polimerden uzaklaşması ve bu işlemin tekrar tekrar kullanılabilmesi kimyasal etkileşimlere bağlıdır. Moleküler olarak oluşturulmasında kullanılan baskılama teknikleri, Kovalent, Kovalent olmayan, Semi-Kovalent, Metal aracılı olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.6.).



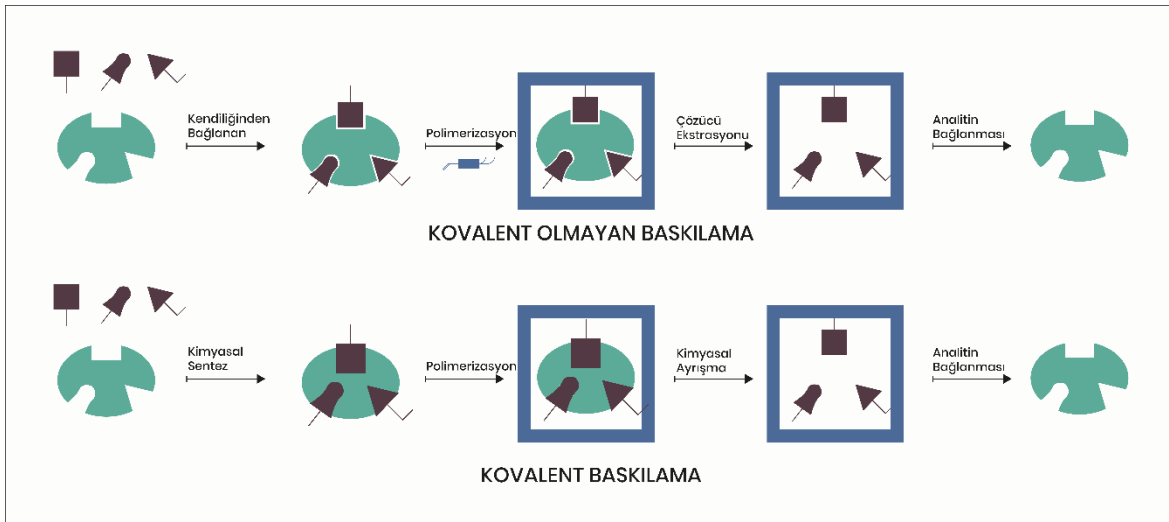
Şekil 2.6. Moleküler baskılama teknikleri.

2.2.3.1 Kovalent Baskılama Teknikleri

Bu yöntem, hedef molekül ve fonksiyonel monomerin kovalent olarak bağlanmasıdır. Bu tip bağlanma tersinir kovalent bağlara dayanmaktadır. Çapraz bağlayıcı ile kopolimerizasyondan sonra, baskı molekülü yüksek oranda çapraz bağlanmış polimerden kimyasal olarak ayırılır. Baskılanmış polimere, hedef molekül yeniden aynı bağ oluşmaktadır (Şekil 2.7.).

Avantajları: Fonksiyonel monomerlerin sadece hedef analitle birleşmesi ve ayrışması arasında denge oluşması nedeniyle, polimerde çeşitli afinitelere sahip bağlanma bölgeleri oluşmaktadır. Polimerizasyon koşullarına yüksek adaptasyon sağlar.

Dezavantajları: Tersine çevrilebilir bağlanma için sınırlı sayıda hedef molekül olması nedeniyle, Kovasınırlı sayıda bileşik oluşturulabilmektedir. (alkoller, aldehitler, ketonlar, aminler ve karboksilik asitler). Kovalent bağ oluşumunun güçlü yapıda olması ve hedef molekülün tekrarlı bağlanma-ayırılma işleminde engeller oluşturması nedeniyle kullanışlı değildir ve bağlanma kinetiği yavaştır [37,38].



Şekil 2.7. Kovalent ve kovalent olmayan baskılama teknikleri.

2.2.3.2 Kovalent Olmayan Baskılama Tekniği

Hedef molekül ile fonksiyonel monomer arasında kovalent olmayan bağların oluşması (hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler, koordinasyon bağ oluşumu) ile oluşturulur.

Avantajları: Polimerizasyondan sonra kalıp molekül polimerden kolayca uzaklaştırılır, çünkü kovalent olmayan etkileşimler daha zayıftır. Kovalent olmayan baskı yöntemi birçok bileşiğe uygulanabilir olmaları, hızlı kinetiği ve daha uygun koşullarda bağ oluşumu ve kırılma özellikleri göstermeleri nedeniyle en yaygın şekilde uygulanan yöntemdir. Hedef molekülün bağlanma kinetiği hızlıdır.

Dezavantajları: Kovalent olmayan bağlanmada fonksiyonel monomer bağ oluşumunu dengelemek için hedef moleküle oranla fazla miktarda (1:4) kullanılmaktadır ve bu durum polimer matrisinde heterojen bağlanma bölgelerinin oluşmasına sebebiyet verir. Kovalent olmayan etkileşimlerde, polimerizasyon koşulları önemlidir [38-41].

2.2.3.3 Yarı Kovalent Baskılama Tekniği

Yarı kovalent baskı kavramı, kovalent ve kovalent olmayan baskının kombinasyonuna dayanır. Bu yöntemde, kovalent ve kovalent olmayan yaklaşımların avantajları birleştirilmeye çalışılmaktadır. Polimer baskılama işlemi kovalent bağlamada olduğu gibi düzenlenir fakat bağlanma kovalent olmayan etkileşimlerle gerçekleşir. Böylece, hedef molekülün bağlanma-ayrılma işlemi hızlandırılmış olmaktadır [42].

2.2.3.4 Metal Aracılı Baskılama Tekniği

Metal iyonları, elektronlarını ligandlara vermesiyle çok çeşitli fonksiyonel gruplara bağlanma yeteneğine sahiptir. Metalin, etkileşim gücü, oksidasyon durumu ve ligand özelliklerine bağlı olarak kovalent bağlanma gibi davranabilmektedir. Özetle metaller, hedef molekül ve fonksiyonel monomer arasında, alternatif bağlanma yöntemi olarak kullanılmıştır. Bu metotta, bağlanma bölgelerinde güçlü heterojen yapılar oluşurken, partüküller arasında difüzyona engel olabilmektedir. Durumda, hedef moleküllerin bağlanmasında aksaklıklara sebebiyet vermektedir [36-48].

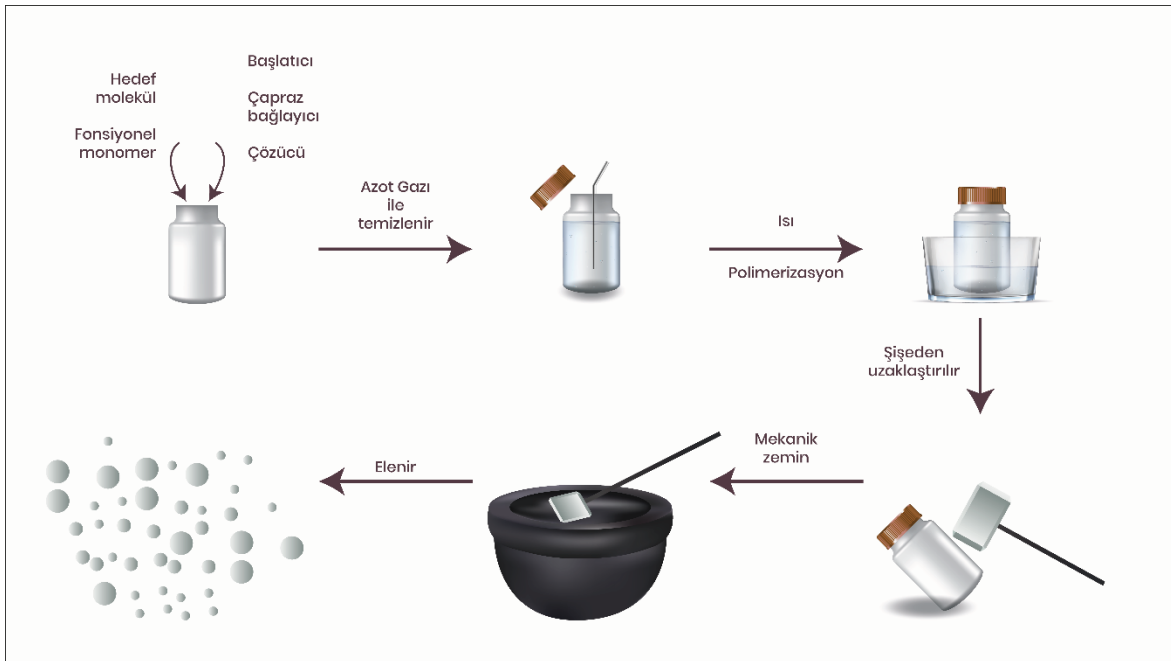
2.2.4 Moleküler Baskılama Teknolojisinde Kullanılan Polimerizasyon Çeşitleri

Moleküler baskılanmış polimerlerin, polimerizasyon işlemleri, istenilen polimer yapının kullanım alanına uygun olarak farklı fiziksel formlarda hazırlanabilmektedir. Çözeltinin başlangıçtaki homojen veya heterojen yapısına bağlı olarak farklı alt gruplarda sınıflandırılabilir.

Bunun nedeni yine Le Chatelier'in ilkesine dayanılarak öne sürüldü; bu, daha düşük sıcaklıkların pre-polimer kompleksini karmaşık oluşuma sürükleyeceğini ve böylece oluşan bağlanma yerlerinin sayısını ve muhtemelen kalitesini artıracaklarını öngörüyor [38].

2.2.4.1 Yığın Polimerizasyon Tekniği

Moleküler baskılanmış polimerler için kullanılan geleneksel yöntem, ön polimerizasyon işleminden sonra, hedef molekülün doğrudan monomer karışımına eklenerek dağılımı sağlanır. Polimerizasyon işlemi sonrasında, polimer parçacık boyutunun mikrometre aralığında olabilmesi için mekanik öğütme ve eleme işlemleri uygulanır (Şekil 2.8.). Bu tekniğin uygulanması basit, pratik, gelişmiş ekipmana ihtiyaç duymadan, hızlı, parçacık boyutları, tekrarlanabilirliği, polimer sertliği ve dayanıklılığı bakımından pek çok avantajı olmasına rağmen, mekanik öğütme ve eleme işlemleri nedeniyle bağlanma bölgelerinde deformasyon oluşması, boyut ve biçimde düzensizlik oluşması, fazla miktarda hedef molekül gerekliliğinde ötürü polimer oluşturma zorluğu, uzun süreçler gerektirmesi, ısı oluşumu, düşük performans ve madde kaybı nedeniyle dezavantajları bulunmaktadır [38-48].



Şekil 2.8. Yığın polimerizasyon prosesi.

2.2.4.2 In-suti Polimerizasyonu

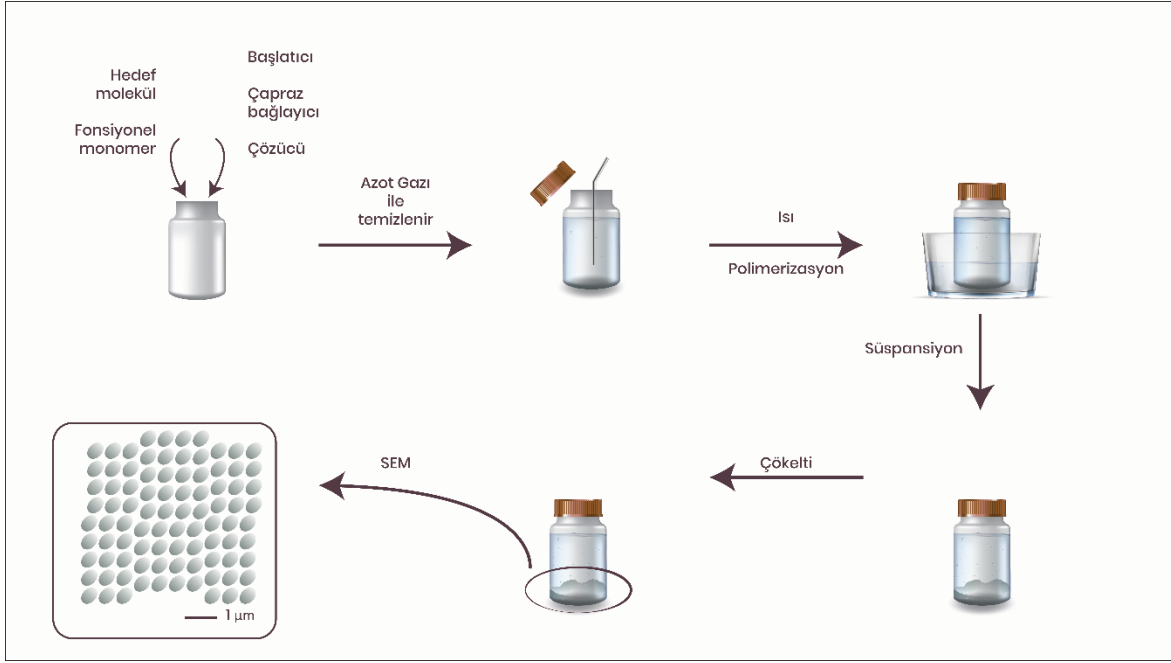
In-suti polimerizasyon tekniği, kromotografik kolon içerisinde baskılanmış monolit polimer hazırlanmasında kullanılmaktadır. Kolon içerisinde monolit ve polimerizasyon malzemesi eklenerak su banyosunda ısı ile veya Uv altında polimerizasyon işlemi başlatılarak yaklaşık 3 saat polimerizasyon işlemi sürdürülür. Kullanılan yöntemin tek işlem basamağı olması, düşük maliyetli oluşu, gözenek yapısının ideal olması, hazırlanılan polimerler, seçicilik, hassasiyet ve reaksiyon hızı gibi avantajlara sahipken en büyük dezavantajı polimerin optimize edilmesi gereklidir [37-49].

2.2.4.3 Çok Aşamalı şişme Polimerizasyonu

Aşamalı şişme polimerizasyonu, kontrollü polimer büyüklüğüne sahip olmak için geliştirilmiş bir yöntemdir. İdeal boyutlu partiküllerin elde edilmesinin polimer parıklarının şişmesine bağlı olan teknik, 2 aşamadan oluşmaktadır. 1. Aşamada, polimer boncukları, hidrofobik üzücü ile tamamen adsorbe edilir. 2. Aşamada şişmiş polimer boncukların tekrar hidrofobik üzücü ile tamamen adsorbe edilmesi sağlanır. 2. Aşamanın sonunda polimerizasyon işlemi başlatılarak, polimerleşme için 1 gün bekletilir. Polimerizasyon işlemi sonunda boncukların boyutlarında yaklaşık 5-100 kat büyüme gözlemlenir. Boyut ve şekil dağılımını kontrollü oluşumunu sağlayarak, kk partiküllü malzemelerin boşa gitmesini önlemesine rağmen, karmaşık ve uzun polimerizasyon basamakları gerektirir ve sulu süspansiyonlar baskılanmış polimer yapıyı olumsuz yönde etkileyebilir [37-49].

2.2.4.4 Süspansiyon Polimerizasyonu

Gözenekli, MIP'lerin hazırlanmasında kullanılan yöntem, organik fazlı ortamın sulu ortamla sürekli karıştırılmasıdır. Mikrometre -milimetre aralığındaki polimer boncukların oluşmasında kullanılan yöntem, karışım esnasında sürekli karıştırılarak elde edilir (şekil 2.9.). Bu polimerizasyon tekniği, polimerleşmede kararlı yapıda olmaması nedeniyle ortama stabilizatör eklenir. Karışım içerisindeki tüm maddeler znerek homojen karışım elde edilir. Polimerizasyon yaklaşık 3 saatte tamamlanır. Bu yöntemle elde edilen polimer malzemeler yüksek verimlikte ve seiliktir. Bu yöntemin su ile elde edilmesi nedeniyle oluşan polimer malzeme çeşidi azdır [36-49].



Şekil 2.9. Süspansiyon polimerizasyon prosesi.

2.2.4.5 Emülsiyon polimerizasyonu

Emülsiyon polimerizasyonu, sulu ortamda çapraz bağlayıcıların şablonun ve fonksiyonel monomerin emülsiyonlaştırılmasını içerir. Emülsiyon polimerizasyonunu, kullanılan başlatıcı türü süspansiyon polimerizasyonundan ayıran özelliklerdir. Oluşan polimer parçacıklarının yapısı süspansiyon polimerizasyona göre ufaktır, zaman alıcıdır ve kullanılan sulu süspansiyonlar baskıyı engelleyebilir ve bu nedenle seçicilikte bir azalmaya neden olabilir [36,41- 49].

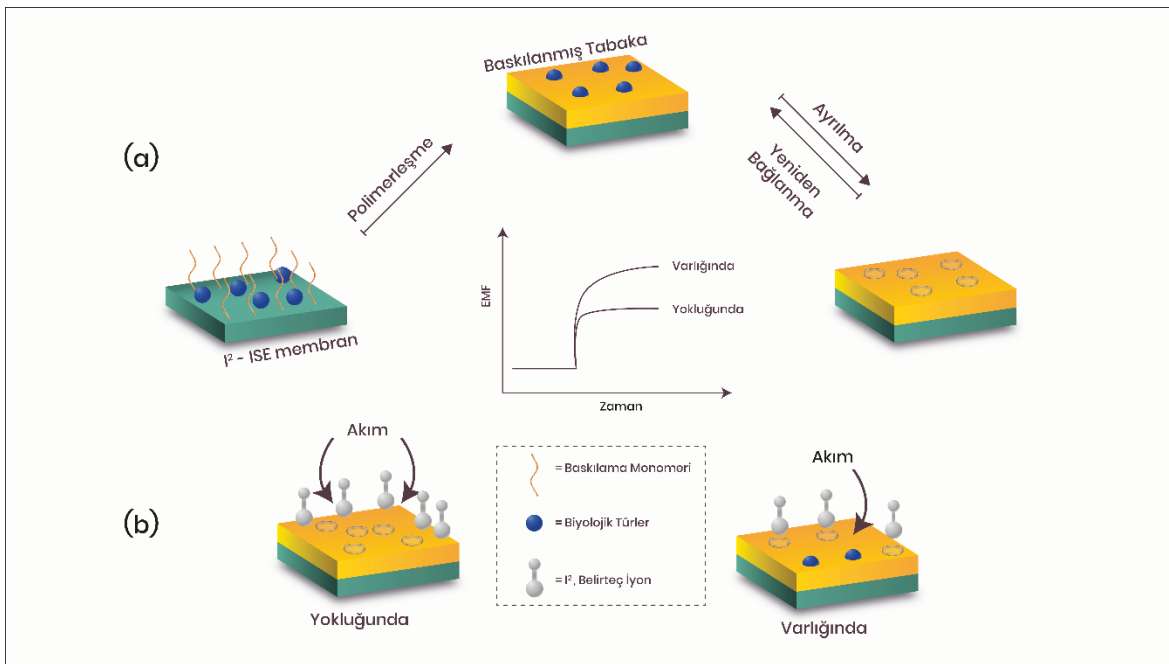
2.2.4.6 Çöktürme Polimerizasyonu

Çöktürme polimerizasyonu, yığın polimerizasyonundan farklı olarak daha fazla miktarlarda çözücü eklenmesi ile elde edilmektedir. Başlangıçta homojen yapıda olan çözelti, polimer yapının sıvı içerisinde çözünmez olması ve çökmesi sonucu oluşur. Oluşan polimer boncuklar mikrometre boyutundadır. Hırlanması en basit yöntemdir, herhangi ek işlem gerektirmez. Polimerizasyon koşulları parçacık boyutu üzerinde etkilidir.

Çöktürme polimerizasyonun süspansiyon polimerizasyonu ile arasındaki en önemli fark ise stabilizatöre gerek duyulmamasıdır. Bu teknikte hazırlanan polimerlerde yüksek verim elde edilmesine rağmen, fazla miktarda hedef molekül gerektirmektedir [36,37,48,49].

2.2.4.7 YüzeY Polimerizasyonu

Son yıllarda, proteinler, hücreler, bakteriler ve virüsler gibi makromoleküllerin oluşturulmasında, yüzeY baskılama tekniği kullanılmaktadır. Geleneksel polimerizasyon çeşitleri, fazla miktarda çapraz bağlayıcı içermeleri nedeniyle, makromoleküllerin bağlanma bölgelerine ulaşmasına engellemektedir (Şekil 2.10.). Hedef molekülün polimer yüzeyine kovalent ve kovalent olmayan etkileşimlerle, baskılanması sonucu oluşan polimer yapı, yüksek seçicilik, erişilebilir bağlanma, hızlı birleşme/ayrışma gibi önemli avantajlar sağlamaktadır. Polimerleşme yöntemi basit, ucuz ve tekrar kullanılabilirlik oranı yüksektir. Bu yöntemin en önemli dezavantajları polimerizasyon basamaklarının karmaşık ve uzun sürede tamamlanmasıdır [37-49].

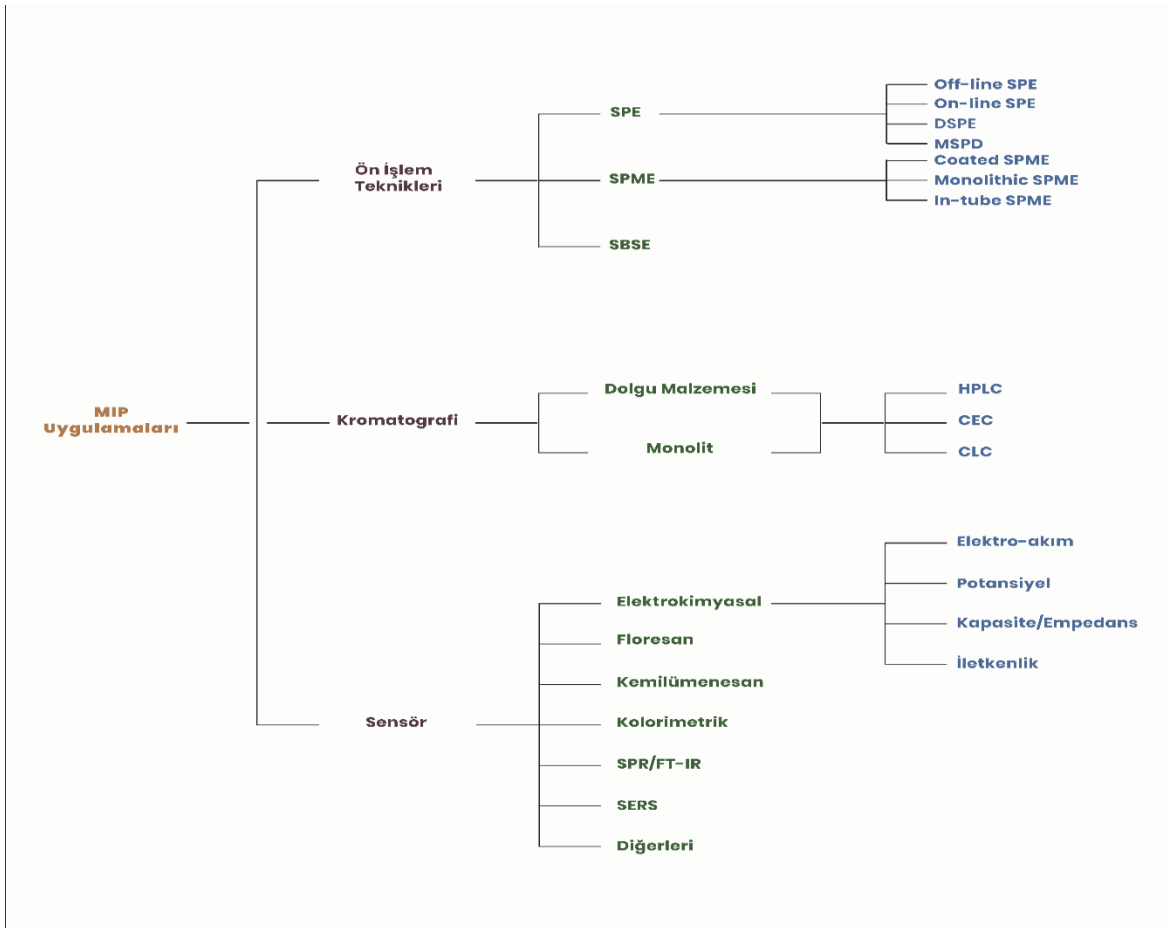


Şekil 2.10. YüzeY baskılama prosesi.

2.2.5 Moleküler Baskılama Teknoloji İle Hazırlanan Polimerlerin Kullanım Alanları

Moleküler baskılanmış polimerler, ilk olarak laboratuvar çalışmalarda kullanılmış olmasına rağmen, günümüzde endüstriyel / ticari kullanımına talep gittikçe artmaktadır. Bu teknoloji için “geleceğin gerçek dünyası” olduğu öngörülmektedir [37].

Moleküler baskılanmış polimerlerin kendilerine özgül yapıları ve özellikleri sayesinde, ayırma, saflaştırma, seçici geçirgen membranlar, sensörler, ilaç dağılımı, çevresel izleme, klinik uygulamalar, gıda ve sanayi gibi farklı uygulama alanlarında oldukça ilgi çekicidir. Geçtiğimiz 10 yıllık süreçte moleküler baskılama teknolojisi için zengin literatür çalışması bulunmakta ve bu çalışmalara hız kesmeden devam edilmektedir. Moleküler Baskılama teknolojisinin genel olarak kullanıldığı uygulama alanları şekil-2.11 de detaylandırılmıştır [36,50].



Şekil 2.11. Moleküler baskılanmış polimerlerin uygulama alanları.

2.2.5.1 Katı-Faz Ekstraksiyon Uygulamaları

Geleneksel ayırma proseslerinde kullanılan sorbentlerin yerine kullanılabilecek MIP'lerin maddeyi özel olarak tanıma yetkinliği daha fazladır. Katı faz ayrıştırılmalarında MIP uygulamaları, ön işlem basamaklarının kullanılmasına gerek duymadan karmaşık numunelerdeki ayrıştırmayı kolaylaştırmasına yardımcıdır. Katı-faz Ekstraksiyonu uygulamalarından örnekler Çizelge 2.8'de gösterilmiştir [51].

Çizelge 2.8. MIP'in katı faz ekstraksiyon uygulamaları.

Örnek	Hedef Molekül	Polimerizasyon Tekniği	Analiz Metodu	Referans
İçme Suyu	Metsulfuron-methyl	Yığın Polimerizasyon	MIP-SPE	[52]
Süt	Melamine	Yığın Polimerizasyon	MI-MSDP	[53]
Süt	Sülfametazolin	Yığın Polimerizasyon	MIP-SPE	[54]

2.2.5.2 Kromatografik Uygulamaları

Kromatografik yöntemlerde hedeflenen molekülün, tanınmasında HPLC, GC-MS gibi cihazların neden olduğu sınırlamaların ortadan kaldırılmasında yardımcıdır. Kromatografi uygulamalarından örnekler Çizelge 2.9.'de gösterilmiştir [51].

Çizelge 2.9. MIP'in kromatografik uygulamaları.

Örnek	Hedef Molekül	Polimerizasyon Tekniği	Analiz Metodu	Referans
Domates	Triazin	Süspansiyon Polimerizasyon	HPLC	[55]
Portakal Suyu	Vitaminler	Yüzey Baskılama Yönetmi	HPLC	[56]
Süt	Melamin	Yığın Polimerizasyon	HPLC	[57]

2.2.5.3 Sensör Uygulamaları

MIP'lerin sensör uygulamalarında, "teşhis" amaçlı kullanımı gittikçe yaygınlaşmıştır. Sensör uygulamalarında kullanılan tanıma materyali ve yanıt sinyalinin algılama hassasiyeti en büyük avantajlarıdır. Sensör uygulamalarından örnekler Çizelge 2.10.'de gösterilmiştir [51].

Çizelge 2.10. MIP'in sensör uygulamaları.

Örnek	Hedef Molekül	Polimerizasyon Tekniği	Analiz Metodu	Referans
İnsan	Dopamin (DA)	Yüzey Baskılama	Optik Sensör	[58]
Plazma	Glikoz	Yüzey Baskılama	Elektrokimyasal Sensör	[59]
Üre	Siyalik Asit	Yüzey Baskılama	QCM Sensör	[60]

2.3 Biyosensörler

Biyosensörler, karışım içerisinde tespit edilmesi istenilen analitin moleküler tanıma araçlarıyla tanıyabilen analitik cihazlardır [61-66].

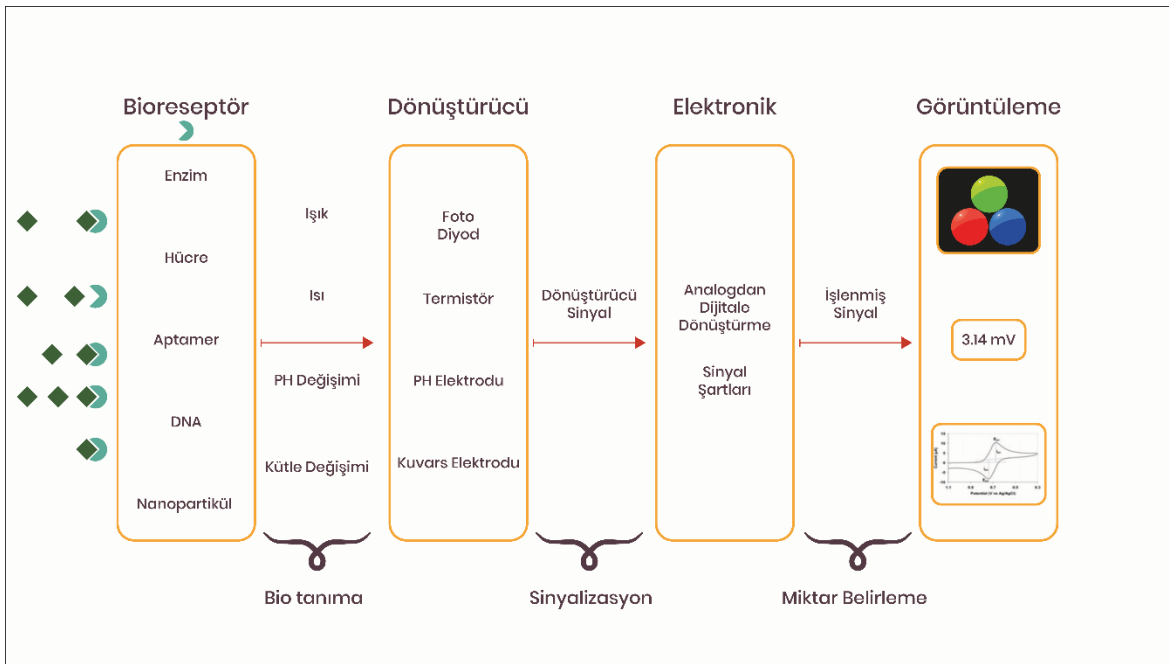
İlk kez 1906 yılında M. Cremer'in elektrik potansiyel farkına bağlı sıvı içerisindeki asit konsantrasyonunu ölçmesiyle başlamıştır. 1900'lü yıllarda gelişimi devam eden analitik cihaz, 1956'da oksijen tespiti için C.Clark tarafından tam gelişmişlikte kullanılmıştır. Biyosensörler 1975 yılı itibariyle ticari olarak kullanımına başlanmıştır. Biyosensörler güncel olarak literatürde temel bilimler ve mühendislik bilimlerinin ortak çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir.

Biyosensörler, 3 temel yapı sisteminden oluşurlar (Şekil 2.12.).

Biyoreseptör: Analite özgül tanıma bölgeleri bulunan moleküllerdir. Enzimler, aptamerler, DNA, antikolar ve hücreler en genel örneklerdendir.

Çevirici: Biyoreseptörün analitin etkileşimi sonucunda oluşan kimyasal değişimin, ölçülebilir bir sinyale dönüştüren (ışık, ısı, pH, kütle değişimi vb.) elementlerdir. Bu dönüştürme süreci sinyalizasyon olarak adlandırılır.

Sinyal İşleyici: Ölçülebilir sinyalin (ışık, ısı, pH, kütle değişimi vb.) işleyen ve görüntüleyen elemettir. Analitin derişimine bağlı düşük ve yüksek orandaki sinyallerin analog formdan dijital forma dönüşmesini sağlayan elektronik devrelerdir. İşlenen sinyaller sonrasında biyosensörün görüntüleme birimi tarafından ölçülür. Görüntüleme son kullanıcının tercihine bağlı sayısal veri, grafik, tablo veya resim olabilir.



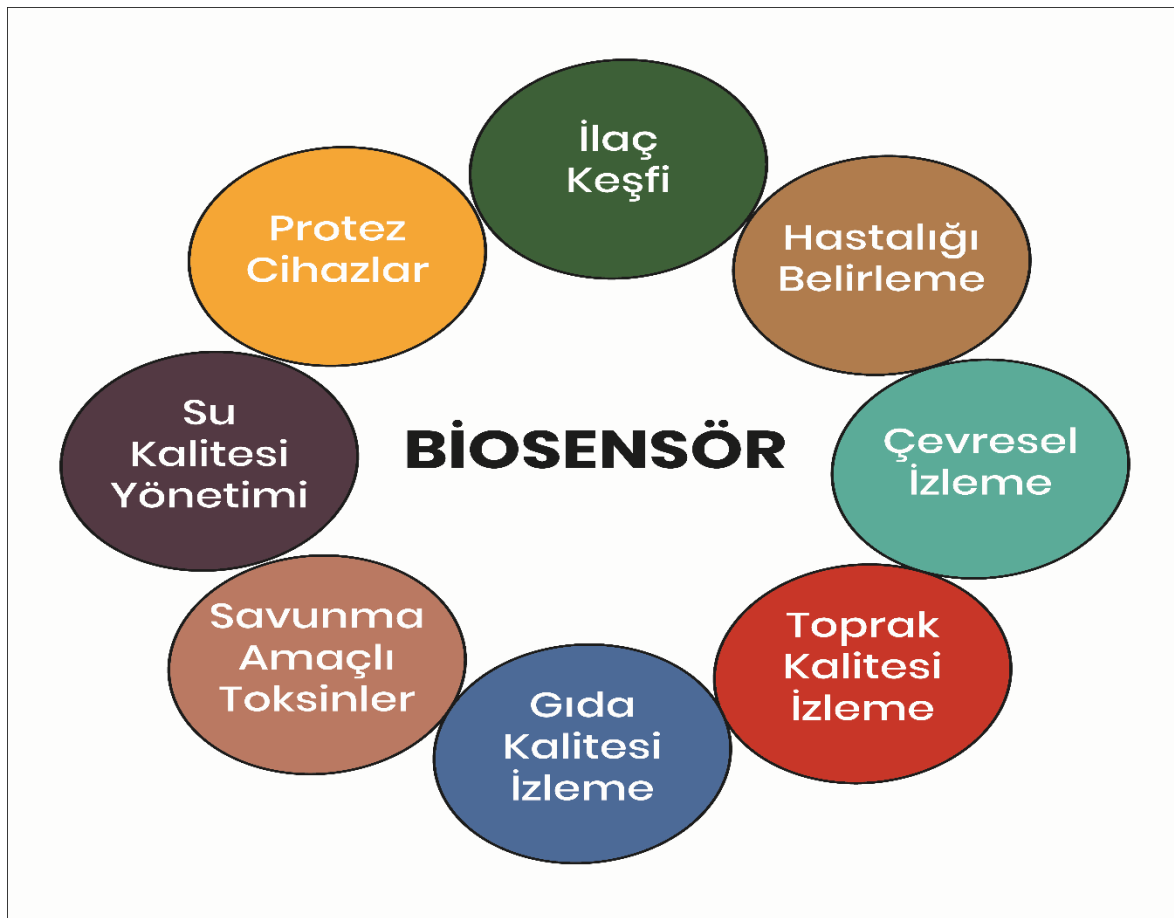
Şekil 2.12. Biyosensörlerin yapıları.

İdeal bir biyosensör tasarımında dikkat edilmesi gereken statik ve dinamik özellikler mevcuttur. Bu sayesinde biyosensörün çalışma aktivitesini anlaşılabilir. İdeal bir biyosensör tasarımında dikkat edilmesi gereken özellikler;

- Seçicilik, biyoreseptörün karışım içerisindeki analiti tanıma özelliğidir. Biyosensörler için biyoreseptörü seçerken seçicilik en dikkat edilmesi gereken özelliktir.
- Tekrarlanabilirlik, biyoreseptör ile analit arasındaki biyo-tanıma eyleminin tekrar tekrar devam edebilmesidir. Tekrarlanabilirlik, çeviricinin ve sinyal işleyicinin hassasiyeti ve doğruluğu ile ilgilidir.

- Hassasiyet, biyo-tanıma olayı sonucunda elde edilen sonucun tekrarlı çalışmalarda da elde edilebilmesidir.
- Kararlılık, biyo-tanımanın sistem içerisindeki ve çevredeki değişimlere duyarlılık derecesidir. Kararlılık değişimleri ölçülen sinyalin doğruluğuyla ilişkilidir.
- Duyarlılık, biyosensör tarafından algılanabilen en alt tanıma sınırıdır (LOD).
- Doğrusallık, ölçülen sinyalin doğruluğunun matematiksel olarak yorumlanmasıdır.

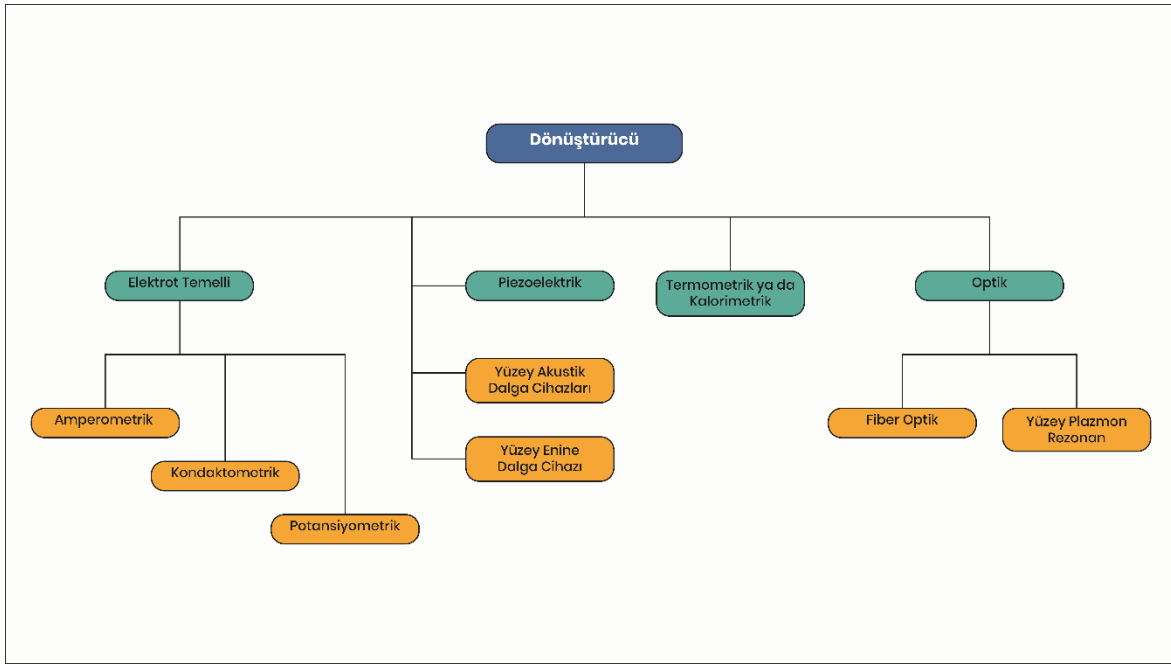
Biyosensörler yaşam kalitesini iyileştirmek amacıyla geniş bir uygulama alanında tercih edilmektedir. Biyosensörler, geleneksel yöntemlere göre, kullanımı kolay, düşük maliyet, hızlı, taşınabilir, örnek hazırlama kolaylığı ve kullanımında özel yetkin personel gerekliliği duyulmamaktadır (Şekil 2.13.). Biyosensörler, tıp başta olmak üzere, kimya, fizik, biyoloji tarım, savunma sanayi, çevresel algılama ve gıda analizlerinde sıklıkla kullanılmaktadır [67].



Şekil 2.13. Biyosensörlerin kullanıldığı farklı uygulama alanları.

2.3.1 Biyosensörlerin Temeli ve Çeşitleri

Biyosensörlerin çalışma prensibi; çözelti içerisindeki hedef analitin, biyosensör reseptör yüzeyine enjekte edilmesi ile başlar. Hedef analit reseptör yüzeyinde bulunan tanıyıcı moleküllere tutunur. Tutunma işlemine bağlı olarak, ölçülebilir biyokimyasal tepkime oluşur. Bu sinyal analitin yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Oluşan biyokimyasal tepkime, sinyal çeviricinin türüne göre, elektrokimyasal, optik, piezoelektrik ve kalorimetrik sinyale dönüştürülür (Şekil 2.14.) [65, 66].



Şekil 2.14. Biyosensör çeşitleri.

2.3.1.1 Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal sensörler, biyolojik süreçlerin takip ve teşhisi için çevre, tıp, savunma ve sanayi alanlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Elektrokimyasal sensörler elektrot yüzeyinde gerçekleşen biyolojik tanıma olayları süresince, elektro-kimyasalların yoğunluğuna bağlı olarak elektroaktif sinyallerin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır.

Elektrokimyasal sensörler, ölçüm prensibine göre 3 gruba ayrılır. Amperometrik, potansiyometrik ve empedimetrik sensörlerdir. Kullanılan elektrolide bağlı olarak geniş sıcaklık aralıklarında çalışabilmektedir.

Elektrokimyasal sensörler, küçük ebatlarda ve düşük maliyetli olması nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. Farklı derişimlerdeki moleküllerinde bulunduğu ortamlarda daha etkin kullanılan sensör, hassasiyeti, kararlılığı ve seçiciliği ortam koşullarına göre farklılık göstermektedir [68-72]. Çizelge 2.11’de farklı Elektrokimyasal sensör uygulamalarından bahsedilmiştir.

Çizelge 2.11. Elektrokimyasal sensör uygulamaları.

Biyosensör Türü	Analit	Tespit Sınırı (LOD)	Referans
Amperometrik	<i>Listeria</i> <i>Monositogenez</i>	500 kob/mL	[73]
Amperometrik	<i>Escherichia coli</i>	1.0 kob/mL	[74]

2.3.1.2 Optik Biyosensörler

Optik biyosensörler, biyolojik süreçlerin takip ve teşhisi için çevre, tıp, gıda, kimya, biyoloji ve eczacılık alanlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Optik Sensör yüzeyinde biyolojik etkileşimlere bağlı olarak oluşan kırılma indisi değişimlerin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır.

Optik algılama 2 farklı şekilde gerçekleştirilebilmektedir.

1. Etiketlemeye dayalı optik çevirici; Optik sensör yüzeyine bağlanan hedef analitin küçük molekül olması nedeniyle, hedef analit ile biyo-tanım bölgesi arasında gerçekleşen etkileşim optik sensör tarafından ölçülebilmektedir. Bu nedenle, hedef analitin -biyo tanıma bölgesine bağlandığında sinyal oluşumu kolorimetrik, floresan veya lüminesan bir yöntemle algılanır.

2. Etiketsiz optik çevirici; Herhangi işaretleme basamağına ihtiyaç duymadan optik sinyalin ölçülebilmesidir.

Etiketsiz optik çeviricilerin, herhangi işaretleme basamağına ihtiyaç duymaması nedeniyle, analizi süresinde azalma sağlanarak daha ucuza üretilmesi nedeniyle daha avantajlıdır [70-72,75,83,84]. Çizelge 2.12’de farklı Optik sensör uygulamalarından bahsedilmiştir.

Çizelge 2.12. Optik biyosensör uygulamaları.

Biyosensör Türü	Analit	Tespit Sınırı (LOD)	Referans
SPR	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.0×10^4 kob/mL	[76]
SPR	<i>Listeria Monositogenes</i>	2.0×10^6 kob/mL	[77]

2.3.1.3 Piezoelektrik Biyosensörler

Piezoelektrik biyosensörler, biyolojik süreçlerin takip ve teşhisi için çevre, tıp, gıda, kimya, biyoloji ve eczacılık alanlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Piezoelektrik Sensör yüzeyinde biyolojik etkileşimlere bağlı olarak oluşan kütle değişimlerin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Kütle değişiminin ölçülmesi nedeniyle küçük moleküllerin tespitinde oldukça etkilidir. Taşınabilirliği, özgüllüğü ve kararlılığı en büyük avantajlarıdır. Bu sensörler, farklı fazlarda çalışabilmektedir [78]. Çizelge 2.13’de farklı Piezoelektrik sensör uygulamalarından bahsedilmiştir.

Çizelge 2.13. Piezoelektrik biyosensör uygulamaları.

Biyosensör Türü	Analit	Tespit Sınırı (LOD)	Referans
QCM	Kuinin	32.4 mg/L	[79]
QCM	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	1.2×10^2 kob/mL	[80]

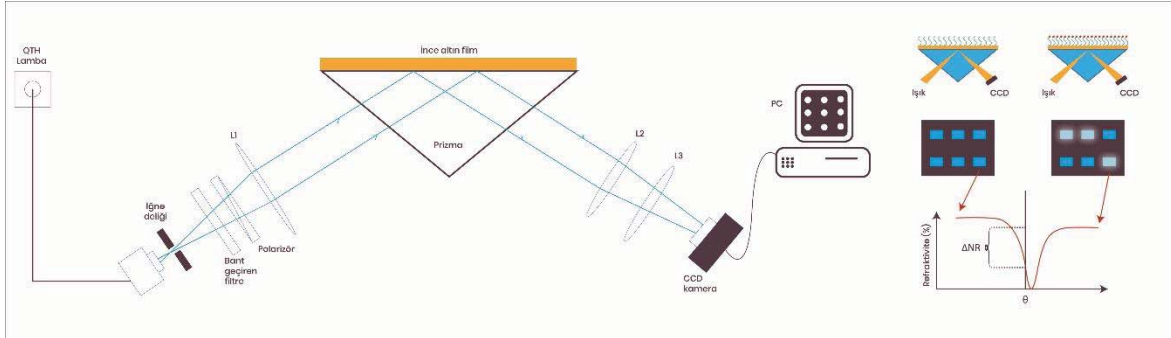
2.3.1.4 Kolorimetrik Biyosensörler

Kolorimetrik biyosensörler, biyolojik süreçlerin takip ve teşhisi için çevre, tıp, gıda, kimya, biyoloji ve eczacılık alanlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Kolorimetrik Sensör yüzeyinde biyolojik etkileşimlere bağlı olarak oluşan ısı değişimlerin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır [81,82,85].

2.3.2 YüzeY Plasmon Rezonans Biyosensör

YüzeY plazmon rezonansı, 2 farklı ortamın ara yüzeyinde oluşan kırılma indisi değişimidir. Bu teknik tarihsel olarak ilk kez, 1902 (Wood) yılında, farklı dalga boylarına sahip ışık huzmesinin, kırılmaya bağlı ışığın spektrumunda farklılıklar gözlemlenmesine dayandırılmaktadır (Şekil 2.15). Gözlemlenen değişimin fiziksel olarak açıklanması ilk kez Otto tarafından yapılan hava ve metal yüzey ara yüzündeki plazmon uyarılmasının keşfedilmesi yapılabilmıştır. 1968 yılında Kretschmann tarafından yüzeY plazmon rezonansın optik düzeneğinde kullanılmıştır. 1983 yılında ilk kez Liedberg ve arkadaşları tarafından biyoloğılama amacıyla kullanılmıştır [83].

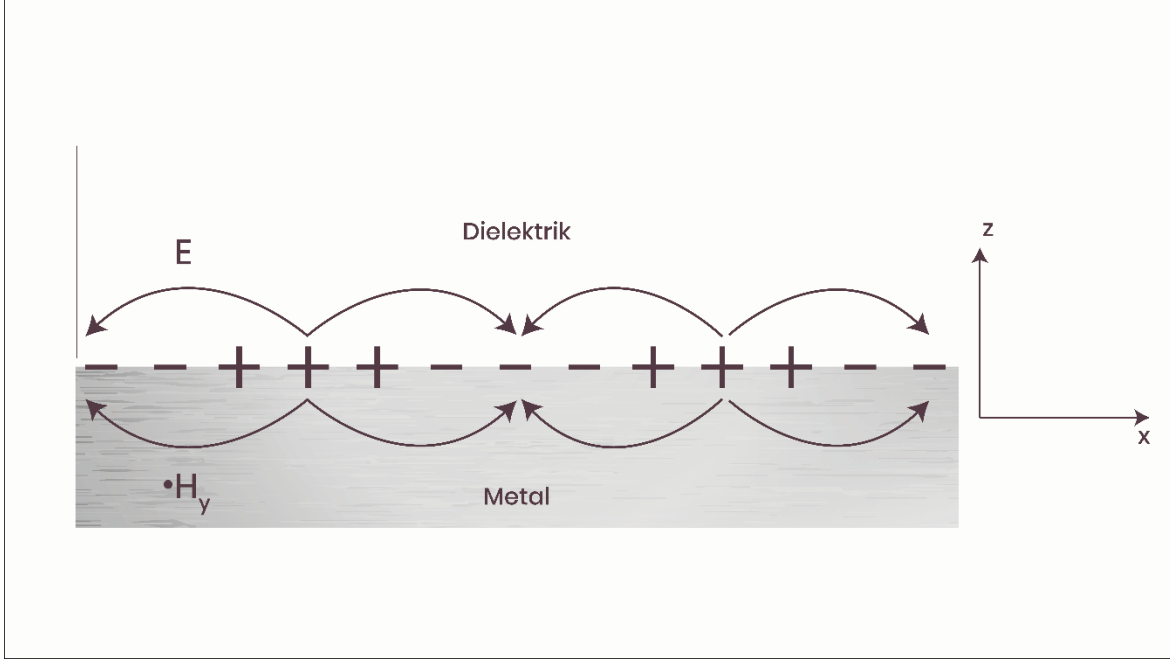
YüzeY plazmon rezonans tekniğinin herhangi işaretleme basamağına ihtiyaç duyulmadan, gerçek zamanlı olarak yüksek hassasiyetle ölçüm yapabilmesi, günümüzde pek çok firma tarafından ticari olarak üretilmektedir. YüzeY plazmon rezonans biyosensörler, makromoleküllerin (protein-protein, enzim-substrat veya inhibitör, protein-DNA, reseptör-ilaç, lipid membran-protein, vb.) tespit edebilmesi sayesinde farklı multidisipliner alanlarda kullanılabilir [86,87].



Şekil 2.15. YüzeY plazmon rezonans çalışma prensibi.

2.3.2.1 YüzeY Plasmon Rezonans Biyosensörün Çalışma Prensibi

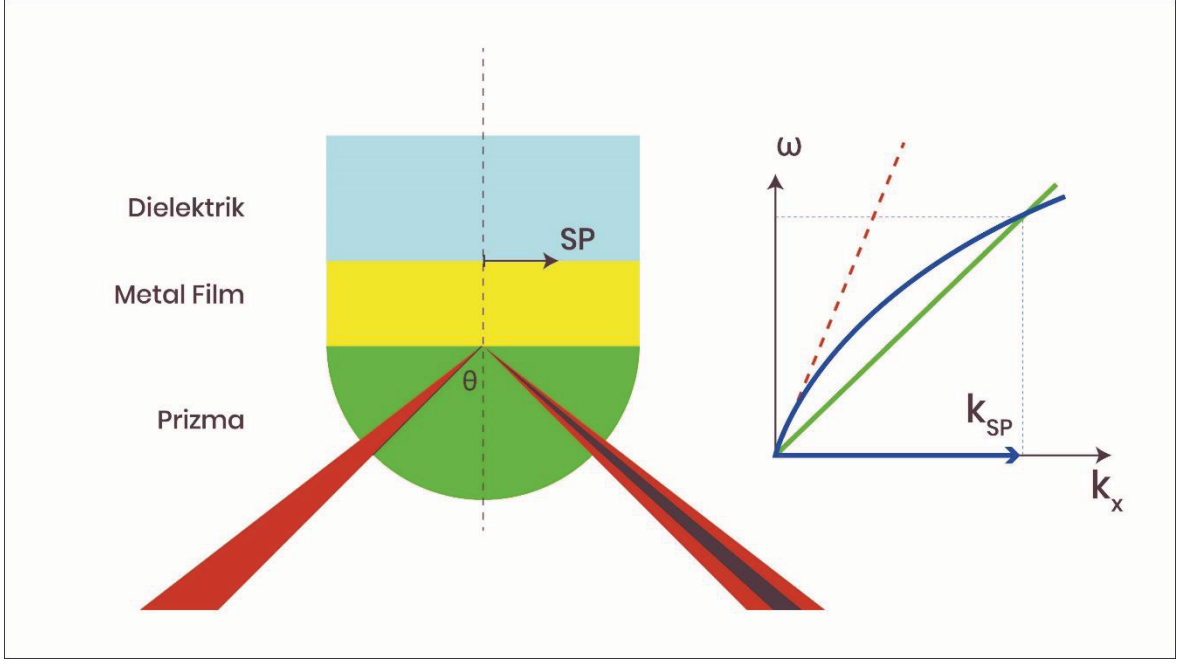
YüzeY plazmon, iki farklı kırılma indisine sahip malzemenin ara yüzeyinde oluşan, dikey olarak salınan elektromanyetik dalgalanmalardır. Bu tekniğin çalışma prensibi; metal yüzeye gönderilen ışık huzmesinin bir kısmında yansıma oluşurken bir kısmını metal yüzey absorbe ederek homojen olmayan dalga oluşumuna dayanmaktadır (Şekil 2.16.).



Şekil 2.16. Yüzey plazmon rezonans çalışma prensibi.

Metal yüzeyde oluşan elektromanyetik dalga, dielektrik yüzeye doğru yayılır. Bu yayılma esnasında yüzey plazmonun şiddetine bağlı olarak ışığın dalga boyunda değişimlere neden olur. Yüzey plazmon rezonans temelli sensörlerin en büyük avantajı dalga boyundaki değişimlere karşı yüksek hassasiyet göstermesidir.

Yüksek kırılma indisli bir prizmadan geçen ve yansıyan ışık dalgası, metal yüzeyde dalga boyunun kırılarak azalmasına neden olur (Şekil 2.17.). Metal yüzeyde oluşan dalga dielektrik yüzeye doğru yayılır. Metal yüzeyden diğer yüzeye doğru yayılan plazmonun şiddetine bağlı olarak ışığın dalga boyunda değişimler meydana gelir. Oluşan bu değişimler sayesinde yüzey plazmon rezonans tekniği, kinetik ölçümlerde kullanılma imkanı sağlamaktadır [88].

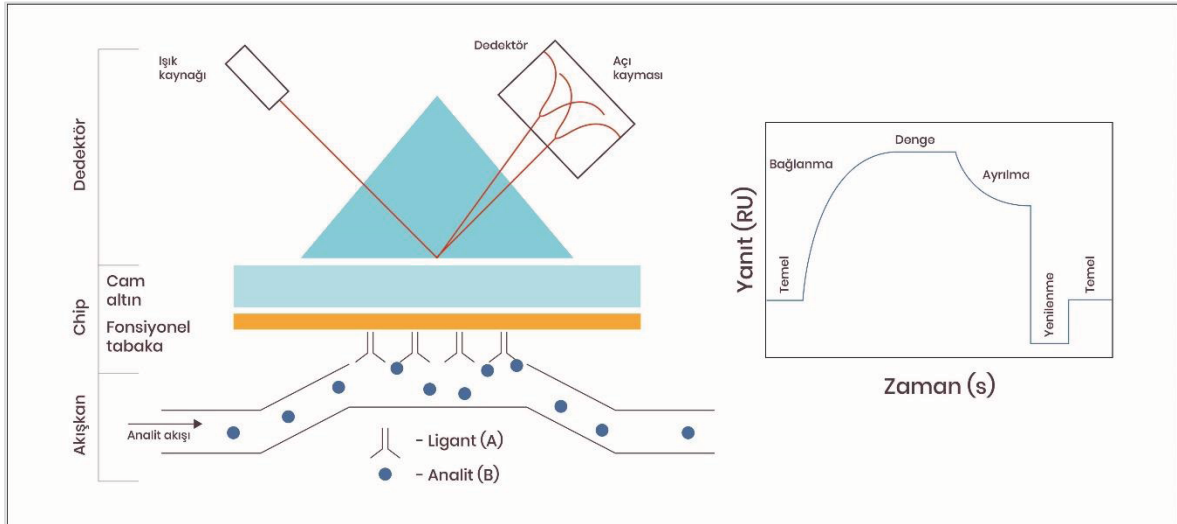


Şekil 2.17. Yüzey plazmon rezonans biyosensörlerin kırılma indisinin gösterimi.

Işığın kırılma indisindeki değişiklik, yüzey plazmon rezonans sensörlerin yayılma sabitinde değişime neden olur. Şekilde gösterildiği gibi metal yüzeye gönderilen ışık huzmesi, belli bir açı derecesinde geriye doğru yansır ve yansıyan ışığın şiddeti optik dedektör tarafından ölçülür. Metal yüzeye bağlı biyotanıma bölgesinde gerçekleşen her değişim yansıyan ışığın kırılma indisinde değişime neden olur. Kırılma açısında gözlemlenen farklılık eş zamanlı olarak tespit edilebilir.

Biyomoleküler etkileşimlerin gerçekleştiği ortam metal yüzeye entegre edilir. Metal yüzey için genellikle altın veya gümüş malzeme kullanılır, metal yüzeyin <100 nm kalınlığında olması tercih edilir.

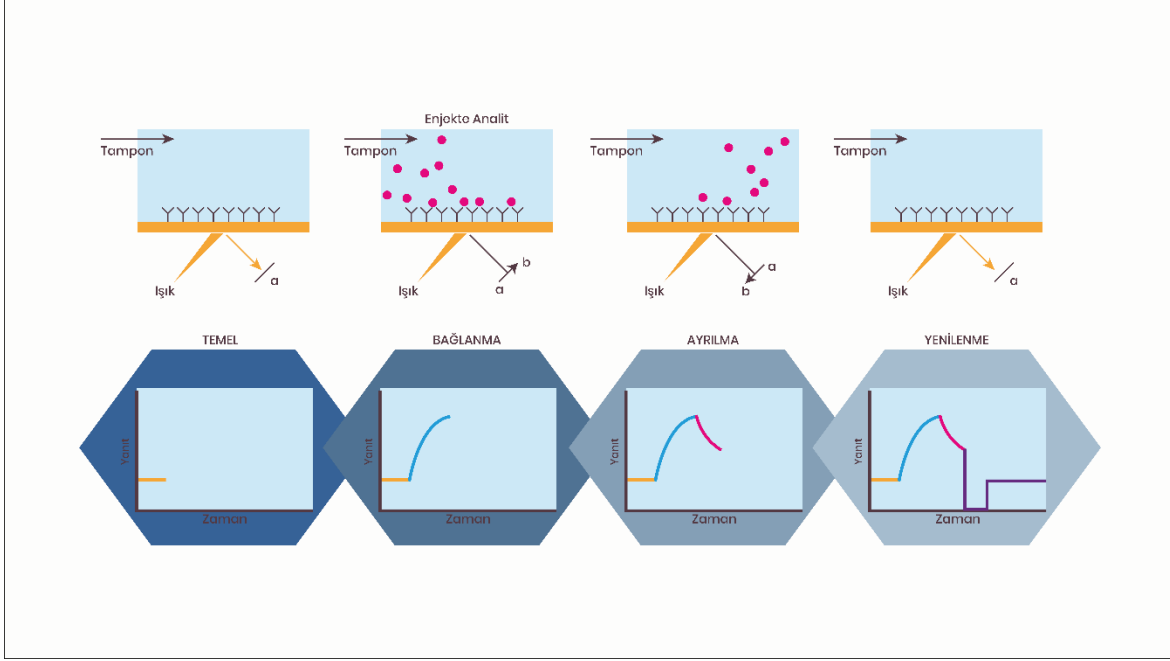
Kırılma açısının zamana bağlı değişimi sensogram grafiğinde eş zamanlı gözlemlenir. Bu grafik sayesinde, moleküler bağlanma-ayrılma ve bağlanan miktar eş zamanlı olarak gözlemlenebilmektedir (Şekil 2.18.).



Şekil 2.18. Kırılma açısının zamana bağlı değişimi sensörgram grafiğinde eş zamanlı gösterimi.

Yüze Plazmon Rezonans ölçümleri 6 aşamada tamamlanır (Şekil 2.19).

- 1- Sensör yüzeyi tampon çözelti ile temizlenerek bağlanmaya hazır hale getirilir.
- 2- Hedef analiti içeren çözelti sensör yüzeyine bırakılarak bağlanma başlar
- 3- Sensör yüzeyinde hedef molekül yüzeye tam doygunlukla bağlanır.
- 4- Bağlanma doygunluğundan sonra hedef analit yüzeyden ayrıştırılır.
- 5- Yeniden bağlanma için yüzey hedef analitten temizlenir.
- 6- Bağlanma kinetiği hesaplanır.



Şekil 2.19. Yüze plazmon rezonans ölçüm aşamaları.

Sonuç olarak, sensogram grafiğinde, rezonans sinyal değişimi sayesinde, yüzeye analit bağlanması–ayrışması ve yüzey üzerindeki madde miktarı ölçülmüş olacaktır.

2.3.2.2 Yüze Plasmon Rezonans Biyosensörün Kullanım Alanı

Yüze plazmon rezonans sensörleri, düşük derişimlerdeki etkileşimleri herhangi işaretleme basamağına ihtiyaç duymadan eş zamanlı gözlemleyebilmesi ve bu etkileşimlerin termodinamik ve kinetik veriler elde edilebilmesi nedeniyle çok geniş kullanım alanları bulunmaktadır. Literatürde yüze plazmon rezonans sensörleriyle ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan başlıca yaygın kullanım alanları; Farnosötik analizler, proteomik-genomik çalışmalar, alerjenler, klinik uygulamalar, çevresel kirlenici ölçümleri, mikrobiyal ölçümler ve gıda analizlerinde sıklıkla tercih edilmektedir [89-92].

2.3.2.3 Yüze Plasmon Rezonans Biyosensörün Moleküler Baskılama Teknolojisi İle Kullanımı

Moleküler baskılama teknolojisi, moleküler düzeydeki tanıma olaylarının sentetik olarak taklit edilebilmesidir. Moleküler baskılama tekniğinin en kolay ve etkili olarak uygulanabilme yolu

polimerizasyondur. Bu teknikle hazırlanan özel tanıma bölgelerine sahip polimerler, kromatografik sabit fazlar, katı faz ekstraksiyonları ve biyosensör çeşitleriyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Moleküler baskılanmış polimerin entegre edildiği, optik sensör çeşitlerinden Yüzey plazmon rezonans sensörler, yüzeylerinde gerçekleşen etkileşimlere oldukça hassastır [93].

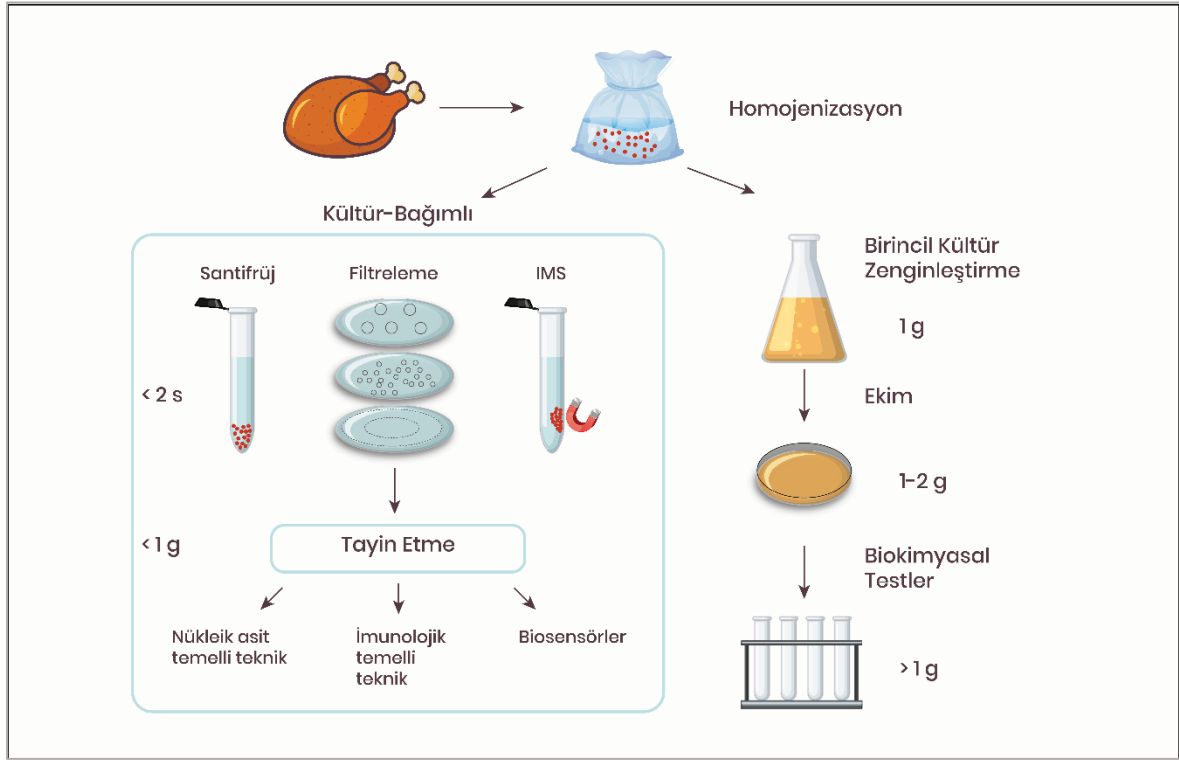
Teşhiste kullanılan geleneksel yöntemlerin eksikleri, alternatif yeni yöntemlerin kullanılmasına yol açmıştır. Moleküler baskılanmış polimer temelli yüzey plazmon rezonans sensörler, teşhis amacıyla son yıllarda tercih edilen en popüler uygulamalardandır. Bu teknik ile, biyogörüntüleme, tıbbi teşhis, çevresel izleme, gıda kalite kontrolü, savunma sanayi ve ilaç salınımı gibi farklı pek çok alanda kullanılmaktadır. [94-101]

2.3.2.4 Yüzey Plasmon Rezonans Biyosensörün Bakteri Tayininde Kullanımı

Gıdalardaki bakteri türlerinin tespit etmeye yönelik kullanılan geleneksel kültürel yöntemler; besleyici ortamda canlı bakteri büyümesine dayanır. Gıda ürünlerinin kültürel analizinde, numune homojen hale getirilir, sonrasında türe özgü besiyeri ortamında kültüre (çoğaltılması) edilir ve bakterinin varlığının kesinleştirilebilmesi için biyokimyasal test uygulanır.

Kültürel bakteri tanıma metotları, teknik ve yetkin personele ihtiyaç duyulan biyokimyasal testlerden oluşması ve bu yöntemlerin analiz ortam, personel yetkinliği gibi farklı koşullara bağlı olarak uzun sürede tamamlanması, yüksek analiz maliyetine neden olması ve analizin tekrarlanabilirliğinde sorunlarla karşılaşılması gibi dezavantajlara sahiptir. [95-100]

Geleneksel bakteri tayininde kullanılan yöntemlere alternatif olarak tercih edilen biyosensörlerin en önemli avantajları; yetkin personel, analiz süresinde kısalma ve kontaminasyon riskini azalmasıdır. Biyosensörlerin yüksek hassasiyetle ölçüm yapabilmesi, eş zamanlı analit çözelti miktarının tespit edilebilmesi ve taşınabilir özellikte olması son yıllarda popüler tayin yöntemleri arasında yerini almasını sağlamıştır (Şekil 2.20).



Şekil 2.20. Bakteri analizinde kullanılan tespit yöntemleri.

SPR sensörler dönüştürücü yüzeyindeki etkileşimleri dikkate aldığı için, herhangi işaretleme basamağına ihtiyaç duymadan anlık tespit, yüksek tekrarlanabilirlik sağlaması nedeniyle, gıda ürünleriyle kontamine olan bakteri türlerinin tayininde kullanılan en yaygın biyosensör türü optik biyosensör türüdür. Biacore ve Spreeta gibi ticari yüzey plazmon rezonansların bakteri tayininde kullanımları büyük ilgi görmüştür.

Yüzey plazmon rezonans sensörlerin bakteri tayininde kullanımı hakkında literatürde fazla sayıda yayın bulunmaktadır. Yapılan çalışmalardan bazı örnekler Çizelge 2.14.'de örneklendirilmiştir [102].

Çizelge 2.14. Yüzey plazmon rezonans sensörlerin bakteri tayininde kullanımı hakkında yapılan çalışmalar.

Hedef Bakteri	Numune	Tayin Metodu	Tespit Edilme Sınırı (LOD)	Tespit Edilme Süresi	Referans
<i>Campylobacter jejuni</i>	Tavuk Eti	SPR	1.0×10^3 kob/mL	60 dakika	[103]
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Elma Suyu, Süt	SPR	1.0×10^2 - 1.0×10^3 kob/mL	30 dakika	[104]
<i>Salmonella Enteritidis</i>	Tavuk Eti	SPR	1.0×10^6 kob/mL	20 dakika	[105]
<i>Escherichia coli</i>	Ispanak	SPR	1.0×10^4 kob/mL	2,5 saat	[106]

3. KİMYASAL DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kimyasal Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar tedarik bilgilerileri 4 başlık altında detaylandırılmıştır.

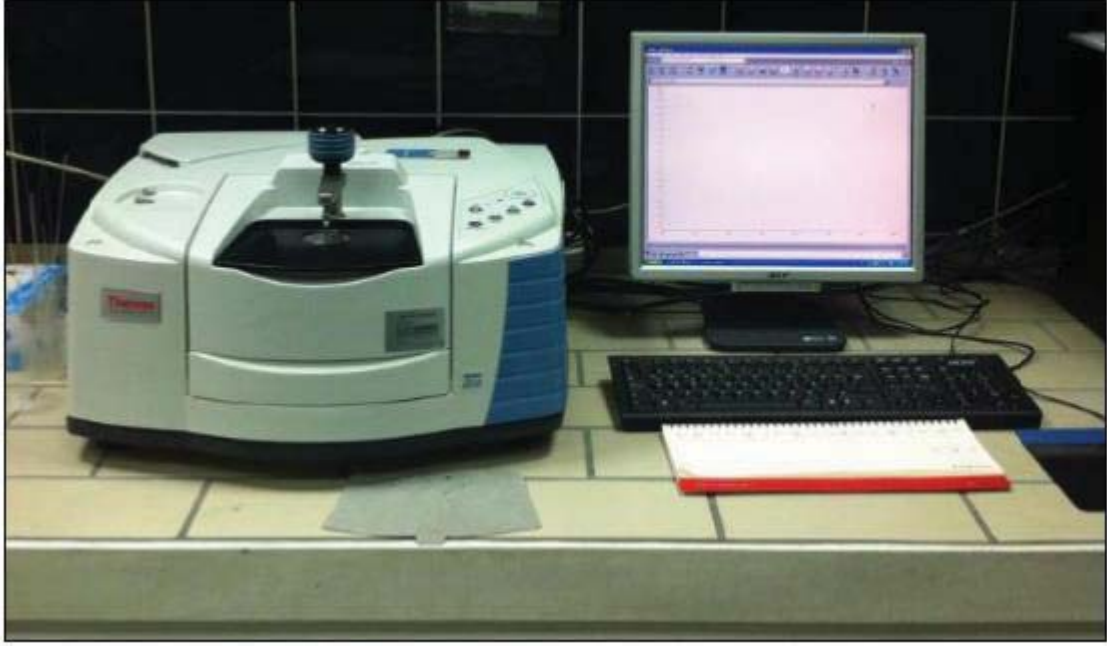
Mikroorganizmalar; *Pseudomonas sp.* (ATCC® 19151), *Staphylococcus aureus* (ATCC® 12600), *Salmonella paratyphi* (ATCC® 9150) ve *Escherichia coli* (ATCC® 11775) saf kültürleri, Amerika, Amerikan tipi kültür koleksiyonundan (ABD, American Type Culture Collection, ATCC) tedarik edilmiştir. Saf kültürler (dondurularak kurutulmuş) kullanıma kadar 2°C ila 8°C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Fonksiyonel Monomer; L-histidin metil ester, 2,2'-azobisisobütironitril (AIBN) Sigma Chemical Company'den (ABD) tedarik edilmiştir. Çapraz Bağlayıcı; Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), Sigma Chemical Company'den (ABD) tedarik edilmiştir. Diğer kimyasallar; 3-aminopropil-trietoksisilan (APTES), ve gluteraldehit (GA) Sigma Chemical Company'den (ABD) tedarik edilmiştir. Çalışmada kullanılan hidrokinon, diklorometan, trietilamin, metakroil klorür ve diğer kimyasal malzemeler analitik saflıkta Merck AG'den (Darmstadt, Almanya) tedarik edilmiştir. Çalışmada kimyasal kullanıma kadar 4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2 Ekipmanlar

Tez çalışmasında kullanılan ekipmanlar sırasıyla detaylandırılmıştır.

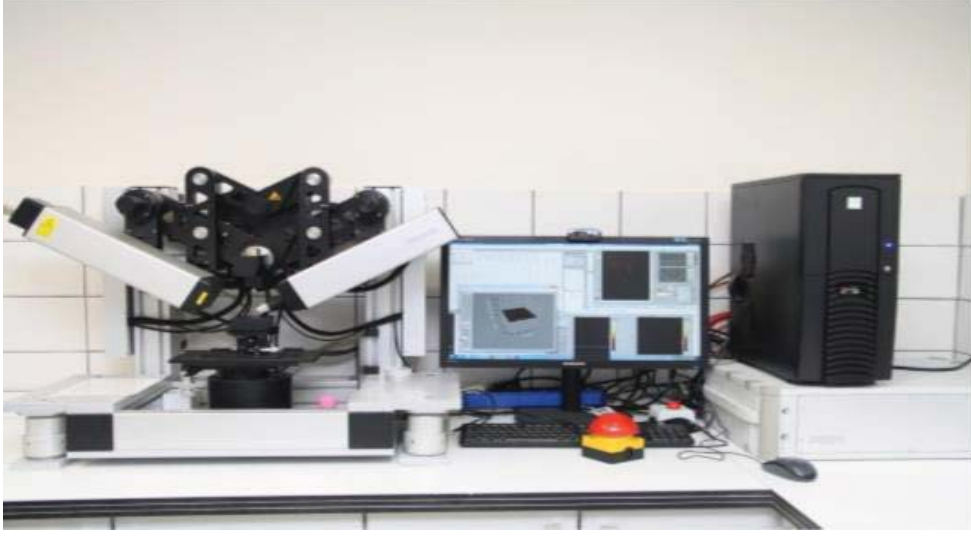
FTIR-ATR spektrofotometre; İçeriği bilinmeyen karışımların, organik ve inorganik kimyasal bileşenlen yapılarının bir nevi parmak izinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Çalışmada Şekil 3.1’de cihaz görseli mevcut bulunan, Shimadzu marka (Japonya), FTIR 8000, model cihaz tercih edilmiştir.



Şekil 3.1. FTIR-ATR spektrofotometre cihaz görseli.

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR); Organik moleküllerin kimyasal yapısı, bileşenleri ve içeriklerinin belirlenmesinde kullanılan spektroskopik yöntemdir. Çalışmada, Bruker AV marka (Amerika) cihaz tercih edilmiştir

Elipsometre; İnce film yapıların, pürüzlülüğü, kalınlığı, derinliğini, kristalitesini, dielektrik iletkenliğini ve diğer malzeme özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Çalışmada Şekil 3.2’de cihaz görseli mevcut bulunan, Nanofilm marka (Almanya), EP3 model cihaz tercih edilmiştir.



Şekil 3.2. Elipsometre cihaz görseli.

Temas Açısı Ölçüm Cihazı; Yüzey üzerindeki damla görüntülerini alarak, damlanın yüzey üzerindeki yapısının zamana bağlı değişimini gözlemlemek için kullanılmaktadır. Çalışmada Şekil 3.3’de cihaz görseli mevcut bulunan, Krüss marka (Almanya), DSA100 model cihaz tercih edilmiştir.



Şekil 3.3. Temas açısı ölçüm cihaz görseli.

SEM Cihazı; Herhangi bir yüzeye elektron demeti gönderilerek yüzeyin 3 boyutlu olarak görüntülenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Çalışmada, Field Emission marka (Amerika), Quanta 400F model cihaz tercih edilmiştir.

Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Cihazı; Metal yüzeye yakın ışığın kırılma açısındaki değişimleri ölçerek moleküler bağlanmaları basit ve doğrudan ölçüm yapabilmek amacıyla kullanılmaktadır. Çalışmada Şekil 3.4’de cihaz görseli mevcut bulunan, GWC Technologies marka (Amerika), SPRImager II model cihaz tercih edilmiştir.



Şekil 3.4. Yüzey plazmon rezonans (SPR) cihaz görseli.

3.3 Deneysel Yöntemler

3.3.1 Fonksiyonel Monomer Sentezi ve Karakterizasyonu

Bu çalışmada, N-metakriloil (L) histidinmetilester (MAH) monomeri ve Cu (II) iyonlarının etkileşimleriyle sentezlenen fonksiyonel monomer kullanılmıştır.

Fonksiyonel monomerin sentezlenmesi esnasında aşağıdaki işlem basamakları sırasıyla uygulanmıştır.

- 100 mL diklorometan içerisinde, L-histidin metil ester (5.0 g) ve hidrokinon (0.2 g) çözülmüştür.

- 0°C'ye soğutulan çözelti içerisine trietilamin (12.7 g) ve metakroil klorür (5.0 mL) ilave edilmiştir.
- Çözelti karışımı 25°C'de 120 dakika boyunca karıştırılmıştır.
- Reaksiyona girmeyen bileşikler NaOH (%10) çözeltisi kullanılarak çözüldükten ayrılmıştır.
- Son durumda çözelti karışımı etanol içerisinde çözülmüştür.

Sentezlenen fonksiyonel monomerin karakterizasyonu için FTIR spektrometre cihazı kullanılmıştır. Karakterizasyon işleminde fonksiyonel monomer, KBr ile hazırlanarak ölçüm analizleri gerçekleştirilmiştir. Fonksiyonel monomerin proton (H) spektrum ölçümleri NMR cihazı ile yapılmıştır [107-116].

3.3.2 Ön-Kompleks Hazırlanması

Pseudomonas spp. bakterisinin SPR çip yüzeyinde seçici kavite oluşumu için uygun fonksiyonel monomer olarak MAH seçilmiştir. MAH amino asit temelli fonksiyonel monomer ile Cu (II) iyonları metal şelat koordinasyonu yaparak *Pseudomonas* spp. bakterisine spesifik bağlanır. MAH monomeri ve Cu (II) iyonlarında hazırlanan süspansiyon ön-kompleks karışımı 1:1 molar oranı olarak seçilmiştir. Bu ön-kompleks karışımı rotatorda 20 rpm hızda 30 dakika karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.3.3 Nanofilm Temelli SPR Biyosensörlerin Hazırlanması

3.3.3.1 Cam Yüzeylerinin Modifikasyonu

Bu aşamada mikro-temas tekniği ile *Pseudomonas* spp. kalıp molekülü SPR çipi üzerine baskılanmıştır. Bu yöntemde ilk olarak mikroorganizma baskılanmış polimerin hazırlanmasında kullanılan cam malzemenin yüzeyinin temizlenerek modifiye edilmesi gerekmektedir. Bu işlem esnasında uygulanacak adımlar sırasıyla bahsedilmiştir.

Cam malzemenin modifikasyon öncesinde aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır.

- 2.5 cm×7.5 cm ebatında 1 mm kalınlığındaki cam malzeme kullanılmıştır.

- 20 mL ethanol çözültüründe cam malzeme 60 rpm'de 10 dakika çalkalanmaya bırakılmıştır.
- Cam malzemeler sonrasında saf su ile yıkanarak ve 80°C'de kurutulmuştur.
- 1.0 M hidroklorik asit (HCl) çözültüsü içerisinde cam malzemeler 10 dakika bekletilerek sonrasında 3 kez saf su ile yıkanmıştır.
- 1.0 M sodyum hidroksit (NaOH) çözültüsü içerisinde cam malzemeler 10 dakika bekletilerek sonrasında 3 kez saf su ile yıkanmıştır.
- Cam malzemeler son olarak ethanol ile yıkanmıştır.

Temizlenen cam malzemenin modifiyesi esnasında aşağıdaki işlem basamakları sırasıyla uygulanmıştır.

- 3-aminopropil-trietoksisilan (APTES) , %10'luk ethanol içerisinde çözülmüştür.
- Hazırlanılan çözültü içerisinde cam malzemeler 60 rpm'de 60 dakika çalkalanmaya bırakılmıştır.
- Bu işlemin amacı; amino grupların cam malzeme yüzeyine takılmasını sağlamaktır.
- Çözültüden çıkarılan cam malzemeler 3 kez ethanol ve 3 kez saf su ile yıkanarak kurutulmuştur.
- PBS tamponu (pH 7.4) içerisinde %5'luk gluteraldehit (GA) çözülmüştür.
- Hazırlanılan çözültü içerisinde cam malzemeler 60 rpm'de 60 dakika çalkalanmaya bırakılmıştır.
- Bu işlemin amacı; amino gruplarının aktifleştirilmesi sağlanmaktadır.
- Cam malzemeler son olarak 3 kez PBS tamponu (pH 7.4) ve 3 kez saf su ile yıkanarak kurutulularak cam malzeme yüzeyi modifiye edilmiştir.

3.3.4 SPR Çipin Yüzey Modifikasyonu

Kalıp *Pseudomonas* spp. bakterisinin kullanılmasıyla hazırlanan MIP ve NIP SPR biyosensörün tasarımı GWC SPRimager II sisteminde gerçekleştirilmiştir. Ticari olarak hazır olarak temin edilen çip (SPRchip™), 2.5 cm×2.5 cm ebatında ve SF10 cam yüzey üzerinde 2.0 nm titanyum ve 42.5 nm kalınlığında altın kaplama içermektedir.

SPR yüzeyinin modifikasyonu işleminde; çip altın yüzeyi öncelikle temizlenmiş, sonrasında 12 saat süreyle 5.0 µL allil merkaptanla yüzeye damlatıp ve bekletilerek hazırlanmıştır. Bu işlemin amacı; altın yüzey üzerinde polimerizasyon işleminin için tiyol gruplarının oluşması sağlanmıştır. Tiyol gruplarının kuvvetli tutunması ile yoğun ve düzenli zincir-zincir oluşumları hazırlanmıştır. Bu modifikasyon işlemi sonucunda, doymamış gruplar dışarıya yönelik düzenlenmiştir.

3.3.4.1 Nanofilm Temelli SPR Biyosensörlerin Hazırlanması

Pseudomonas spp. baskılanmış nanofilm hazırlanması esnasında aşağıdaki işlem basamakları sırasıyla uygulanmıştır.

- Modifiye edilen cam malzeme yüzeyine 200 µL *Pseudomonas* spp. çözeltisi (1×10^7 kob/mL) damlatılmıştır.
- Çözelti cam malzeme yüzeyinde +4°C’de 18 saat bekletilmiştir.
- Cam yüzeylerin üzerindeki tutunamayan bakterilerin uzaklaştırılması için PBS tamponu (pH 7.4) ile cam yüzey yıkanmıştır.
- Cam yüzeylere tutturulmuş bakteriler nanofilmin hazırlanmasında kalıp olarak kullanılmıştır.

Pseudomonas spp. baskılanmamış nanofilm hazırlanma işleminde; cam yüzeyler APTES ve GA ile modifiye edilmiş ve PBS tamponu (pH 7.4) içerisinde yıkanıp kurutulduktan sonra kullanılmıştır.

Baskılanmış/baskılanmamış nanofilm temelli SPR biyosensör hazırlanması esnasında aşağıdaki işlem basamakları sırasıyla uygulanmıştır.

- 1:4 mol oranında hazırlanmış ön-kompleks ile etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) çapraz bağlayıcısı ile hazırlanılan karışım 2 saat oda sıcaklığında karıştırılır.
- Hazırlan karışım içerisine başlatıcı olarak 1.0 mg azobisizobütironitril (AIBN) eklenir.
- Önceden modifiye edilen SPR biyosensörün yüzeyine, polimerizasyon karışımından 10 µL eklenmiştir.

- Cam yüzey üzerinde hazırlanan nanofilm kalıp, polimerizasyon karışımı eklenmiş çip yüzeyi ile tutularak polimerizasyon işlemi gerçekleştirilir.
- Mikro-temas polimerizasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan polimer baskılamada sistem UV ışığında (100 W, 356 nm) 40 dakika bekletilmiştir.
- Polimerizasyon işlemi sonrasında cam malzemler çip yüzeyinde uzaklaştırılır.
- Baskılanmış/baskılanmamış SPR biyosensör etanol ve ardından saf su ile yıkanarak kurutulmuştur.

3.3.5 Nanofilm Temelli Baskılanmış ve Baskılanmamış SPR Biyosensörlerin Karakterizasyonu

Nanofilm temelli MIP ve NIP SPR biyosensörlerin karakterizasyonunu FTIR-ATR, temas açısı ölçümleri, elipsometri ölçümler ve SEM görüntüleri ile yapılan sonuçlara göre değerlendirilmiştir.

FTIR-ATR Spektrometresi: SPR biyosensör yüzeyindeki bağlanma bölgelerinin istenilen yapılarda oluşup oluşmadığı kontrol edilmesi amacıyla kullanılmıştır.

Temas Açısı Ölçümleri: SPR biyosensör yüzeyinin hidrofilik/hidrofobik karakterinin belirlenebilmesi için kullanılmıştır.

Elipsometre: SPR biyosensör yüzeyinin kalınlık ölçümlerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

SEM: SPR biyosensör yüzeyindeki moleküler baskılamasının belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

3.3.6 Nanofilm Temelli SPR Biyosensörler İle Kinetik Analizler

Pseudomonas spp. baskılanmış SPR biyosensörün karakterizasyon analizleri tamamlanmasının ardından kinetik analizleri yapılmıştır.

Kinetik analiz çalışmalarında;

- Farklı konsantrasyonlarda (1.0×10^2 – 1.0×10^4 kob/mL) *Pseudomonas* spp. hazırlanmıştır.
- 2.5 mM Glisin:HCl (pH 2.5) çözeltisi desorpsiyon aşamasında kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

Hazırlanan, farklı konsantrasyondaki bakteri solüsyonu SPR sisteminden kullanılarak ölçümleri yapılmıştır.

3.3.6.1 Adsorpsiyon İzoterm Modelleri

Pseudomonas spp. baskılanmış SPR biyosensörün etkinliğinin incelenebilmesi için Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich adsorpsiyon izoterm modelleri kullanılarak hesaplamalar ve ölçümler yapılmıştır.

3.3.7 Nanofilm Temelli SPR Biyosensörün Tekrarlanabilirliğinin İncelenmesi

Pseudomonas spp. MIP SPR biyosensörün tekrarlanabilirlik değerinin belirlenebilmesi için;

- 1.0×10^3 kob/mL konsantrasyonundaki numune SPR sisteminden geçirilmiştir.
- Geçiş işlemi esnasında sistem uygun rezonans açısına ayarlanmıştır.
- PBS tamponuyla (pH 7.4) sistemin dengeye gelmesi sağlanmıştır.
- Dengeye gelen sisteme 100 sn boyunca süspansiyon numune SPR sisteminden geçirilmiştir.
- Sonrasında 2.5 mM Glisin:HCl çözeltisi (pH 2.5) oranındaki desorpsiyon çözeltisi 40-45 sn SPR sisteminden geçirilmiştir.
- 5 defa işlem baştan sona tekrar uygulanmıştır.

3.3.8 Nanofilm Temelli SPR Biyosensörlerin Baskılama Seçiciliğinin İncelenmesi

Pseudomonas spp. MIP ve NIP SPR biyosensörün baskılama seçicilik değerinin belirlenebilmesi için, *Pseudomonas* spp. konsantrasyon (1.0×10^4 kob/mL) değeri ile aynı oranda *Staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi* and *Escherichia coli* bakteri

konsantrasyonu hazırlanılarak sistemden geçirilmiştir. Elde edilen sensorgram verileri değerlendirilerek, seçicilik katsayıları hesaplanmıştır.

3.3.9 Nanofilm Temelli SPR Biyosensörün Gerçek Örnek Analizi

Hazırlanılan *Pseudomonas* spp. baskılanmış polimer temelli SPR biyosensörünün, güncel olarak kabul gören kültürel tayin yöntemine göre alternatif olarak kullanılabilirliğinin ve kültürel yöntemde gözlemlenen dezavantajlara karşın kolaylıklarının değerlendirilebilmesi yapılması amacıyla kültürel yöntem ve hazırlanılan MIP temelli biyosensörde *Pseudomonas* spp. analizleri yapılmıştır. *Pseudomonas* spp. analizinin kültürel metot çalışmaları Ankara Gıda Kontrol Laboratuvarı tarafından gerçekleştirilmiştir.

Yapılan validasyon çalışmasında piliç bonfile ürününün 2., 5., 8., 10., 12., ve 15. günlerinde eş zamanlı olarak *Pseudomonas* spp. analizleri kültürel metot ve hazırlanılan MIP temelli biyosensörde yapılmıştır.

ISO 13720 standardına göre gerçekleştirilen kültürel yöntemde, numuneden 10 g homojen alınarak 9 katı (90 mL) Buffer pepton water eklenerek homojen hale getirilmiştir. Son durumda numuneden analiz için ondalık seyreltim hazırlanılmıştır. Hazırlanılan süspansiyondan *Pseudomonas* spp. Selective Agara bakteri yoğunluğuna göre seyreltim miktarı belirlenerek ekim işlemi tamamlanmıştır. İnoküle edilen besyeri 25°C’de 2 gün boyunca inkübe edilerek inkübasyon süresinin sonunda oluşan koloni sayısı sayılmıştır. Oksidaz testi ile koloni morfolojisi doğrulan koloniler genel hesaplama formülü kullanılarak gram başına düşen koloni oluşturan birim hesaplanmıştır.

Hazırlanılan MIP nanofilm temelli SPR biyosensörde gerçekleştirilen analizde, piliç bonfile ürününden 10 g homojen alınarak 9 katı (90 mL) pepton tamponu eklenerek homojen hale getirilmiştir. Sonra numuneden analiz için ondalık seyreltim hazırlanılmıştır. Hazırlanılan süspansiyon sistemden geçirilerek, sensorgram grafiği elde edilmiştir. Bu işlem belirlenen her raf ömrü gününde tekrarlanmıştır. Numune validasyon çalışması tamamlana kadar (15 gün) +4°C’de muhafaza edilmiştir. Belirlenen günlerde SPR sisteminde yapılan işlem sonucunda

elde edilen sensogram grafiğinden elde edilen denkleme göre numunenin gram başına düşen koloni oluşturan birim hesaplanmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 Fonksiyonel Monomerinin Karakterizasyonu

Hazırlanılan fonksiyonel monomere ait karakterizasyon analizi FTIR Spektrumu ile yapılmıştır. Ölçümler; amid I bantlarına 1600-1700 cm^{-1} aralığında, amid II bantlarına 1480-1580 cm^{-1} aralığında, karbonil bantlarına 1735-1765 cm^{-1} aralığında ve hidroksil bantlarına 3250-3550 cm^{-1} aralığında eşdeğerdir. Hazırlanılan fonksiyonel monomerin ölçüm sonuçlarına göre, amid I bantlarına 1655 cm^{-1} dalga boyunda, amid II bantlarına 1520 cm^{-1} dalga boyunda, ester bantlarına 1735 cm^{-1} dalga boyunda, hidroksil bantlarına 3347 cm^{-1} dalga boyunda tespit edilmiştir.

Fonksiyonel monomerin kimyasal yapısının kontrol edilmesinde, NMR spektrometresinde incelenmiştir. $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1.99 (t; 3H, $J=7.08$ Hz, CH_3), 1.42 (m; 2H, CH_2), 3.56 (t; 3H, $-\text{OCH}_3$), 4.82-4.87 (m; 1H, methin), 5.26 (s; 1H, vinil H), 5.58 (s; 1H, vinil), 6.86 (δ ; 1H, $J=7.4$ Hz, NH), 7.82 (δ ; 1H, $J=8.4$ Hz, NH), 6.86-7.52 (m; 5H, aromatik) verileri tespit edilmiştir. Karakterizasyon ölçümleri sonucunda bulunan verilerin fonksiyonel gruplarına uygun olduğu ve sentezleme işleminin başarılı olduğu belirlenmiştir. [107-116].

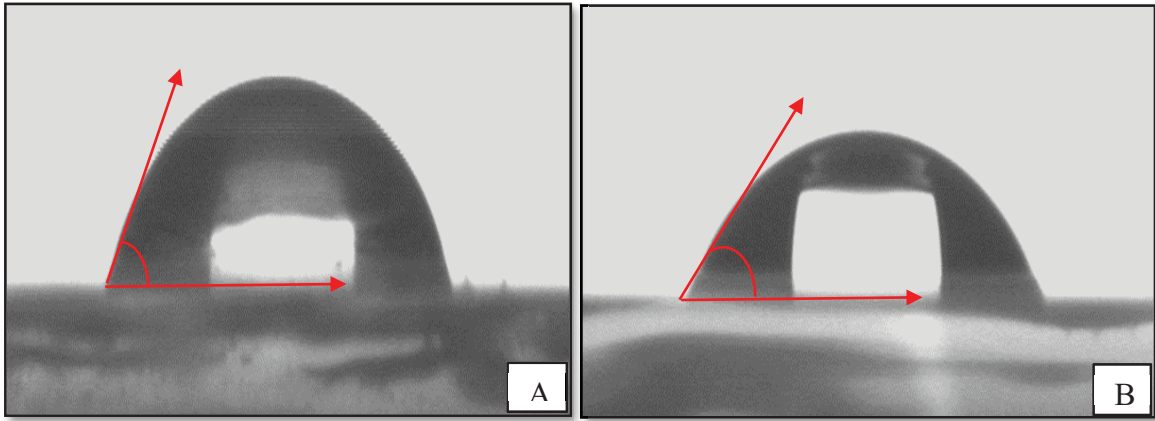
4.2 Nanofilm Temelli SPR Biyosensörlerin Karakterizasyonu

MIP ve NIP SPR biyosensörün karakterizasyonu için, FTIR-ATR, temas açısı ölçümleri ve elipsometre cihazları ile ölçüm yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda;

Temas açısı ölçümleri; yüzey üzerine damlatılan çözeltinin (Su, tampon, ...) damla yapısının zamana bağlı değişimini değerlendirmek amacıyla kullanılmaktadır. Tasarlanılan SPR biyosensörün çip yüzeyine damlatılan su damlasının SPR çip yüzey üzerindeki gerilimi, temas açısı yüzeyin sıvı tutma özelliği hakkında temas açısı ölçümleri bilgi edinebilmektedir. Şekil 4.1'de baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) yüzeylerdeki yüzey temas açıları gösterilmiştir. Ölçüm sonucunda edilen değerler MIP ve NIP nanofilm temelli SPR çipler için sırasıyla; 68.7° ve 79.5° olarak bulunmuştur. SPR yüzeyinde yapılan modifikasyon işlemi nedeniyle temas açısında düşme gözlemlenmiştir. Temas açısının düşmesi yüzeyin hidrofilik

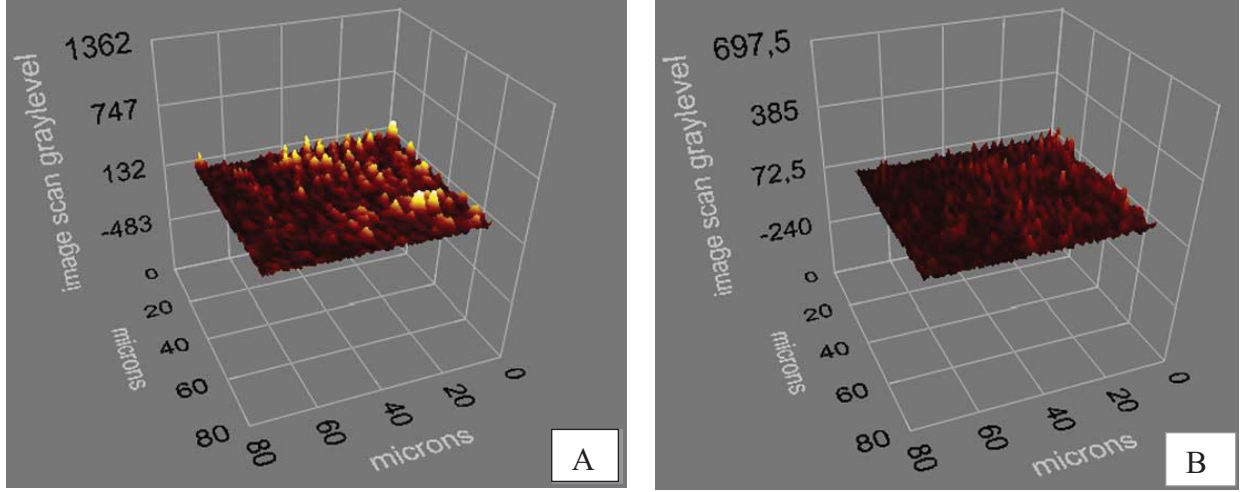
özelliğinin arttığını göstermektedir. MIP ve NIP nanofilm temelli SPR biyosensöründe kullanılan fonksiyonel monomerin histidin olması nedeniyle yüksek hidrofilik özelliğe sahiptir.

Buna bağlı olarak, hidrofilik yapıda bir malzemenin SPR yüzeyine bağlanması yüzey hidrofilikliğini artırmış ve temas açısı değerini düşmesine neden olmuştur.



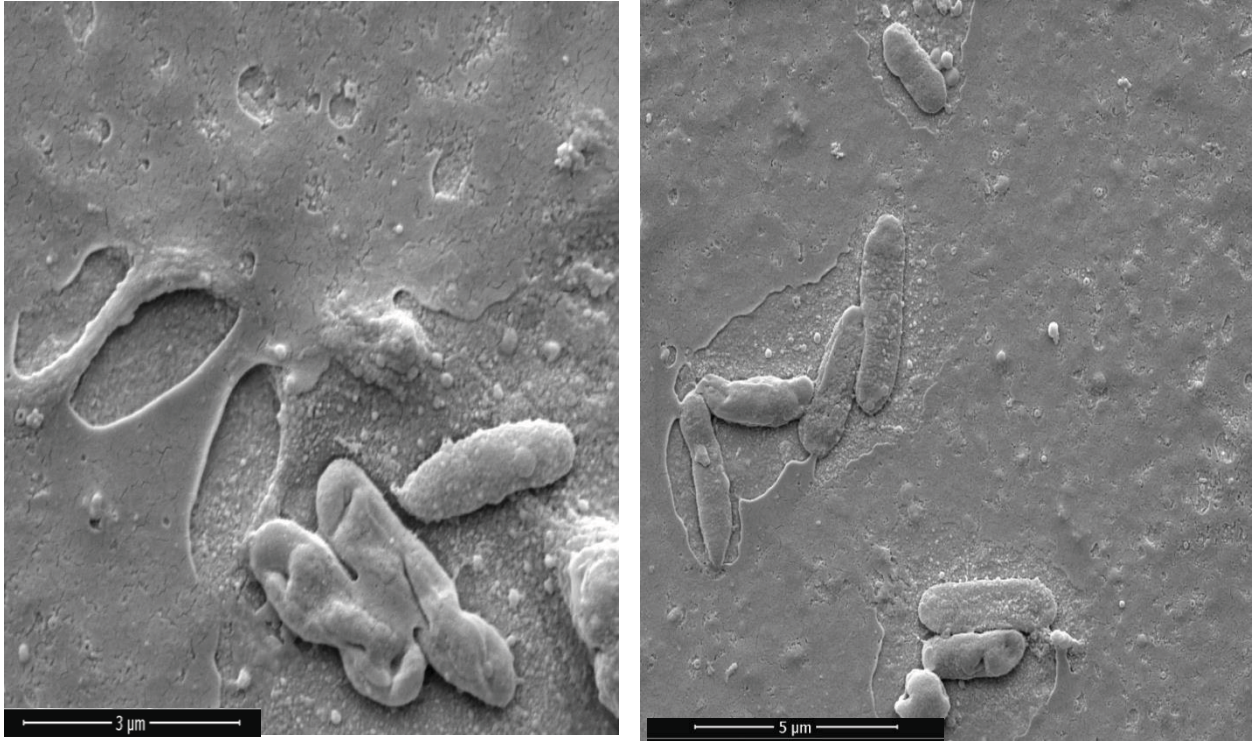
Şekil 4.1. NIP: (A), MIP: (B) nanofilm temelli SPR biyosensörlerin temas açısı ölçümleri.

Elipsometrik ölçümler; herhangi yapıdan ışığın ölçümü sonucunda yapının pürüzlülüğü, kalınlığı, derinliğini, kristalitesini, dielektrik iletkenliğini ve diğer malzeme özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Elipsometrik ölçümlerde elde edilen veriler, ölçümü yapılan malzemenin kalınlığına bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Yüzey kalınlığı SPR biyosensörlerde etkin analiz işlemi için oldukça önemlidir. Yapılan literatür çalışmalarında SPR biyosensörler için maksimum 200 nm kalınlığa kadar etkin ölçüm yapılabildiği belirlenmiştir. Şekil 4.2’de MIP ve NIP nanofilm temelli SPR biyosensör yüzeyine ait elipsometrik ölçüm görselleri tanımlanmıştır. Elipsometrik ölçüm sonuçlarına göre MIP ve NIP nanofilm temelli SPR biyosensör yüzeyinin kalınlığı sırasıyla; 150.4 ± 1.5 nm and 72.4 ± 1.2 nm olarak tespit edilmiştir. Bu durum, baskılanmış ve baskılanmamış nanofilm yapı yüzeyinin homojen ve sistemde etkin plazmon ölçümlerinin yapılmasına uygun olarak tasarlandığını göstermektedir.



Şekil 4.2. MIP: (A), NIP: (B) nanofilm temelli SPR biyosensörlerin elipsometre görüntüleri.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ölçümleri; Herhangi bir yüzeye elektron demeti gönderilerek yüzeyin 3 boyutlu olarak görüntülenmesi amacıyla kullanılmaktadır. SEM ile yapılan ölçümlerde yüzey üzerindeki oluşturulan yüzey şekilleri hakkında detaylı bilgi edinilebilmektedir. Moleküler baskılama işleminin etkin şekilde gerçekleştirilip gerçekleştirilemediği SEM ölçümleri ile belirlenmektedir. Şekil 4.3’de MIP nanofilm temelli SPR biyosensör yüzeyine ait SEM görüntüleri mevcuttur. Görüntüleme sonucunda mavi renk ile işaretlen alanlarda *Pseudomonas* spp. bakterisinin sensör yüzeyine etkin şekilde baskılandığı belirlenmiştir.



Şekil 4.3. MIP nanofilm temelli SPR biyosensörlerin SEM görüntüleri.

4.3 Nanofilm Temelli SPR Biyosensörler ile Kinetik Analizler

SPR temelli MIP ve NIP nanofilm biyosensörler çalışma prensibi gereği, sensör yüzeyinde oluşan moleküler etkileşimlerine bağlı olarak kırılma indisindeki değişimleri ölçerek, nicel etkileşimleri nitel verilere dönüştürebilmektedir. SPR biyosensörlerin doğrudan ve gerçek zamanlı ölçüm yapabilmesinin yüksek kalite olabilmesini sağlaması, analit ve ligand arasındaki etkileşiminin karakterizasyonu, ve bu etkileşimin kantitatif olarak kinetik, termodinamik ve konsantrasyon parametrelerinin belirlenmesiyle sağlamaktadır.

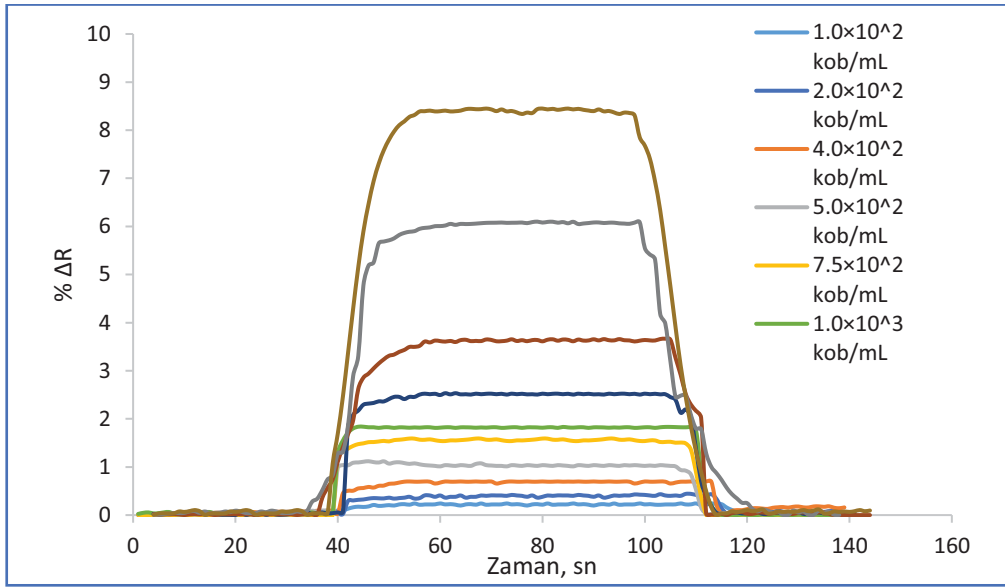
Karakterizasyon işlemleri tamamlanan nanofilm temelli SPR biyosensörün kinetik parametrelerinin belirlenebilmesi için *Pseudomonas* spp. bakterisinden $1.0 \times 10^2 - 1.0 \times 10^4$ kob/mL konsantrasyon aralığında farklı süspansiyon solüsyonları hazırlanılarak SPR sisteminden geçirilmiştir.

Yapılan çalışma sonucunda; Şekil 4.4’de sensorgram grafiğinde belirtilen bakterinin sistemden geçişi esnasındaki % kırılmanın ΔR zamana bağlı değişimi verilmiştir. *Pseudomonas* spp.

bakterisinin konsatrasyonundaki artış oranına bağlı olarak, SPR kırılma indisinde de artış olmuştur. Bu durum, analit ile ligandın etkileşiminin yüksek afinite ve seçicilikle gerçekleştiğini göstermektedir.

Şekil 4.4'deki sensorgram grafiğine göre doğrunun denklemi $y=0.13x+1.21$ ve doğrusallığı $R^2=0.99$ olarak bulunmuştur. Doğrunun denklemi ($y=ax+b$) ve doğrusallık verileri analizin tayin limitini ve doğruluğunu belirlemektedir.

Elde edilen doğrunun denklemi nanofilm temelli SPR biyosensörün 1.0×10^2 - 1.0×10^4 kob/mL aralığında doğruluğu %99 ve tayin limiti 0.5×10^2 kob/mL olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.4. Farklı derişimlerdeki *Pseudomonas* spp. çözeltileri ve MIP nanofilm temelli SPR biyosensör arasındaki etkileşimlerin zamana göre kırılma değerleri.

Analit-ligand arasındaki gerçek zamanlı etkileşimlerin değerlendirilmesi kinetik analizi ve adsorpsiyon kinetik analize dayanmaktadır. Kinetik analizler için 4.1'deki denklem kullanılarak, SPR sinyalinin zamana bağlı değişim oranı hesaplanmaktadır.

$$d\Delta R / dt = k_a C(\Delta R_{maks} - \Delta R) - k_d \Delta R \quad (4.1)$$

Adsorpsiyon kinetik analizleri moleküler baskılanmış SPR biyosensörün, yüzey homojenliğini tanımlamak için kullanılmaktadır. Adsorpsiyon kapasitesini belirlemek için 3 farklı model kullanılmaktadır.

1- Freundlich Modeli;

Freundlich modeli, yüzey heterojenite değerini belirlemek için kullanılmaktadır. Tutunmanın, birden fazla adsorpsiyon tabakası oluşturarak gerçekleştiğini varsayar.

$$\Delta R = \Delta R_{maks} C^{1/n} \quad (4.2)$$

Denklemleri kullanılarak hesaplanan modelde, heterojenlik indeksi ($1/n$), 0-1 değeri arasında değişmektedir. Heterojenlik indeksi 1 değerine yaklaştıkça, homojenite artmaktadır. 1 değerinde sistem homojen olduğu söylenebilmektedir.

2- Langmuir Modeli;

Langmuir modeli, yüzey homojenite değerini belirlemek için kullanılmaktadır. Moleküllerin, her birinin yalnızca bir molekülü tutabilen sabit sayıda iyi tanımlanmış yüzeye tutunduğunu varsayar.

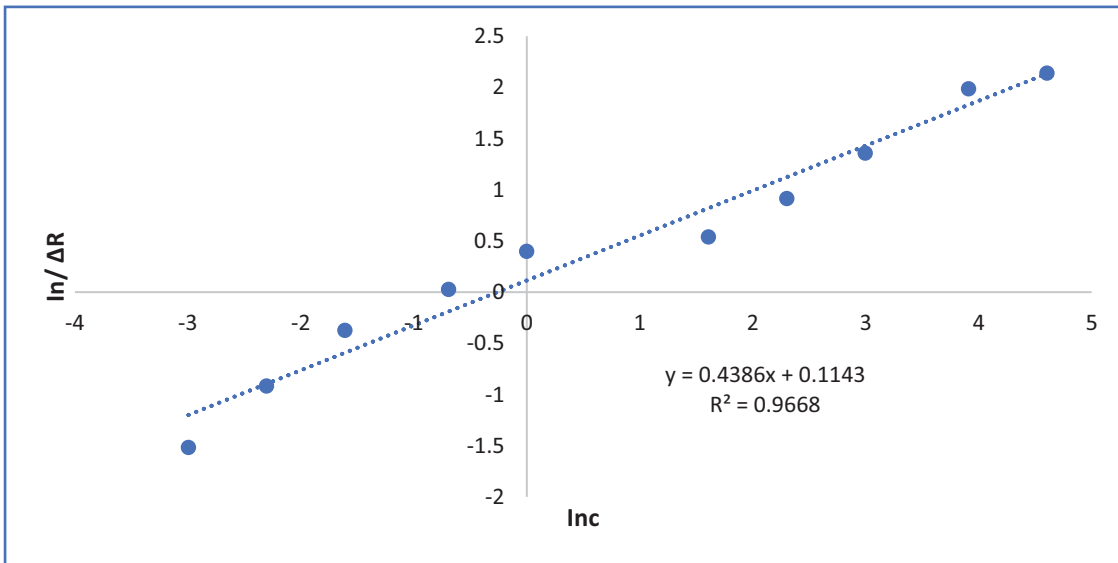
$$\Delta R = \{ \Delta R_{maks} C / K_d + C \} \quad (4.3)$$

3- Langmuir-Freundlich Modeli;

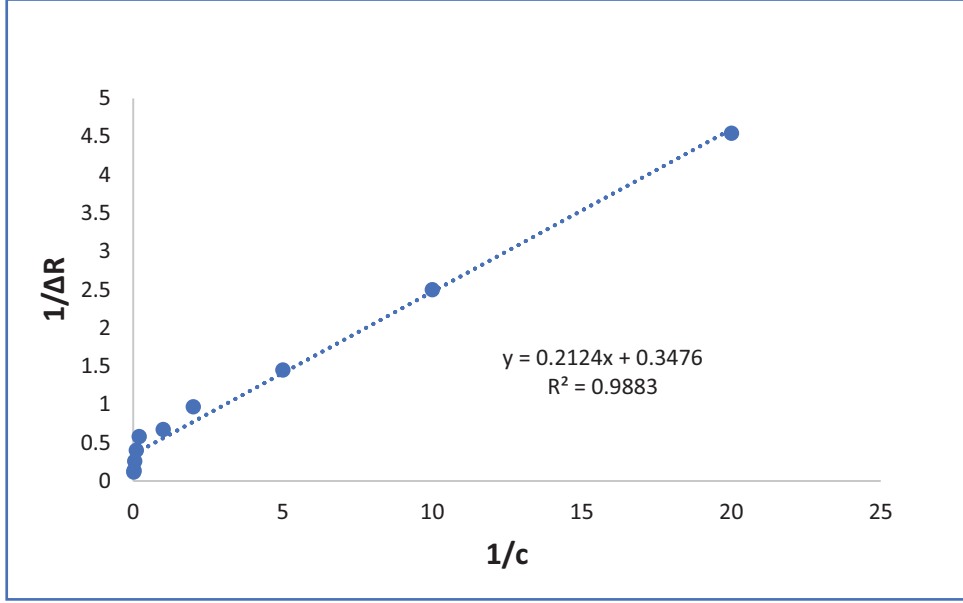
Langmuir-Freundlich modeli, Langmuir ve Freundlich modellerininde uygun olduğu sistemlerde uygulanabilmektedir. Bu model hem heterojen hem de homojen yüzeylerdeki etkileşimleri açıklamak için kullanılmaktadır.

$$\Delta R = \left\{ \frac{\Delta R_{\max} C^{1/n}}{K_d + C^{1/n}} \right\} \quad (4.4)$$

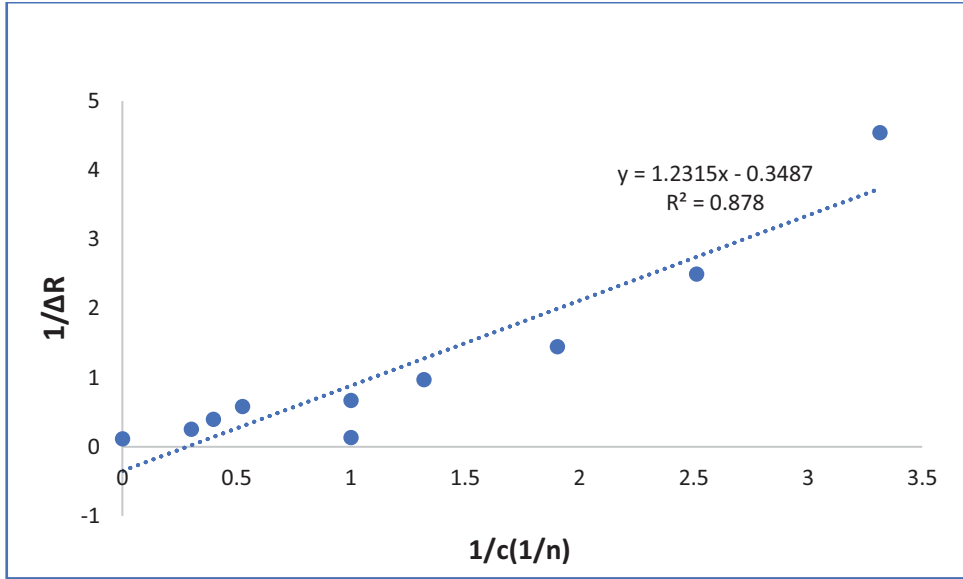
Bu modelde geniş derişim aralıklarında SPR biyosensörü ile *Pseudomonas* spp. bakterisi arasındaki denge ve bağlanma kinetik ölçümleri gösterilmiştir. SPR biyosensörü ile *Pseudomonas* spp. bakterisi arasındaki etkileşimi belirlemek için Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich adsorpsiyon izoterm modelleri ile hesaplama yapılmıştır. Elde edilen veriler sonucunda bağlanma sabitinin (K_a) bağlanma kinetik analizinde ve adsorpsiyon izoterm modellerinde benzer olduğu görülmüştür. Maksimum kırılma değerinin ($\Delta R=7.4$) kinetik analizler sonucu elde edilen maksimum kırılma değerlerine ($\Delta R_{\max}=9.04$) yakın değerde olması deney sonucunun literatür verilerine uyduğunu görülmüştür. Şekil 4.5 , Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’ da verilen izoterm modellerine göre korelasyon katsayıları (R^2) Freundlich; 0.98 , Langmuir; 0.93 Langmuir-Freundlich; 0.87’dir (Çizelge 4.1). Langmuir tipi izoterm modeli için korelasyon katsayısının diğer modellerden daha yüksek olduğu görülmektedir. Langmuir modeline göre $K_a=8.33$ (kob/mL)⁻¹ ve $K_d=0.11$ kob/mL olduğu bulunmuştur. Bu sonuç, analitin sisteme tek tabakalı/homojen olarak bağlandığını göstermektedir ve bağlanmanın doğrusallığı $R^2=0.98$ olarak bulunmuştur. Özet olarak, elde edilen verilerle bu afinite sisteminin ekstra etkileşimin kabul edilmemesine ve Langmuir adsorpsiyon modeline daha uygun olduğunu söyleyebiliriz, bu da işlevsel monomerlerin, MAH, polimerik zincir boyunca homojen olarak dağıldığı anlamına gelmektedir. Ayrıca, neredeyse enerjisel olarak eşittirler ve adsorpsiyon işlemi sırasında hiçbir yanıl etkileşim meydana gelmemiştir [117].



Şekil 4.5. Nanofilim temelli SPR biyosensörü için adsorpsiyon Freundlich izoterm modeli.



Şekil 4.6. Nanofilm temelli SPR biyosensörü için adsorpsiyon Langmuir izoterm modeli.



Şekil 4.7. Nanofilm temelli SPR biyosensörü için adsorpsiyon Langmuir- Freundlich izoterm modeli.

Sonuç olarak; *Pseudomonas* spp. baskılanmış nanofilm temelli SPR biyosensörünün yüzeyindeki etkileşimler; tek tabakalı, homojen dağılımlı, minimum yanıl etkileşimli ve eş enerjili olduğu görülmüştür. Yapılan çalışma sonucunda tayin limiti 0.5×10^2 kob/mL olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.1. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich adsorpsiyon izoterm modelleri nin hesaplaması.

Langmuir İzotermi		Freundlich İzotermi		Langmuir-Freundlich İzotermi	
ΔR_{maks}	7.4	ΔR_{maks}	3.67	ΔR_{maks}	2,9
$K_a (kob.mL^{-1})^{-1}$	8.33	1/n	0.58	$K_a (kob.mL^{-1})^{-1}$	3,6
$K_d kob.mL^{-1}$	0.11	R^2	0.93	$K_d kob.mL^{-1}$	0,27
R^2	0.98			R^2	0.87

4.4 Nanofilm Temelli SPR Biyosensörlerinin Seçiciliğinin İncelenmesi

Moleküler baskılanmış polimer temelli SPR biyosensörlerin en önemli özelliği herhangi işaretleme basamağına ihtiyaç duymadan doğrudan istenilen molekülün tespit edilmesidir. Bu nedenle hazırlanan moleküler baskılamanın kalitesi sensör seçiciliği ile doğru orantılıdır.

Hazırlanan moleküler baskılanmış sensörlerin seçiciliği , seçicilik katsayısı ve baskılama seçicilik katsayılarına göre hesaplanmaktadır.

$$\text{Seçicilik katsayısı, } k = \Delta R_{kalıp} / \Delta R_{girişimci} \quad (4.4)$$

$$\text{Baskılama seçicilik katsayısı, } k' = MIP / NIP \quad (4.5)$$

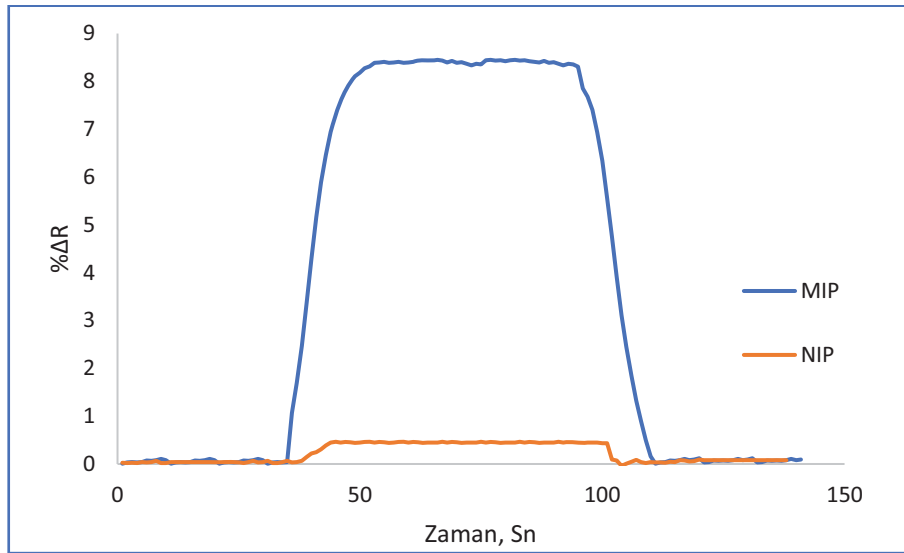
Yapılan çalışmada, nanofilm temelli SPR sensörün seçicilik etkinliğinin belirlenebilmesi için, MIP ve NIP temelli SPR biyosensör kullanılmıştır. Hedef bakteri *Pseudomonas* spp. 'den farklı olarak seçicilik kontrolü için *Staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi* and *Escherichia coli* bakterilerinde kullanılmıştır. 4 farklı türe ait 1×10^4 kob/mL konsantrasyonda hazırlanan süspansiyonlar SPR sisteminden geçirilmiştir (Çizelde 4.2).

Çizelge 4.2. MIP SPR biyosensörlerinin *Staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi* and *Escherichia coli* bakterileri için seçicilik (k) ve bağıl seçicilik (k') katsayıları.

Bakteri Tipi	Bakterin Morfolojik Özellikleri	MIP SPR Biyosensör		NIP SPR Biyosensör		k'
		ΔR	K	ΔR	K	
<i>Pseudomonas spp</i>	-Gram Negatif. - 0.5 ila 0.8, μm ve 1.5 ila 3.0 μm ebatlarında. - çubuk (basil) şekilli geniş, pürüzsüz, düz kenarlı. - tek veya çoklu flagellaya sahip. (Hareketli)	8.3	-	0.25	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	- Gram Pozitif. - 0.5 x 2.0 μm ebatlarında. - Yuvarlak (kok), genellikle düzenli yapıdadır. - Tek başına veya zincir yapıdadırlar. - Hareketsizdir.	0.31	26.7	0.21	1.19	22.5
<i>Salmonella paratyphi</i>	- Gram Negatif. - 2.0 x 5.0 μm 0.7 x 5.0 μm ebatlarında. - Çubuk (basil) yapıdadır. - Peritrih kiprikli yapıya sahip. (Hareketli)	0.97	8.55	0.21	1.19	7.18
<i>Escherichia coli</i>	- Gram Negatif. - 1.1 ila 1.5 μm ve 2.0 ila 6.0 μm ebatlarında. - Çubuk (basil) yapıdadır. - Peritrih kiprikli yapıya sahip. (Hareketli)	1.07	7.75	0.16	1.56	4.96

Sonuç olarak; elde edilen sensorgram verilene göre 2 aşamada seçilicilik etkinliği değerlendirilmiştir.

1. aşamda; Şekil 4.8'deki sensorgram verileri ve Çizelge 4.2'de verilen sayısal değerlere göre *Pseudomonas spp.* bakterisi için hazırlanılan MIP ve NIP nanofilm temelli SPR biyosensörlerin *Pseudomonas spp.* bakterisine gösterdiği seçicilik verilerine göre, MIP temelli biyosensörde % ΔR değeri 8.3 olarak saptanırken NIP nanofilm temelli biyosensörde % ΔR değeri 0.25'dir. Bu verilere göre MIP nanofilm temelli biyosensörün NIP nanofilm temelli biyosensörün seçiciği yaklaşık 8 kat daha fazladır.



Şekil 4.8. MIP ve NIP nanofilm temelli SPR biyosensörlerinin 1×10^4 kob/mL derişiminde, zamana karşı verdiği kırılma değeri (%).

2. aşamda; Şekil 4.9'deki sensorgram verileri ve Çizelge 4.2'de verilen sayısal değerlere göre *Pseudomonas spp.* bakterisi için hazırlanılan MIP ve NIP temelli SPR biyosensörlerin *Staphylococcus*, *Salmonella paratyphi* ve *Escherichia coli* bakterilerindeki seçicilik koşulları değerlendirilmiştir. Sonuçlardaki bu farklılıklar, bakteri morfolojilerinin farklı yapısal ve fiziko kimyasal özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Elde edilen verilere göre farklı bakterilerin MIP ve NIP temelli biyosensörde % ΔR değerleri *Pseudomonas spp.* bakterisi için; MIP: 8.3 NIP: 0.25, *Staphylococcus aureus* bakterisi için; MIP: 0.31 NIP: 0.21, *Salmonella* bakterisi için; MIP: 0.97 NIP: 0.21, *Escherichia coli* bakterisi için; MIP: 1.07 NIP: 0.16'dır.

Seçicilik katsayısı (k) verilere göre;

MIP temelli SPR biyosensörünün *Pseudomonas* spp bakterisine seçiciliği

- *Staphylococcus aureus* bakterisine göre yaklaşık 27 kat (k= 26.7)
- *Salmonella paratyphi* bakterisine göre yaklaşık 9 kat (k=8.55)
- *Escherichia coli* bakterilerine göre yaklaşık 8 kat (k=7.75) daha fazladır.

Bağıl seçicilik katsayısı (k') verilere göre;

- *Staphylococcus aureus* bakterisi için k'= 22.5
- *Salmonella paratyphi* bakterisi için k'= 7.18
- *Escherichia coli* bakterisi için k'= 4.96'dır.

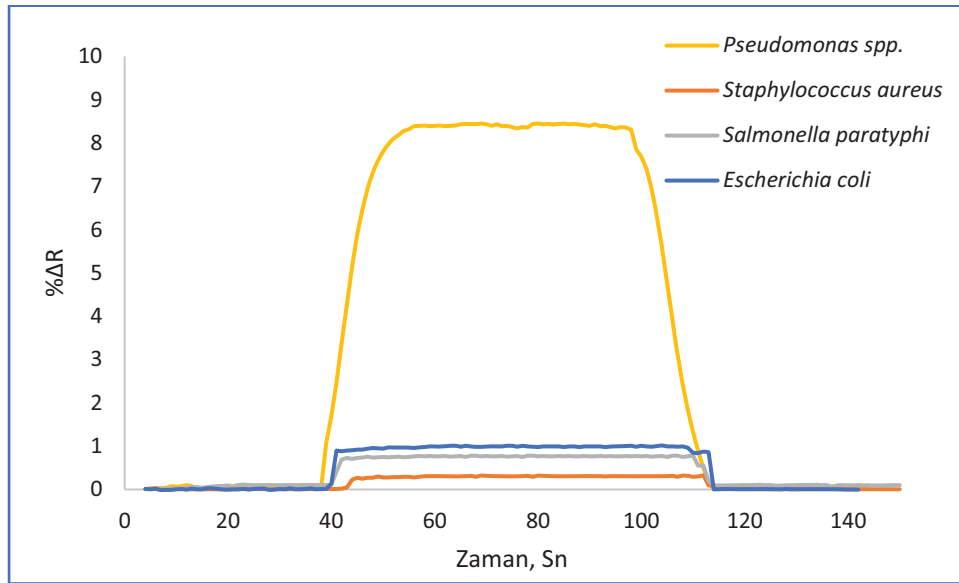
Hazırlanılan MIP nanofilm temelli SPR biyosensöründe *Pseudomonas* spp. bakterisinin *Staphylococcus aureus* bakterisine göre yaklaşık 27 kat daha seçici olduğu belirlenmiştir, bu durum *Staphylococcus aureus* bakterisinin , gram pozitif , yuvarlak şekilli ve herhangi kamçılı yapıya sahip olmaması yani morfolojik yapı olarak birbirlerinden tamamen farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

MIP nanofilm temelli SPR biyosensöründe *Pseudomonas* spp. bakterisinin *Salmonella paratyphi* bakterisine göre yaklaşık 9 kat daha seçici olduğu belirlenmiştir, bu durum *Salmonella paratyphi* bakterisinin gram negatif , çubuk şekilli ve ebat özelliklerinin birbirine benzer morfolojik yapıya sahip olması nedeniyle seçiciliğin *Staphylococcus aureus* bakterisine göre daha az fakat *Pseudomonas* spp. bakterisinin *Salmonella paratyphi* bakterisinden farklı kamçı yapıya ve polimerdeki yüksek seçiciliğe sahip kavitelere sahip olmasının nedeniyle ($\Delta R:0.97$) daha seçici sinyal verdiği gözlemlenmiştir.

Son olarak MIP nanofilm temelli SPR biyosensöründe *Pseudomonas* spp. bakterisinin *Escherichia coli* bakterisine göre yaklaşık 8 kat daha seçici olduğu belirlenmiştir, bu durum *Escherichia coli* bakterisinin gram negatif , çubuk şekilli ve ebat özelliklerinin birbirine benzer morfolojik yapıya sahip olması nedeniyle seçiciliğin *Staphylococcus aureus* bakterisine göre

daha az fakat *Pseudomonas* spp. bakterisinin *Escherichia coli* bakterisinden farklı kamçı yapıya ve polimerdeki yüksek seçiciliğe sahip kavitelere sahip olmasının nedeniyle ($\Delta R:1.07$) daha seçici sinyal verdiği gözlemlenmiştir.

Baskılamadaki seçicilik etkinliğini gösteren k' değerine göre, sonuç 1 değerinin ne kadar üzerindeyse baskılama işleminin başarısı o oranda yüksektir. Buna göre *Pseudomonas* spp bakterisi *Staphylococcus aureus* bakterisi için $k'=22.5$, *Salmonella paratyphi* bakterisi için $k'=7.18$ ve *Escherichia coli* bakterisi için $k'=4.96$ 'dır. Bu sonuçlara göre hazırlanan nanofilm temelli SPR biyosensörünün *Pseudomonas* spp bakterisi için seçiciliği oldukça yüksektir.



Şekil 4.9. MIP SPR biyosensörlerinin *Pseudomonas* spp. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi* ve *Escherichia coli* bakterilerinin 1×10^4 kob/mL derişiminde, zamana karşı verdiği kırılma değeri (%).

Sonuç olarak; Nanofilm temelli SPR biyosensörün, *Pseudomonas* spp. bakterisine karşı verdiği tepkinin baskılanmamış biyosensöre, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi* ve *Escherichia coli* bakterilerine verdiği tepkiye göre sırasıyla 27, 9 ve 8 kat daha fazla olması hazırlanan polimerin gerçekten yüksek özgül kaliteye sahip olduğunu göstermektedir.

4.5 Nanofilm Temelli SPR Biyosensörün Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

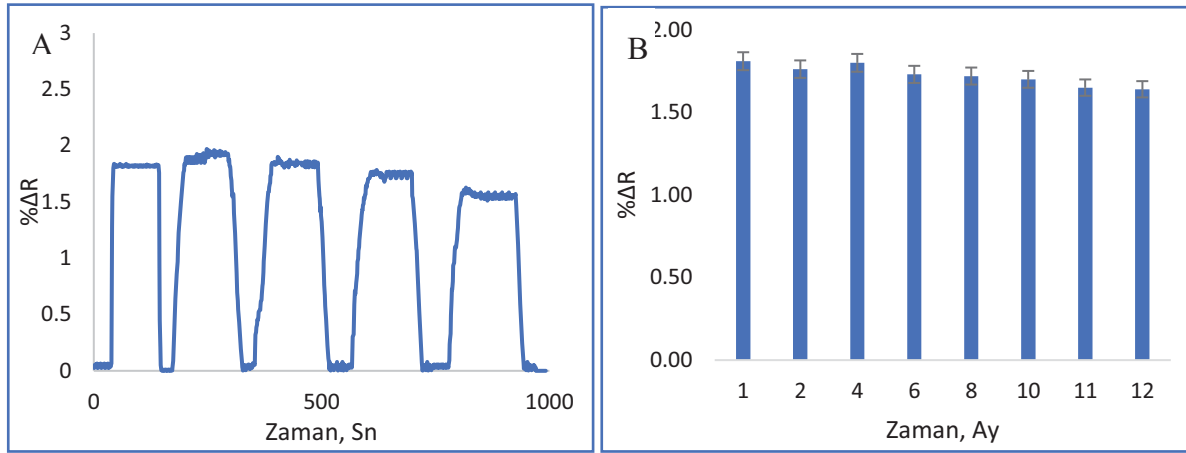
SPR biyosensörlerin, tanı/tespit alanlarında öncelikli olarak tercih edilmesini sağlayan, herhangi işaretleme basamağına ihtiyaç duymadan doğrudan ve gerçek zamanlı ölçüm yapabilme özelliklerinin yanı sıra, ön işlem gerektirmeden tekrar tekrar kullanıma uygun olması SPR biyosensörleri diğer tanı/tespit yöntemlerinden daha avantajlı kılmaktadır.

Polimer baskılı hazırlanılan biyosensörlerin olumsuz çevre koşullarına daha dayanıklı olması, beraberinde biyosensörün raf ömrü süresini de uzatmaktadır. Polimerik yapıya bağlı olarak kullanım süresi uzayan SPR biyosensörlerin, ölçüm kalitesi tekrar kullanılabilme yeterliliğine bağlı olarak değerlendirilmektedir.

Yapılan çalışmada; biyosensörün adsorpsiyon-desorpsiyon-rejenerasyon basamaklarındaki döngülerinin yeniden kullanıma uygunluğunun belirlenebilmesi için *Pseudomonas* spp. baskılanmış nanofilm temelli SPR sensörünün tekrarlanabilirliğini gözlemlemek amacıyla 1.0×10^3 kob/mL konsantrasyonundaki süspansiyon SPR sisteminden arka arkaya 5 defa tekrarlanmıştır.

Sonuç olarak; Şekil 4.10A'te gösterilen verilere göre ölçüm verilerinde herhangi sapma gözlemlenmemiş ve hazırlanılan sensörün tekrarlı kullanıma uygun olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca, geliştirilen sensörün 4°C'deki muhafaza koşulları ile 12 aylık çalışma süresi esnasında farklı aralıklarla çalışmalar tekrarlanmıştır (1.0×10^3 kob/mL konsantrasyonundaki süspansiyon). Bu koşullar dikkate alındığında sensörün depolama süresi stabiliteside teyit edilmiştir ve uygun muhafaza koşullarında en az 1 yıl süre kullanıma uygun olduğu gözlemlenmiştir (Şekil4.10B).



Şekil 4.10. A. MIP nanofilm temelli SPR biyosensörlerinin tekrarlanabilirliği, B. Farklı Aylarda MIP nanofilm temelli SPR biyosensörlerinin tekrarlanabilirliği.

4.6 Nanofilm Temelli SPR Biyosensörün Gerçek Örnek Analizleri

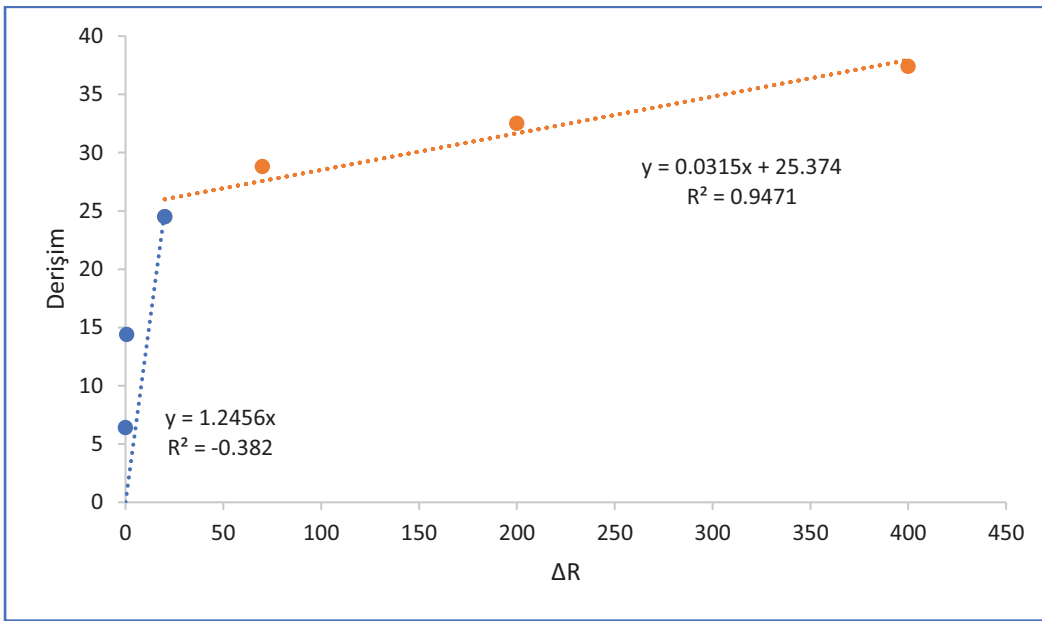
Hazırlanılan *Pseudomonas* spp. baskılanmış polimer temelli SPR biyosensörünün, güncel olarak kabul gören kültürel tayin yöntemine alternatif olarak kullanılabilirliğinin ve kültürel yöntemde gözlemlenen dezavantajlara karşın kolaylıklarının değerlendirilebilmesi amacıyla kültürel yöntem ve hazırlanılan mıp temelli biyosensörde eş zamanlı *Pseudomonas* spp. validasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. *Pseudomonas* spp. analizinin kültürel metot çalışmaları Ankara Gıda Kontrol Laboratuvarı tarafından yapılmıştır. Çalışmada piliç bonfile ürünü kullanılmıştır. Ürünün 2., 5., 8., 10., 12., ve 15. günlerinde *Pseudomonas* spp. analizleri kültürel metot ve hazırlanılan mıp temelli SPR biyosensörde gerçekleştirilmiştir ve çalışma toplamda 17 günde tamamlanmıştır.

Yapılan Çalışma Sonucunda;

Kültürel metot ile gerçekleştirilen analiz sonucunda piliç bonfile ürününde 2. gününde 1.0×10^2 kob/g, 5. gününde 6.4×10^5 kob/g, 8. gününde 1.2×10^8 kob/g, 10. gününde 6.9×10^8 kob/g kob/g, 12. gününde 1.2×10^9 kob/g, 15. gününde 5.0×10^9 kob/g *Pseudomonas* spp. tespit edilmiştir.

Pseudomonas spp. baskılanmış nanofilm temelli SPR biyosensör ile yapılan çalışmada, piliç bonfile ürününden 10 g homojen alınarak 9 katı (90 mL) Buffer pepton water eklenerek

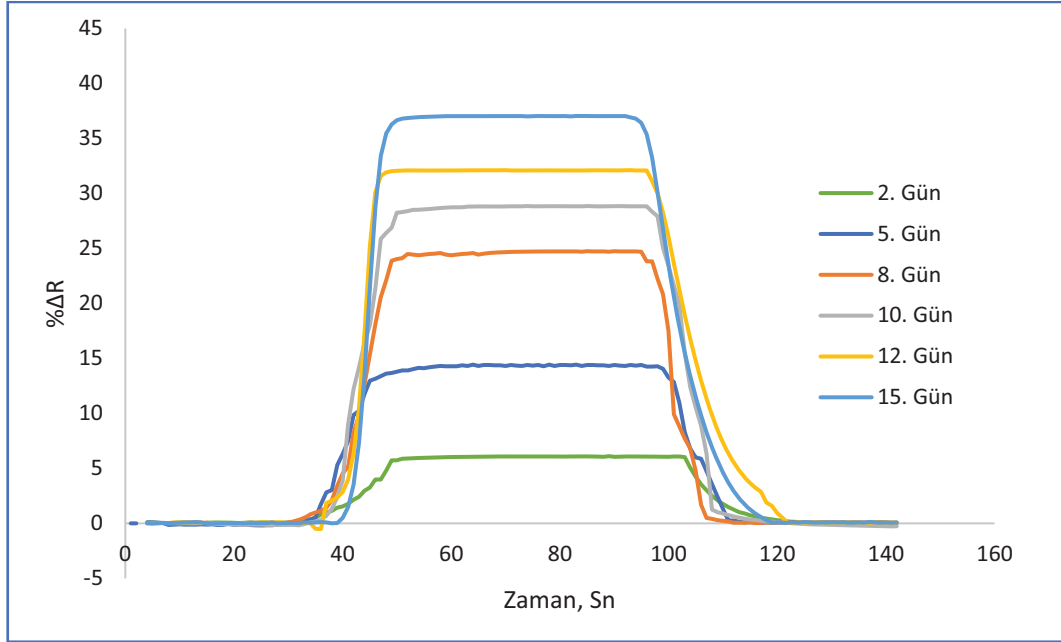
homojen hale getirilmiştir. Son durumda numuneden analiz için ondalık seyreltim hazırlanan süspansiyon, 2., 5., 8., 10., 12., ve 15. günlerinde SPR sisteminden geçirilmiştir. Şekil 4.11'deki sensorgram grafiğinde, analiz için belirlenen raf ömrü günlerindeki, ondalık seyreltimi hazırlanan piliç bonfile süspansiyonunun sistemden geçişi esnasındaki % kırılmanın ΔR zamana bağlı değişimi verilmiştir. *Pseudomonas* spp. bakterisinin konsatrasyonundaki artış oranına bağlı olarak, SPR kırılma indisinde de artış olmuştur. Sensorgram grafiğine göre doğrunun denklemi $y = 0.0315x + 25.374$ ve doğrusallığı $R^2 = 0.95$ olarak bulunmuştur. Doğrunun denklemi ($y=ax+b$) ve doğrusallık verileri analiz miktarı belirlenmiştir.



Şekil 4.11. MIP nanofilm temelli SPR Biyosensörünün, Piliç Bonfile ürünündeki 2., 5., 8., 10., 12., ve 15. günlerindeki sensorgramın doğrusal grafiği.

Piliç bonfile ile muamele edilen pepton çözeltisi, önerilen sensörün fizibilitesini incelemek için doğal bir kaynak olarak seçildi ve bu amaçla, farklı günlerde hazırlanan örnekler SPR sensör algılama yüzeyine uygulandı. SPR sensörünün tanıma yeteneği, R^2 (0.95) değerine sahip piliç bonfile oldukça olumluydu (Şekil 4.11, 4.12) ve ilerleyen günlerde, SPR sensör yanıtlarında (Şekil 4.12) artışa neden oldu. SPR sensörü, mikroorganizma algılama için gıda güvenliği çalışmalarda kullanılan büyük bir potansiyeldir. Ayrıca *Pseudomonas* spp. analizinin kültürel metot çalışmaları Ankara Gıda Kontrol Laboratuvarı tarafından doğruluk yapılmıştır. Örneğin, 10. Gün'de *Pseudomonas* spp. Gıda Kontrol Laboratuvarı tarafından 6.9×10^8 kob/g rapor

edilirken, SPR sisteminden elde edilen sensogramın karşılığı 6.3×10^8 kob/g gözlemlenmiştir. SPR'nin doğruluk sonucu (%94) gıda kontrol labratuvarlarda kullanılmak için oldukça tatmin ediciydi.



Şekil 4.12. MIP nanofilm temelli SPR Biyosensörünün, Piliç Bonfile ürünündeki 2., 5., 8., 10., 12., ve 15. günlerindeki sensorgram garfiği.

Sonuç olarak; *Pseudomonas* spp. bakterisinin toprakta, suda yaygın bulunması ve gıda ürünleriyle kontamine olması nedeniyle, gıda ürünlerinin mikroflorasında yaygın olarak bulunmaktadır. Taze üründe genellikle mikrofloranın %2'sini kapsamaktadırlar, *Pseudomonas* spp. bakterisinin önemi bu süreçten sonrasında ortaya çıkmaktadır. Psikrofik olan *Pseudomonas* spp. türü +4°C'de bile üremeye devam edebilmektedir ve yapılan çalışmalara göre bozulan bir gıdanın mikroflorasının %96'sını kapsadığı belirlenmiştir. Bu durumda *Pseudomonas* spp. bakterisini raf ömrü kalitesini belirlemede önemli bir araç olmasına olanak sağlamaktadır. Yapılan çalışma ile her taze gıda için mikroflora oranı değişmekle birlikte tavuk ürünü için, yapılan literatür çalışmalarına göre bu oran 10^2 - 10^3 kob/g'dır. Kısaca taze/yeni işlem görmüş bir üründe, beklenen başlangıç *Pseudomonas* spp. bakteri yük oranı 10^2 - 10^3 kob/g'dır. Başlangıç yükünden sonrasında *Pseudomonas* spp. yükünün 10^7 - 10^8 kob/g gelene kadar tüketim için uygun olduğu literatürlerde belirtilmiştir. 10^8 kob/g'dan sonrasında artık raf ömrü sürecinin dolduğu bozulmanın başladığını, belirtebiliriz.

Ankara gıda kontrol laboratuvarında yapılan çalışmaya ve MIP nanofilm temelli SPR Biyosensöre göre 2. günündeki bir üründe 1×10^2 kob/g'lık üreme tespit edilmiş olması ve bu durum 5., 8., 10., 12., ve 15., günlerde yapılan farklı metotlarda benzer sonuçlar elde edilmesi ve tespit edilen sonuçların, literatür çalışmaları tarafından desteklendiği gözlemlenmektedir. (Çizelge 4.3) karşıladığını göstermektedir.

Çizelge 4.3. Piliç bonfile ürününde farklı günlerde yapılan kültürel yöntem ve MIP SPR biyosensöre ait *Pseudomonas* spp. analiz sonuçları.

<i>Pseudomonas</i> spp. Analiz Metotlarının Karşılaştırılması			
Piliç Bonfile Ürünü Raf Ömrü Süresi	Kültürel Yöntem (ISO 13720)	MIP Temelli SPR Biyosensör	Literatür Çalışmaları [118]
2. gün	1.0×10^2 kob/g	0.5×10^3 kob/g	3×10^3 kob/g
5. gün	6.4×10^5 kob/g	6.0×10^5 kob/g	2×10^5 kob/g
8. gün	1.2×10^8 kob/g	0.9×10^8 kob/g	7×10^6 kob/g (7.gün)
10. gün	6.9×10^8 kob/g	6.3×10^8 kob/g	1×10^9 kob/g (9.gün)
12. gün	1.2×10^9 kob/g	1.0×10^9 kob/g	7×10^9 kob/g (11.gün)
15. gün	5.0×10^9 kob/g	4.5×10^9 kob/g	1×10^{11} kob/g (14.gün)

Çizelge 4.4'de Biyosensör temelli cihazlarla tespit edilen *Pseudomonas* spp. bakterlerine ait literatür çalışmaları değerlendirilmiştir. Bu çalışmalar incelendiğinde, Z. Zhong ve arkadaşları [120] *Pseudomonas aeruginosa* aptamerlerinin ile polidopamin-polietilenimin (PDA-PEI) kopolimer ile işaretlenerek florasan biyosensöründe, yağsız süt, portakal suyu ve buzlu şeker gıda örneklerinde analiz çalışmaları yapmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre florasan biyosensörün tayin limiti 1.0 kob/ml, tayin aralğı ise 1.0×10^1 - 1.0×10^7 kob/ml olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.4. Biyosensör temelli cihazlarla tespit edilen *Pseudomonas* bakterlerine ait literatür çalışmaları.

Sensör Türü	Örnek	Analit	Tayin Aralığı	Tayin Limiti	Referans
Elektrokimyasal Sensör	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	İnsan	1–100 µM	0.27 µM, 1.34 µM, 2.30 µM	[119]
Polidopamin-polietilenimin - based biyosensör	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Süt-Portakal Suyu	1.0×10 ¹ - 1.0×10 ⁷ kob/ml	1.0 kob/ ml	[120]
Piezoelektrik Sensör	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	İnsan	1.9×10 ² to 1.0×10 ⁶	52 kob/mL	[121]
Yüzey Plazomon Rezonans	<i>Pseudomonas putida</i>	-	90 µg/ml- 170 µg/ml		[122]
Florasın Biyosensör	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	İçme Suyu, Portakal Suyu Şeker,	1.28x10 ³ - 2.0×x10 ⁷ kob/ml	100 kob/ml	[123]
Florasın Biyosensör	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	İçme Suyu	10-1.0×10 ⁷ kob/ml	9.0 kob/ml	[124]
Elektrokimyasal Sensör	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kan Örneği, Tükürük,Atık su	1–100 µM	0.33 µM	[125]
Yüzey Plazomon Rezonans	<i>Pseudomonas spp.</i>	-	187.43 deg/RIU	2.05 deg-1	[126]
Piezoelektrik Sensör	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Et Ürünleri	1.30×10 ⁷ - 1.30×10 ⁸ kob/g	1.3×10 ⁷ kob/g	[127]

Yüze Plazomon Rezonans	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	1.0×10^1 - 1.0×10^3 kob/g	10 kob/g	[128]
Yüze Plazomon Rezonans	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	0.01–100 ng /ml	10 pg/ml	[129]
Floras Biyosensör	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Süt, Şeker, Portakal Suyu	$8.0 \cdot 10^1$ kob/ml	1.5 kob/ml	[130]
Floras Biyosensör	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çevresel Örnekler (Göl -Nehir Suyu)	4.0×10^3 - 1.8×10^4 kob/ml	46 kob/ml	[131]
Yüze Plazomon Rezonans	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	30.85 deg/RIU	0.21156 deg-1	[132]
Yüze Plazomon Rezonans	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	33.98 deg/RIU	0.2987 deg- 1	[132]
Quarz kristal mikrobalans	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Klinik Örnekler	1.5×10^2 - 1.0×10^8 kob/ml	1.5×10^2 kob/ml	[133]
Optik Biyosensör	<i>Pseudomonas spp.</i>	(Toprak)	0.5–5.0 mg/L	0.5 mg/L	[134]
Optik Biyosensör	<i>Pseudomonas spp.</i>	(Toprak)	0.5–5.0 mg/L	0.2 mg/L	[134]
Yüze Plazomon Rezonans	<i>Pseudomonas spp.</i>	Piliç Bonfile	1.0×10^2 - 1.0×10^4 kob/g	0.50×10^2 kob/g	Bu Çalışma

X. Shi ve arkadaşları [121] tarafından, *Pseudomonas aeruginosa* tespiti için manyetik boncuk / aptamer / poliadenile DNA'nın sandviç tipi kompleksi ile düzenlenen piezoelektrik kuvars

kristali biyosensöründe, insan kan örneklerinde analiz çalışmaları yapmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre hazırlanılan piezoelektrik biyosensörünün tampon çözeltilerde tayin limiti, 9.0 kob/mL iken kan örneklerinde 52 kob/mL olarak değerlendirilmiştir.

R. Gao ve arkadaşları [123] tarafından, *Pseudomonas aeruginosa* tespiti için 5-karboksifloresein etiketli tamamlayıcı DNA (FAM-cDNA), aptamerin florasan biyosensöründe, içme suyu, portakal suyu ve buzlu şeker gıda örneklerinde analiz çalışmaları yapmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre florasan biyosensörün tayin limiti 100 kob/ml, tayin aralığı ise $1.28 \times 10^3 - 2.00 \times 10^7$ kob/ml olarak hesaplanmıştır.

H. Wang ve arkadaşları [124] tarafından, *Pseudomonas aeruginosa* tespiti için aptamer temelli florasan biyosensör geliştirilmiştir. Geliştirilen biyosensörde, içme suyu örneklerinde analiz çalışmaları yapılmıştır ve elde edilen sonuçlara göre florasan biyosensörün tayin limiti 9.0 kob/ml, tayin aralığı ise $1.0 \times 10^1 - 1.0 \times 10^7$ kob/ml olarak hesaplanmıştır.

N. Kim ve arkadaşları [127] tarafından, *Pseudomonas aeruginosa* tespiti için antikor temelli piezoelektrik biyosensör geliştirilmiştir. Geliştirilen biyosensörde, et ürünleri örneklerinde analiz çalışmaları yapılmıştır ve elde edilen sonuçlara göre piezoelektrik biyosensörün tayin limiti 1.3×10^7 kob/g, tayin aralığı ise $1.3 \times 10^7 - 1.3 \times 10^8$ kob/g olarak hesaplanmıştır.

J. Hu ve arkadaşları [128] tarafından, *Pseudomonas aeruginosa* tespiti için aptamer temelli lokalize yüzey plazmon rezonans (LSPR) biyosensörü geliştirilmiştir. Geliştirilen biyosensörde, hazırlanılan bakteri solüsyonlarında analiz çalışmaları yapılmıştır ve elde edilen sonuçlara göre lokalize yüzey plazmon rezonans (LSPR) biyosensörün tayin limiti 10 kob/g, tayin aralığı ise $1.0 \times 10^1 - 1.0 \times 10^3$ kob/g olarak hesaplanmıştır.

S. Ellairaja ve arkadaşları [130] tarafından, *Pseudomonas aeruginosa* tespiti için monoklonal antikor temelli florasan biyosensör geliştirilmiştir. Geliştirilen biyosensörde, su, toprak ve süt, şeker kamışı ve portakal suyu gibi gıda ürünlerinde analiz çalışmaları yapılmıştır ve elde edilen

sonuçlara göre florasan biyosensörün tayin limiti 1.5 kob/mL, tayin aralğı ise $8.0-1.0 \times 10^1$ kob/g olarak hesaplanmıştır.

G. Kaur ve arkadaşları [131] tarafından, *Pseudomonas aeruginosa* tespiti için pirimidin temelli florasan biyosensör geliştirilmiştir. Geliştirilen biyosensörde, su, gibi çeşitli çevresel örneklerde analiz çalışmaları yapılmıştır ve elde edilen sonuçlara göre florasan biyosensörün tayin limiti 46 kob/mL, tayin aralğı ise $4.0 \times 10^3-1.8 \times 10^4$ kob/g olarak hesaplanmıştır.

J. Cai ve arkadaşları [133] tarafından, *Pseudomonas aeruginosa* tespiti için ITS hibridizasyon temelli kuvars kristali mikro terazi (QCM) DNA biyosensör geliştirilmiştir. Geliştirilen biyosensörde, klinik örneklerde analiz çalışmaları yapılmıştır ve elde edilen sonuçlara göre kuvars kristali mikro terazi (QCM) DNA biyosensörün tayin limiti 1.5×10^2 kob/mL, tayin aralğı ise $1.5 \times 10^2-1.5 \times 10^8$ kob/g olarak hesaplanmıştır.

5. YORUM

Hazırlanılan fonksiyonel monomere ait karakterizasyon analizi FTIR Spektrumu ile yapılmıştır. Ölçümler; amid I bantlarına 1600-1700 cm^{-1} aralığında, amid II bantlarına 1480-1580 cm^{-1} aralığında, karbonil bantlarına 1735-1765 cm^{-1} aralığında ve hidroksil bantlarına 3250-3550 cm^{-1} aralığında eşdeğerdir. Hazırlanılan fonksiyonel monomerin ölçüm sonuçlarına göre, amid I bantlarına 1655 cm^{-1} dalga boyunda, amid II bantlarına 1520 cm^{-1} dalga boyunda, ester bantlarına 1735 cm^{-1} dalga boyunda, hidroksil bantlarına 3347 cm^{-1} dalga boyunda tespit edilmiştir.

Fonksiyonel monomerin kimyasal yapısının kontrol edilmesinde, NMR spektrometresinde incelenmiştir. $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1.99 (t; 3H, $J=7.08$ Hz, CH_3), 1.42 (m; 2H, CH_2), 3.56 (t; 3H, $-\text{OCH}_3$), 4.82-4.87 (m; 1H, methin), 5.26 (s; 1H, vinil H), 5.58 (s; 1H, vinil), 6.86 (δ ; 1H, $J=7.4$ Hz, NH), 7.82 (δ ; 1H, $J=8.4$ Hz, NH), 6.86-7.52 (m; 5H, aromatik) verileri tespit edilmiştir. Karakterizasyon ölçümleri sonucunda bulunan verilerin fonksiyonel gruplarına uygun olduğu ve sentezleme işleminin başarılı olduğu belirlenmiştir. [107-116].

Temas açısı ölçümleri; yüzey üzerine damlatılan çözeltinin (Su, tampon, ...) damla yapısının zamana bağlı değişimini değerlendirmek amacıyla kullanılmaktadır. Tasarlanılan SPR biyosensörün çip yüzeyine damlatılan su damlasının SPR çip yüzey üzerindeki gerilimi, temas açısı yüzeyin sıvı tutma özelliği hakkında temas açısı ölçümleri bilgi edilebilmektedir. Şekil 4.1'de baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) yüzeylerdeki yüzey temas açıları gösterilmiştir. Ölçüm sonucunda edilen değerler MIP ve NIP nanofilm temelli SPR çipler için sırasıyla; 68.7° ve 79.5° olarak bulunmuştur.

Elipsometrik ölçüm sonuçlarına göre MIP ve NIP nanofilm temelli SPR biyosensör yüzeyinin kalınlığı sırasıyla; 150.4 ± 1.5 nm and 72.4 ± 1.2 nm olarak tespit edilmiştir. Bu durum, baskılanmış ve baskılanmamış nanofilm yapı yüzeyinin homojen ve sistemde etkin plazmon ölçümlerinin yapılmasına uygun olarak tasarlandığını göstermektedir.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ölçümleri; Herhangi bir yüzeye elektron demeti gönderilerek yüzeyin 3 boyutlu olarak görüntülenmesi amacıyla kullanılmaktadır. SEM ile yapılan ölçümlerde yüzey üzerindeki oluşturulan yüzey şekilleri hakkında detaylı bilgi edinilebilmektedir. Moleküler baskılama işleminin etkin şekilde gerçekleştirilip gerçekleştirilemediği SEM ölçümleri ile belirlenmektedir. Şekil 4.3’de MIP nanofilm temelli SPR biyosensör yüzeyine ait SEM görüntüleri mevcuttur. Görüntüleme sonucunda mavi renk ile işaretlen alanlarda *Pseudomonas* spp. bakterisinin sensör yüzeyine etkin şekilde baskılandığı belirlenmiştir.

Karakterizasyon işlemleri tamamlanan nanofilm temelli SPR biyosensörün kinetik parametrelerinin belirlenebilmesi için *Pseudomonas* spp. bakterisinden $1.0 \times 10^2 - 1.0 \times 10^4$ kob/mL konsantrasyon aralığında farklı süspansiyon solüsyonları hazırlanılarak SPR sisteminden geçirilmiştir.

Elde edilen doğrunun denklemi nanofilm temelli SPR biyosensörün $1.0 \times 10^2 - 1.0 \times 10^4$ kob/mL aralığında doğruluğu %99 ve tayin limiti 0.5×10^2 kob/mL olarak tespit edilmiştir.

Bu modelde geniş derişim aralıklarında SPR biyosensörü ile *Pseudomonas* spp. bakterisi arasındaki denge ve bağlanma kinetik ölçümleri gösterilmiştir. SPR biyosensörü ile *Pseudomonas* spp. bakterisi arasındaki etkileşimi belirlemek için Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich adsorpsiyon izoterm modelleri ile hesaplama yapılmıştır. Elde edilen veriler sonucunda bağlanma sabitinin (K_a) bağlanma kinetik analizinde ve adsorpsiyon izoterm modellerinde benzer olduğu görülmüştür. Maksimum kırılma değerinin ($\Delta R = 7.4$) kinetik analizler sonucu elde edilen maksimum kırılma değerlerine ($\Delta R_{maks} = 9.04$) yakın değerde olması deney sonucunun literatür verilerine uyduğunu görülmüştür. Şekil 4.5 , Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’ da verilen izoterm modellerine göre korelasyon katsayıları (R^2) Freundlich; 0.98 , Langmuir; 0.93 Langmuir-Freundlich; 0.87’dir (Çizelge 4.1). Langmuir tipi izoterm modeli için korelasyon katsayısının diğer modellerden daha yüksek olduğu görülmektedir. Langmuir modeline göre $K_a = 8.33$ (kob/mL)⁻¹ ve $K_d = 0.11$ kob/mL olduğu bulunmuştur. Bu sonuç, analitin sisteme tek tabakalı/homojen olarak bağlandığını göstermektedir ve bağlanmanın doğrusallığı $R^2 = 0.98$ olarak bulunmuştur. Özet olarak, elde edilen verilerle bu afinite sisteminin ekstra

etkileşimin kabul edilmemesine ve Langmuir adsorpsiyon modeline daha uygun olduğunu söyleyebiliriz, bu da işlevsel monomerlerin, MAH, polimerik zincir boyunca homojen olarak dağıldığı anlamına gelmektedir. Ayrıca, neredeyse enerjisel olarak eşittirler ve adsorpsiyon işlemi sırasında hiçbir yanal etkileşim meydana gelmemiştir [117].

Sonuç olarak; *Pseudomonas* spp. baskılanmış nanofilm temelli SPR biyosensörünün yüzeyindeki etkileşimler; tek tabakalı, homojen dağılımlı, minimum yanal etkileşimli ve eş enerjili olduğu görülmüştür. Yapılan çalışma sonucunda tayin limiti 0.5×10^2 kob/mL olarak bulunmuştur.

Yapılan çalışmada, nanofilm temelli SPR sensörün seçicilik etkinliğinin belirlenebilmesi için, MIP ve NIP temelli SPR biyosensör kullanılmıştır. Hedef bakteri *Pseudomonas* spp. 'den farklı olarak seçicilik kontrolü için *Staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi* and *Escherichia coli* bakterilerinde kullanılmıştır. 4 farklı türe ait 1×10^4 kob/mL konsantrasyonda hazırlanan süspansiyonlar SPR sisteminden geçirilmiştir (Çizelde 4.2).

Seçicilik katsayısı (k) verilere göre;

MIP temelli SPR biyosensörünün *Pseudomonas* spp bakterisine seçiciliği

- *Staphylococcus aureus* bakterisine göre yaklaşık 27 kat ($k=26.7$)
- *Salmonella paratyphi* bakterisine göre yaklaşık 9 kat ($k=8.55$)
- *Escherichia coli* bakterilerine göre yaklaşık 8 kat ($k=7.75$) daha fazladır.

Bağıl seçicilik katsayısı (k') verilere göre;

- *Staphylococcus aureus* bakterisi için $k'=22.5$
- *Salmonella paratyphi* bakterisi için $k'=7.18$
- *Escherichia coli* bakterisi için $k'=4.96$ 'dır.

Hazırlanan MIP nanofilm temelli SPR biyosensöründe *Pseudomonas* spp. bakterisinin *Staphylococcus aureus* bakterisine göre yaklaşık 27 kat daha seçici olduğu belirlenmiştir, bu durum *Staphylococcus aureus* bakterisinin , gram pozitif , yuvarlak şekilli ve herhangi kamçılı

yapıya sahip olmaması yani morfolojik yapı olarak birbirlerinden tamamen farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

MIP nanofilm temelli SPR biyosensöründe *Pseudomonas spp.* bakterisinin *Salmonella paratyphi* bakterisine göre yaklaşık 9 kat daha seçici olduğu belirlenmiştir, bu durum *Salmonella paratyphi* bakterisinin gram negatif, çubuk şekilli ve ebat özelliklerinin birbirine benzer morfolojik yapıya sahip olması nedeniyle seçiciliğin *Staphylococcus aureus* bakterisine göre daha az fakat *Pseudomonas spp.* bakterisinin *Salmonella paratyphi* bakterisinden farklı kamçı yapıya ve polimerdeki yüksek seçiciliğe sahip kavitelere sahip olmasının nedeniyle ($\Delta R:0.97$) daha seçici sinyal verdiği gözlemlenmiştir.

Son olarak MIP nanofilm temelli SPR biyosensöründe *Pseudomonas spp.* bakterisinin *Escherichia coli* bakterisine göre yaklaşık 8 kat daha seçici olduğu belirlenmiştir, bu durum *Escherichia coli* bakterisinin gram negatif, çubuk şekilli ve ebat özelliklerinin birbirine benzer morfolojik yapıya sahip olması nedeniyle seçiciliğin *Staphylococcus aureus* bakterisine göre daha az fakat *Pseudomonas spp.* bakterisinin *Escherichia coli* bakterisinden farklı kamçı yapıya ve polimerdeki yüksek seçiciliğe sahip kavitelere sahip olmasının nedeniyle ($\Delta R:1.07$) daha seçici sinyal verdiği gözlemlenmiştir.

Baskılamadaki seçicilik etkinliğini gösteren k' değerine göre, sonuç 1 değerinin ne kadar üzerindeyse baskılama işleminin başarısı o oranda yüksektir. Buna göre *Pseudomonas spp* bakterisi *Staphylococcus aureus* bakterisi için $k'=22.5$, *Salmonella paratyphi* bakterisi için $k'=7.18$ ve *Escherichia coli* bakterisi için $k'=4.96$ 'dır. Bu sonuçlara göre hazırlanan nanofilm temelli SPR biyosensörünün *Pseudomonas spp* bakterisi için seçiciliği oldukça yüksektir.

Sonuç olarak; Nanofilm temelli SPR biyosensörün, *Pseudomonas spp.* bakterisine karşı verdiği tepkinin baskılanmamış biyosensöre, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi* ve *Escherichia coli* bakterilerine verdiği tepkiye göre sırasıyla 27, 9 ve 8 kat daha fazla olması hazırlanan polimerin gerçekten yüksek özgül kaliteye sahip olduğunu göstermektedir.

Yapılan çalışmada; biyosensörün adsorpsiyon-desorpsiyon-rejenerasyon basamaklarındaki döngülerinin yeniden kullanıma uygunluğunun belirlenebilmesi için *Pseudomonas* spp. baskılanmış nanofilm temelli SPR sensörünün tekrarlanabilirliğini gözlemlemek amacıyla 1.0×10^3 kob/mL konsantrasyonundaki süspansiyon SPR sisteminden arka arkaya 5 defa tekrarlanmıştır.

Ayrıca, geliştirilen sensörün 4°C'deki muhafaza koşulları ile 12 aylık çalışma süresi esnasında farklı aralıklarla çalışmalar tekrarlanmıştır (1.0×10^3 kob/mL konsantrasyonundaki süspansiyon). Bu koşullar dikkate alındığında sensörün depolama süresi stabiliteside teyit edilmiştir ve uygun muhafaza koşullarında en az 1 yıl süre kullanıma uygun olduğu gözlemlenmiştir (Şekil4.10B).

Kültürel metot ile gerçekleştirilen analiz sonucunda piliç bonfile ürünüde 2. gününde 1.0×10^2 kob/g, 5. gününde 6.4×10^5 kob/g, 8. gününde 1.2×10^8 kob/g, 10. gününde 6.9×10^8 kob/g kob/g, 12. gününde 1.2×10^9 kob/g, 15. gününde 5.0×10^9 kob/g *Pseudomonas* spp. tespit edilmiştir.

Piliç bonfile ile muamele edilen pepton çözeltisi, önerilen sensörün fizibilitesini incelemek için doğal bir kaynak olarak seçildi ve bu amaçla, farklı günlerde hazırlanan örnekler SPR sensör algılama yüzeyine uygulandı. SPR sensörünün tanıma yeteneği, R^2 (0.95) değerine sahip piliç bonfile oldukça olumluydu (Şekil 4.11, 4.12) ve ilerleyen günlerde, SPR sensör yanıtlarında (Şekil 4.12) artışa neden oldu. SPR sensörü, mikroorganizma algılama için gıda güvenliği çalışmalarda kullanılan büyük bir potansiyeldir. Ayrıca *Pseudomonas* spp. analizinin kültürel metot çalışmaları Ankara Gıda Kontrol Laboratuvarı tarafından doğruluk yapılmıştır. Örneğin, 10. Gün'de *Pseudomonas* spp. Gıda Kontrol Laboratuvarı tarafından 6.9×10^8 kob/g rapor edilirken, SPR sisteminden elde edilen sensogramın karşılığı 6.3×10^8 kob/g gözlemlenmiştir. SPR'nin doğruluk sonucu (%94) gıda kontrol labratuvarlarda kullanılmak için oldukça tatmin ediciydi.

6. KAYNAKLAR

1. Food And Agriculture Organization Of The United Nation, The Spectrum Of Malnutrition
<http://Www.Fao.Org/Worldfoodsummit/English/Fsheets/Malnutrition.Pdf> **(Erişim Tarihi: 01 Şubat 2021).**
2. Food And Agriculture Organization Of The United Nation, Prevalence Of Moderate Or Severe Food Insecurity, <http://www.fao.org/state-of-food-security-nutrition/en/> **(Erişim Tarihi: 01 Şubat 2021).**
3. World Healty Organization, International Food Safety Conference, <https://Www.Who.Int/News-Room/Events/International-Food-Safety-Conference> **(Erişim Tarihi: 01 Şubat 2021).**
4. Food And Agriculture Organization Of The United Nation, Save Food: Global Initiative On Food Loss And Waste Reduction, <http://www.fao.org/publications/sofi/en/> **(Erişim Tarihi: 01 Şubat 2021).**
5. Besd-Bir, Dünya Et Üretimi, <https://besd-bir.org/uploads/dunya-et-uretimi.pdf> **(Erişim Tarihi: 01 Şubat 2021).**
6. Wattagnet, Understanding Poultry Products Spoilage <https://www.wattagnet.com/articles/4207-understanding-poultry-products-spoilage> **(Erişim Tarihi: 01 Şubat 2021).**
7. F.D. Özkaya, M. Cömert, Gıda zehirlenmelerinde etken faktörler, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 65 (2008) 149-158.
8. C.E.R. Dodd, PSEUDOMONAS | Introduction, in: C.A. Batt, M.L. Tortorello (Eds.) Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), Academic Press, Oxford, 2014, pp. 244-247.
9. D. Figdor, K. Gulabivala, Survival against the odds: Microbiology of root canals associated with post-treatment disease, Endodontic Topics, 18 (2011) 62-77.
10. N. Charles, S.K. Williams, G.E. Rodrick, Effects of Packaging Systems on the Natural Microflora and Acceptability of Chicken Breast Meat, Poultry Science, 85 (2006) 1798-1801.
11. Doudorof, M., Gram-Negative Aerobic Rods And Cocci, Genus 1: *Pseudomonadaceae*”, In Krieg, N. R., Holt, J. G. (Eds), 1984, Bergey“S Manual Of Systematic Bacteriology, William&Wilkins, Baltimore, London 1: 114-219

12. Z. Hossain, Bacteria: *Pseudomonas*, in: Y. Motarjemi (Ed.) *Encyclopedia of Food Safety*, Academic Press, Waltham, **2014**, pp. 490-500.
13. C. Jeppesen, Media for *Aeromonas* spp., *Plesiomonas shigelloides* and *Pseudomonas* spp. from food and environment, *International Journal of Food Microbiology*, **26 (1995)** 25-41.
14. M.A. Cousin, PSEUDOMONAS | Introduction, in: R.K. Robinson (Ed.) *Encyclopedia of Food Microbiology*, Elsevier, Oxford, **1999**, pp. 1864-1867.
15. C. Jeppesen, Chapter 8 Media for *Aeromonas* spp., *Plesiomonas shigelloides* and *Pseudomonas* spp. from food and environment, in: J.E.L. Corry, G.D.W. Curtis, R.M. Baird (Eds.) *Progress in Industrial Microbiology*, Elsevier **1995**, pp. 111-127.
16. N.D. LEVINE, Buchanan, R. E. & Gibbons, N. E., eds. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md. 21202. xxvi + 1246 pp. \$45.00, *The Journal of Protozoology*, **22 (1975)** 7-7.
17. R.A. Benner, Organisms of Concern but not Foodborne or Confirmed Foodborne: Spoilage Microorganisms, **2013**, pp. 245-250.
18. Hinton Jr.A., Cason J.A., Kimberly D., **2003**, *Ingram Tracking Spoilage Bacteria In Commercial Poultry Processing And Refrigerated Storage Of Poultry Carcasses*
19. F.B. Whitfield, Microbiology of food taints, *International Journal of Food Science & Technology*, **33 (1998)** 31-51.
20. Akan M., **2009**, *Et Ve Bazı Et Ürünleri İle Soğuk Hava Depolarında Pseudomonas Türlerinin İzolasyonu Ve İdentifikasyonu*, (Yüksek Lisans Tezi)
21. N. Charles, S.K. Williams, G.E. Rodrick, Effects of packaging systems on the natural microflora and acceptability of chicken breast meat, *Poult Sci*, **85 (2006)** 1798-1801.
22. Z. Hossain, Bacteria: *Pseudomonas*, in: Y. Motarjemi (Ed.) *Encyclopedia of Food Safety*, Academic Press, Waltham, **2014**, pp. 490-500.
23. I. Arnaut-Rollier, L. De Zutter, J. Van Hoof, Identities of the *Pseudomonas* spp. in flora from chilled chicken, *International journal of food microbiology*, **48 (1999)** 87-96.
24. A. Cristina, P. Ribeiro, Samera, R. Bruzaroski, F. Almeida, B. Pereira, F. Paião, R. Poli-Frederico, J. Sifuentes, J. Santos, E. Helena, E. Santana, Proteolytic behavior of isolated *Pseudomonas* spp. from refrigerated raw milk in different concentrations and storage temperatures *Comportamento proteolítico de Pseudomonas* spp. isoladas de leite cru refrigerado em diferentes concentrações e temperaturas de estocagem, *Semina: Ciências Agrárias*, **39 (2018)** 419-424.

25. A. Rouger, O. Tresse, M. Zagorec, Bacterial Contaminants of Poultry Meat: Sources, Species, and Dynamics, *Microorganisms*, 5 (2017) 50.
26. K. Haupt, Molecularly imprinted polymers: the next generation, *Anal Chem*, 75 (2003) 376a-383a.
27. S.A. Piletsky, N.W. Turner, P. Laitenberger, Molecularly imprinted polymers in clinical diagnostics—Future potential and existing problems, *Medical Engineering & Physics*, 28 (2006) 971-977.
28. S.C. Zimmerman, N.G. Lemcoff, Synthetic hosts via molecular imprinting—are universal synthetic antibodies realistically possible?, *Chemical Communications*, (2004) 5-14.
29. M.C. Blanco-López, M.J. Lobo-Castañón, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23 (2004) 36-48.
30. G. Vasapollo, R.D. Sole, L. Mergola, M.R. Lazzoi, A. Scardino, S. Scorrano, G. Mele, Molecularly imprinted polymers: present and future prospective, *Int J Mol Sci*, 12 (2011) 5908-5945.
31. S.A. Piletsky, N.W. Turner, P. Laitenberger, Molecularly imprinted polymers in clinical diagnostics—Future potential and existing problems, *Medical Engineering & Physics*, 28 (2006) 971-977.
32. Y. Hongyuan, K. Row, Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer, *Int J Mol Sci*, 7 (2006).
33. G. Vasapollo, R.D. Sole, L. Mergola, M.R. Lazzoi, A. Scardino, S. Scorrano, G. Mele, Molecularly imprinted polymers: present and future prospective, *Int J Mol Sci*, 12 (2011) 5908-5945.
34. Y. Saylan, Ö. Erdem, F. Inci, A. Denizli, Advances in Biomimetic Systems for Molecular Recognition and Biosensing, *Biomimetics*, 5 (2020) 20.
35. H. Dibekkaya, Ccp Antikorlarının Tayini İçin Yüzey Plazmon Rezonans Temelli Biyosensörlerin Hazırlanması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2015.
36. L. Chen, X. Wang, W. Lu, X. Wu, J. Li, Molecular imprinting: perspectives and applications, *Chemical Society Reviews*, 45 (2016) 2137-2211.
M. Erdem, R. Say, A. Ersöz, A. Denizli, H. Türk, Biomimicking, metal-chelating and surface-imprinted polymers for the degradation of pesticides, *Reactive and Functional Polymers*, 70 (2010) 238-243.

37. Y. Hongyuan, K. Row, Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer, *Int J Mol Sci*, 7 (2006).
38. A.C. Dias, E.C. Figueiredo, V. Grassi, E.A. Zagatto, M.A. Arruda, Molecularly imprinted polymer as a solid phase extractor in flow analysis, *Talanta*, 76 (2008) 988-996.
39. E. Birlik, A. Ersöz, A. Denizli, R. Say, Preconcentration of copper using double-imprinted polymer via solid phase extraction, *Analytica Chimica Acta*, 565 (2006) 145-151.
40. H. Yavuz, V. Karakoç, D. Türkmen, R. Say, A. Denizli, Synthesis of cholesterol imprinted polymeric particles, *International Journal of Biological Macromolecules*, 41 (2007) 8-15.
41. G. Ertürk, B. Mattiasson, Molecular Imprinting Techniques Used for the Preparation of Biosensors, *Sensors (Basel, Switzerland)*, 17 (2017) 288.
42. C. Alexander, H. Andersson, L. Andersson, R. Ansell, N. Kirsch, I. Nicholls, J. O'Mahony, M. Whitcombe, Molecular Imprinting Science and Technology: A Survey of the Literature for The Years Up to And Including 2003, *Journal of molecular recognition : JMR*, 19 (2006) 106-180
43. I. Perçin, N. Idil, A. Denizli, Molecularly imprinted poly(N-isopropylacrylamide) thermosensitive based cryogel for immunoglobulin G purification, *Process Biochemistry*, 80 (2019) 181-189.
44. B. Ünlüer Ö, A. Ersöz, A. Denizli, R. Demirel, R. Say, Separation and purification of hyaluronic acid by embedded glucuronic acid imprinted polymers into cryogel, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 934 (2013) 46-52.
45. E.B. Özkütük, A. Ersöz, A. Denizli, R. Say, Preconcentration of phosphate ion onto ion-imprinted polymer, *Journal of Hazardous Materials*, 157 (2008) 130-136.
46. E. Birlik, A. Ersöz, E. Açıkkalp, A. Denizli, R. Say, Cr(III)-imprinted polymeric beads: Sorption and preconcentration studies, *J Hazard Mater*, 140 (2007) 110-116.
47. J. Ashley, M.-A. Shahbazi, K. Kant, V.A. Chidambara, A. Wolff, D.D. Bang, Y. Sun, Molecularly imprinted polymers for sample preparation and biosensing in food analysis: Progress and perspectives, *Biosensors and Bioelectronics*, 91 (2017) 606-615.
48. M. Javanbakht, S.E. Fard, A. Mohammadi, M. Abdouss, M.R. Ganjali, P. Norouzi, L. Safaraliev, Molecularly imprinted polymer based potentiometric sensor for the determination of hydroxyzine in tablets and biological fluids, *Analytica Chimica Acta*, 612 (2008) 65-74.

49. E. Yılmaz, Moleküler Baskılama Temelli Lizozim Sensörlerin Hazırlanması, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2013**.
50. G. Vasapollo, R.D. Sole, L. Mergola, M.R. Lazzoi, A. Scardino, S. Scorrano, G. Mele, Molecularly imprinted polymers: present and future prospective, *Int J Mol Sci*, **12** (2011) 5908-5945.
51. M. Zhao, G. Shen, The Application of Molecularly Imprinted Polymers, *Journal of Materials Science and Chemical Engineering*, **03** (2015) 87-89.
52. R. Lahsini, M.R. Louhaichi, N. Adhoum, L. Monser, Preparation and application of a molecularly imprinted polymer for determination of glibenclamide residues, *Acta Pharm*, **63** (2013) 265-275.
53. H. Yan, X. Cheng, N. Sun, T. Cai, R. Wu, K. Han, Rapid and selective screening of melamine in bovine milk using molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion coupled with liquid chromatography-ultraviolet detection, *Journal of Chromatography B*, **908** (2012) 137-142.
54. A. Guzmán-Vázquez de Prada, P. Martínez-Ruiz, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, Solid-phase molecularly imprinted on-line preconcentration and voltammetric determination of sulfamethazine in milk, *Analytica Chimica Acta*, **539** (2005) 125-132.
55. Y. Hu, R. Liu, Y. Zhang, G. Li, Improvement of extraction capability of magnetic molecularly imprinted polymer beads in aqueous media via dual-phase solvent system, *Talanta*, **79** (2009) 576-582.
56. A. Ostovan, M. Ghaedi, M. Arabi, Q. Yang, J. Li, L. Chen, Hydrophilic Multitemplate Molecularly Imprinted Biopolymers Based on a Green Synthesis Strategy for Determination of B-Family Vitamins, *ACS Appl Mater Interfaces*, **10** (2018) 4140-4150.
57. H. Yan, X. Cheng, N. Sun, T. Cai, R. Wu, K. Han, Rapid and selective screening of melamine in bovine milk using molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion coupled with liquid chromatography-ultraviolet detection, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **908** (2012) 137-142.
58. X. Zhou, X. Gao, F. Song, C. Wang, F. Chu, S. Wu, A sensing approach for dopamine determination by boronic acid-functionalized molecularly imprinted graphene quantum dots composite, *Applied Surface Science*, **423** (2017) 810-816.
59. S.J. Cho, H.-B. Noh, M.-S. Won, C.-H. Cho, K.B. Kim, Y.-B. Shim, A selective glucose sensor based on direct oxidation on a bimetal catalyst with a molecular imprinted polymer, *Biosensors and Bioelectronics*, **99** (2018) 471-478.

60. X. Qiu, X.Y. Xu, X. Chen, Y. Wu, H. Guo, Preparation of a molecularly imprinted sensor based on quartz crystal microbalance for specific recognition of sialic acid in human urine, *Anal Bioanal Chem*, 410 (2018) 4387-4395.
61. K. Erol, K. Köse, L. Uzun, R. Say, A. Denizli, Polyethyleneimine assisted-two-step polymerization to develop surface imprinted cryogels for lysozyme purification, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 146 (2016) 567-576.
62. O. Cakir, M. Bakhshpour, F. Yilmaz, Z. Baysal, Novel QCM and SPR sensors based on molecular imprinting for highly sensitive and selective detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in apple samples, *Materials Science and Engineering: C*, 102 (2019) 483-491.
63. A. Ersöz, S.E. Diltemiz, A.A. Özcan, A. Denizli, R. Say, Synergie between molecular imprinted polymer based on solid-phase extraction and quartz crystal microbalance technique for 8-OHdG sensing, *Biosensors and Bioelectronics*, 24 (2008) 742-747.
64. R. Say, M. Erdem, A. Ersöz, H. Türk, A. Denizli, Biomimetic catalysis of an organophosphate by molecularly surface imprinted polymers, *Applied Catalysis A: General*, 286 (2005) 221-225.
65. N. Verma, A. Bhardwaj, Biosensor technology for pesticides--a review, *Appl Biochem Biotechnol*, 175 (2015) 3093-3119.
66. J.A. Goode, J.V. Rushworth, P.A. Millner, Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes, *Langmuir*, 31 (2015) 6267-6276.
67. N. Bhalla, P. Jolly, N. Formisano, P. Estrela, Introduction to biosensors, *Essays Biochem*, 60 (2016) 1-8.
68. U. Guth, W. Vonau, J. Zosel, Recent developments in electrochemical sensor application and technology—a review, *Measurement Science and Technology*, 20 (2009) 042002.
69. Y. Saylan, F. Yilmaz, E. Özgür, A. Derazshamshir, H. Yavuz, A. Denizli, Molecular Imprinting of Macromolecules for Sensor Applications, *Sensors (Basel, Switzerland)*, 17 (2017) 898.
70. Y. Saylan, S. Akgönüllü, H. Yavuz, S. Ünal, A. Denizli, Molecularly Imprinted Polymer Based Sensors for Medical Applications, *Sensors (Basel, Switzerland)*, 19 (2019) 1279.
71. Y. Saylan, Ö. Erdem, S. Ünal, A. Denizli, An Alternative Medical Diagnosis Method: Biosensors for Virus Detection, *Biosensors (Basel)*, 9 (2019) 65.
Y. Saylan, Ö. Erdem, N. Cihangir, A. Denizli, Detecting Fingerprints of Waterborne Bacteria on a Sensor, *Chemosensors*, 7 (2019) 33.

72. G. Guan, B. Liu, Z. Wang, Z. Zhang, Imprinting of Molecular Recognition Sites on Nanostructures and Its Applications in Chemosensors, *Sensors (Basel)*, 8 (2008) 8291-8320.
73. I. Benhar, I. Eshkenazi, T. Neufeld, J. Opatowsky, S. Shaky, J. Rishpon, Recombinant single chain antibodies in bioelectrochemical sensors, *Talanta*, 55 (2001) 899-907.
74. T. Neufeld, A. Schwartz-Mittelmann, D. Biran, E.Z. Ron, J. Rishpon, Combined Phage Typing and Amperometric Detection of Released Enzymatic Activity for the Specific Identification and Quantification of Bacteria, *Analytical Chemistry*, 75 (2003) 580-585.
75. R.J. Leatherbarrow, P.R. Edwards, Analysis of molecular recognition using optical biosensors, *Curr Opin Chem Biol*, 3 (1999) 544-547.
76. S. Balasubramanian, I.B. Sorokulova, V.J. Vodyanoy, A.L. Simonian, Lytic phage as a specific and selective probe for detection of *Staphylococcus aureus*--A surface plasmon resonance spectroscopic study, *Biosens Bioelectron*, 22 (2007) 948-955.
77. V. Nanduri, S. Balasubramanian, S. Sista, V. Vodyanoy, A. Simonian, Highly sensitive phage-based biosensor for the detection of β -galactosidase, *Analytica chimica acta*, 589 (2007) 166-172.
78. K.K. Dar, S. Shao, T. Tan, Y. Lv, Molecularly imprinted polymers for the selective recognition of microorganisms, *Biotechnology Advances*, 45 (2020) 107640.
79. H. Sun, Z.H. Mo, J.T.S. Choy, D.R. Zhu, Y.S. Fung, Piezoelectric quartz crystal sensor for sensing taste-causing compounds in food, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 131 (2008) 148-158.
80. S.-H. Chen, V.C.H. Wu, Y.-C. Chuang, C.-S. Lin, Using oligonucleotide-functionalized Au nanoparticles to rapidly detect foodborne pathogens on a piezoelectric biosensor, *Journal of Microbiological Methods*, 73 (2008) 7-17.
81. K. Ramanathan, B. Danielsson, Principles and applications of thermal biosensors, *Biosens Bioelectron*, 16 (2001) 417-423.
82. Ç. Çiçek, F. Yılmaz, E. Özgür, H. Yavuz, A. Denizli, Molecularly Imprinted Quartz Crystal Microbalance Sensor (QCM) for Bilirubin Detection, *Chemosensors*, 4 (2016) 21.
83. B.D. Gupta, R. Kant, [INVITED] Recent advances in surface plasmon resonance based fiber optic chemical and biosensors utilizing bulk and nanostructures, *Optics & Laser Technology*, 101 (2018) 144-161

84. T. Inanan, N. Tüzmen, S. Akgöl, A. Denizli, Selective cholesterol adsorption by molecular imprinted polymeric nanospheres and application to GIMS, *Int J Biol Macromol*, 92 (2016) 451-460.
85. D. Battal, S. Akgönüllü, M.S. Yalcin, H. Yavuz, A. Denizli, Molecularly imprinted polymer based quartz crystal microbalance sensor system for sensitive and label-free detection of synthetic cannabinoids in urine, *Biosensors and Bioelectronics*, 111 (2018) 10-17.
86. N. Khansili, G. Rattu, P.M. Krishna, Label-free optical biosensors for food and biological sensor applications, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 265 (2018) 35-49.
87. H.H. Nguyen, J. Park, S. Kang, M. Kim, Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications, *Sensors (Basel)*, 15 (2015) 10481-10510.
88. E. Wijaya, C. Lenaerts, S. Maricot, J. Hastanin, S. Habraken, J.-P. Vilcot, R. Boukherroub, S. Szunerits, Surface plasmon resonance-based biosensors: From the development of different SPR structures to novel surface functionalization strategies, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 15 (2011) 208-224.
89. DHVI Biomolecular Interaction Analysis (BIA) Core Facility, <https://shared-resources.dhvi.duke.edu/dhvi-core-facilities/dhvi-bia-core> (Erişim Tarihi: 07.02.2021)
90. F. Yılmaz, Y. Saylan, S. Akgönüllü, D. Çimen, A. Derazshamshir, N. Bereli, A. Denizli, 18 - Surface plasmon resonance based nanosensors for detection of triazinic pesticides in agricultural foods, in: A.M. Grumezescu (Ed.) *New Pesticides and Soil Sensors*, Academic Press 2017, pp. 679-718.
91. M. Bakhshpour, A. Denizli, Highly sensitive detection of Cd(II) ions using ion-imprinted surface plasmon resonance sensors, *Microchemical Journal*, 159 (2020) 105572.
92. J. Homola, Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species, *Chemical Reviews*, 108 (2008) 462-493.
93. L. Ping, H. Yan, H. Junze, Y. Chunwei, L. Baoping, Surface Plasmon Resonance Studies on Molecular Imprinting, *Sensors*, 2 (2002).
94. B. Osman, L. Uzun, N. Beşirli, A. Denizli, Microcontact imprinted surface plasmon resonance sensor for myoglobin detection, *Materials Science and Engineering: C*, 33 (2013) 3609-3614.
95. E. Yılmaz, D. Majidi, E. Ozgur, A. Denizli, Whole cell imprinting based *Escherichia coli* sensors: A study for SPR and QCM, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 209 (2015) 714-721.

96. F. Kartal, D. Çimen, N. Bereli, A. Denizli, Molecularly imprinted polymer based quartz crystal microbalance sensor for the clinical detection of insulin, *Materials Science and Engineering: C*, 97 (2019) 730-737.
97. S.D. Mazumdar, B. Barlen, P. Kämpfer, M. Keusgen, Surface plasmon resonance (SPR) as a rapid tool for serotyping of Salmonella, *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (2010) 967-971.
98. I. Perçin, N. Idil, M. Bakhshpour, E. Yılmaz, B. Mattiasson, A. Denizli, Microcontact Imprinted Plasmonic Nanosensors: Powerful Tools in the Detection of Salmonella paratyphi, *Sensors*, 17 (2017) 1375.
99. M. Bakhshpour, E. Tamahkar, M. Andaç, A. Denizli, Affinity binding of proteins to the modified bacterial cellulose nanofibers, *Journal of Chromatography B*, 1052 (2017) 121-127.
100. G. Ertürk, H. Özen, M.A. Tümer, B. Mattiasson, A. Denizli, Microcontact imprinting based surface plasmon resonance (SPR) biosensor for real-time and ultrasensitive detection of prostate specific antigen (PSA) from clinical samples, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 224 (2016) 823-832.
101. S.D. Mazumdar, M. Hartmann, P. Kämpfer, M. Keusgen, Rapid method for detection of Salmonella in milk by surface plasmon resonance (SPR), *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (2007) 2040-2046.
102. Food Matrices, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15 (2016) 183-205.
103. D. Wei, O.A. Oyarzabal, T.S. Huang, S. Balasubramanian, S. Sista, A.L. Simonian, Development of a surface plasmon resonance biosensor for the identification of *Campylobacter jejuni*, *J Microbiol Methods*, 69 (2007) 78-85.
104. J. Irudayaraj, C. DebRoy, Direct Detection of *E. Coli* O157:H7 in Selected Food Systems by a Surface Plasmon Resonance Biosensor, *LWT - Food Science and Technology*, 40 (2007) 187-192.
105. J.R. Son, G. Kim, A. Kothapalli, M.T. Morgan, D. Ess, Detection of *Salmonella enteritidis* Using a Miniature Optical Surface Plasmon Resonance Biosensor, 2007, pp. 1086.
106. M. Linman, K. Sugerman, Q. Cheng, Detection of low levels of *Escherichia coli* in fresh spinach by surface plasmon resonance spectroscopy with a TMB-based enzymatic signal enhancement method, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 145 (2010) 613-619.

- 107.S.D. Gür, M. Bakhshpour, A. Denizli, Selective detection of Escherichia coli caused UTIs with surface imprinted plasmonic nanoscale sensor, *Materials Science and Engineering: C*, 104 (2019) 109869.
- 108.S. Koyun, S. Akgönüllü, H. Yavuz, A. Erdem, A. Denizli, Surface plasmon resonance aptasensor for detection of human activated protein C, *Talanta*, 194 (2019) 528-533.
- 109.S. Akgöl, D. Türkmen, A. Denizli, Cu(II)-incorporated, histidine-containing, magnetic-metal-complexing beads as specific sorbents for the metal chelate affinity of albumin, *Journal of Applied Polymer Science*, 93 (2004) 2669-2677.
- 110.N. Karoonuthaisiri, R. Charlermroj, M.J. Morton, M. Oplatowska-Stachowiak, I.R. Grant, C.T. Elliott, Development of a M13 bacteriophage-based SPR detection using Salmonella as a case study, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 190 (2014) 214-220.
- 111.E. Makhneva, Z. Farka, P. Skládal, L. Zajíčková, Cyclopropylamine plasma polymer surfaces for label-free SPR and QCM immunosensing of Salmonella, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 276 (2018) 447-455.
- 112.M. Park, J. Jose, J.C. Pyun, E.coli outer membrane with autodisplayed Z-domain as a molecular recognition layer of SPR biosensor, *Procedia Chemistry*, 1 (2009) 1475-1478.
- 113.P. Singh, Surface plasmon resonance (SPR) based binding studies of refolded single chain antibody fragments, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 14 (2018) 83-88.
- 114.E. Eser, H. Ibrahim Ekiz, Antibody fragmentation technique for salmonella detection by SPR based biosensor, *Journal of Biotechnology*, 256 (2017) S21.
- 115.I. Percin, N. İdil, M. Bakhshpour, E. Yilmaz, A. Denizli, Microcontact imprinted based SPR biosensors for the detection of Salmonella paratyphi, *Journal of Biotechnology*, 256 (2017) S20.
- 116.A. Denizli, M. Alkan, B. Garipcan, S. Ozkara, E. Pişkin, Novel metal-chelate affinity adsorbent for purification of immunoglobulin-G from human plasma, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 795 (2003) 93-103.
- 117.G. Ertürk, L. Uzun, M.A. Tümer, R. Say, A. Denizli, Fab fragments imprinted SPR biosensor for real-time human immunoglobulin G detection, *Biosensors and Bioelectronics*, 28 (2011) 97-104.
- 118.H. Meredith, V. Valdramidis, B.T. Rotabakk, M. Sivertsvik, D. McDowell, D.J. Bolton, Effect of different modified atmospheric packaging (MAP) gaseous combinations on Campylobacter and the shelf-life of chilled poultry fillets, *Food Microbiology*, 44 (2014) 196-203.

119. J.I.A. Rashid, V. Kannan, M.H. Ahmad, A.A. Mon, S. Taufik, A. Miskon, K.K. Ong, N.A. Yusof, An electrochemical sensor based on gold nanoparticles-functionalized reduced graphene oxide screen printed electrode for the detection of pyocyanin biomarker in *Pseudomonas aeruginosa* infection, *Materials Science and Engineering: C*, 120 (2021) 111625.
120. Z. Zhong, R. Gao, Q. Chen, L. Jia, Dual-aptamers labeled polydopamine-polyethyleneimine copolymer dots assisted engineering a fluorescence biosensor for sensitive detection of *Pseudomonas aeruginosa* in food samples, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 224 (2020) 117417.
121. X. Shi, J. Zhang, F. He, A new aptamer/polyadenylated DNA interdigitated gold electrode piezoelectric sensor for rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa*, *Biosensors and Bioelectronics*, 132 (2019) 224-229.
122. R. Sarkar, C. Anil Kumar, P. Kumbhakar, T. Mandal, Aqueous synthesis and antibacterial activity of Silver nanoparticles against *pseudomonas putida*, *Materials Today: Proceedings*, 11 (2019) 686-694.
123. R. Gao, Z. Zhong, X. Gao, L. Jia, Graphene Oxide Quantum Dots Assisted Construction of Fluorescent Aptasensor for Rapid Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in Food Samples, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (2018) 10898-10905.
124. H. Wang, Z. Chi, Y. Cong, Z. Wang, F. Jiang, J. Geng, P. Zhang, P. Ju, Q. Dong, C. Liu, Development of a fluorescence assay for highly sensitive detection of *Pseudomonas aeruginosa* based on an aptamer-carbon dots/graphene oxide system, *RSC Advances*, 8 (2018) 32454-32460.
125. A. Cernat, M. Tertis, I. Gandouzi, A. Bakhrouf, M. Suciu, C. Cristea, Electrochemical sensor for the rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* siderophore based on a nanocomposite platform, *Electrochemistry Communications*, 88 (2018) 5-9.
126. A.S. Kushwaha, A. Kumar, R. Kumar, M. Srivastava, S.K. Srivastava, Zinc oxide, gold and graphene-based surface plasmon resonance (SPR) biosensor for detection of *pseudomonas* like bacteria: A comparative study, *Optik*, 172 (2018) 697-707.
127. N. Kim, I.-S. Park, D.-K. Kim, Characteristics of a label-free piezoelectric immunosensor detecting *Pseudomonas aeruginosa*, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 100 (2004) 432-438.
128. J. Hu, K. Fu, P.W. Bohn, Whole-Cell *Pseudomonas aeruginosa* Localized Surface Plasmon Resonance Aptasensor, *Analytical Chemistry*, 90 (2018) 2326-2332.

- 129.F. Melaine, M. Saad, S. Faucher, M. Tabrizian, Selective and High Dynamic Range Assay Format for Multiplex Detection of Pathogenic *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, and *Legionella pneumophila* RNAs Using Surface Plasmon Resonance Imaging, *Analytical Chemistry*, 89 (2017) 7802-7807.
- 130.S. Ellairaja, N. Krithiga, S. Ponmariappan, V.S. Vasantha, Novel Pyrimidine Tagged Silver Nanoparticle Based Fluorescent Immunoassay for the Detection of *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65 (2017) 1802-1812.
- 131.G. Kaur, T. Raj, N. Kaur, N. Singh, Pyrimidine-based functional fluorescent organic nanoparticle probe for detection of *Pseudomonas aeruginosa*, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13 (2015) 4673-4679.
- 132.A. Verma, A. Prakash, R. Tripathi, Performance analysis of graphene based surface plasmon resonance biosensors for detection of pseudomonas-like bacteria, *Optical and Quantum Electronics*, 47 (2015) 1197-1205.
- 133.J. Cai, C. Yao, J. Xia, J. Wang, M. Chen, J. Huang, K. Chang, C. Liu, H. Pan, W. Fu, Rapid parallelized and quantitative analysis of five pathogenic bacteria by ITS hybridization using QCM biosensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 155 (2011) 500-504.
- 134.P. Gavlasova, G. Kuncova, L. Kochankova, M. Mackova, Whole cell biosensor for polychlorinated biphenyl analysis based on optical detection, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62 (2008) 304-312.