

ÇOKLU ENZİM ESASLI BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Alp YÜCEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

2013

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇOKLU ENZİM ESASLI BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

ALP YÜCEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. AYTEN SAĞIROĞLU

EDİRNE-2013

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU
Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Kimya Anabilim Dalında bir Yüksek lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):

İmza

Doç. Dr. Figen İNCEOĞLU

Doç. Dr. Hülya YAĞAR

Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU

Tarih: 19 / 06 / 2013

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA YÜKSEK LİSANS/DOKTORA PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

19 / 06 / 2013
Alp YÜCEL

Yüksek Lisans Tezi
Çoklu Enzim Esaslı Biyosensör Geliştirilmesi
T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Günümüzde trigliseridlerin tayininde titrimetrik, kromatografik ve enzimatik birçok yöntem kullanılmaktadır. Ancak bunlar özel ekipmanlar, uzman personel gerektiren zaman alıcı sistemlerdir. Biyosensörler, analitik ölçüm sistemlerinin, enzimler gibi biyolojik malzemelerle birleşmesinden oluşan biyoanalitik cihazlardır. Biyosensörler, tayin edilebilecek maddeler açısından ekonomik, pratik, hassas ve spesifik ölçümlere imkan vermelerinden dolayı trigliseridlerin analizlerinde diğer yöntemlere göre daha avantajlıdır.

Bu çalışma kapsamında, transferazlardan Gliserol kinaz, oksidoreduktazlardan Gliserol-3-fosfat oksidaz ve hidrolazlardan Lipaz enzimleri kullanılarak, seçilen immobilizasyon materyalleri ile hazırlanan üç enzimli biyosensörün optimizasyon, karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi ve uygulanabilirliği incelendi.

Üç enzimin ön denemelerle belirlenen miktarlarını kapsayan fosfat tamponundaki karışıma Adenozin Trifosfat (ATP) eklenerek camı karbon elektrot yüzeyine jelatin, sığır serum albumini (BSA) matriksleri ve glutaraldehit çapraz bağlayıcısı yardımıyla tutuklandı. Böylece elektrot yüzeyinde biyoaktif tabaka elde edildi. Hazırlanan çoklu enzim biyosensörü (ÇEB) için substrat olarak 100 mM, pH 7.0 fosfat tamponu içinde gum arabik ve triton X-100 varlığında triolein çözeltisi hazırlandı.

Hazırlanan ÇEB'in biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyon çalışmalarında; jelatin ve BSA miktarları ve glutaraldehit yüzdesi optimum değerleri sırasıyla 1.5 mg/cm², 1 mg/cm² ve % 2.5 olarak belirlendi. ÇEB'in reaksiyon koşullarının optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 7.0 ve 40 °C olarak tayin edildi. Hazırlanan ÇEB'in triolein substratı kullanılarak, lineer tayin aralığı, değişen substrat derişimine karşı belirlenen akım şiddeti (ΔI) farkı ile hazırlanan kalibrasyon grafiğinden bulundu. Optimizasyon ve karakterizasyonu tamamlanan ÇEB'in trigliserid tayininde kullanılabilirliği test edildi.

Yıl: : 2013

Sayfa sayısı : 66

Anahtar Kelimeler : Lipaz, Gliserol kinaz, Gliserol 3-fosfat oksidaz, Çoklu enzim biyosensörü, Triolein

Master Thesis
Development of multi enzyme based biosensor
Trakya University Institute of Natural Sciences
Chemistry

ABSTRACT

Nowadays, there are several titrimetric, chromatographic and enzyme based methods used for the determination of triglycerides. However these systems require special equipments, experienced personel and takes much time.

Biosensors are bioanalytical devices which are the combination of analytical instruments and biological materials like enzymes. Biosensors are more advantageous than other methods because of their capability of economical, practical and specific determination of triglycerides.

In this master thesis, characherization, optimization and operationability of the three-enzyme biosensor which is prepared with glycerol kinase from transferases, glycerol-3-phosphate oxidase from oxidoreductases and lipase from hydrolases with the help of chosen immobilization materials, are studied.

Adenosine triphosphate (ATP) was added to the mixture of three enzymes in phosphate buffer which were pre-studied for their amounts and then immobilized on to the surface of glassy carbon electrode with the help of gelatin, bovine serum albumin (BSA) and glutaraldehyde crosslinker. Bioactive layer was created in the end of this process. Triolein solution was prepared in 100 mM pH 7.0 phosphate buffer in the presence of gum arabic and triton X-100 as a substrate for the multi enzyme biosensor (MEB).

In the optimization studies for the bioactive layer components of the prepared MEB, the optimum amounts of gelatin, BSA and glutaraldehyde was calculated as 1.5 mg/cm², 1 mg/cm² and % 2.5 respectively. Optimum pH and temperature of the reaction of MEB was determined as 7.0 and 40 °C, respectively. Lineer range of triolein for the prepared MEB was found from the calibration graphic between several substrate concentration and Δ Current. After optimization and characherization of the MEB, its operationability in triglycerides was also tested.

Year : 2013

Number of Pages : 66

Keywords : Lipase, Glycerol kinase, Glycerol 3-phosphate oxidase, Multi enzyme biosensor, Triolein

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden tecrübesini ve bilgisini esirgemeyen, çok değerli sayın hocam Prof. Dr. Ayten Sağıroğlu'na teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca bana çalışmamın her aşamasında yardımcı olup yol gösteren ağabeyim Arş. Gör. Dr. Hakkı M. Özcan'a ve laboratuvar arkadaşlarıma,

Bugünleri görmemde bana en büyük katkıyı sağlamış olan ve benden maddi manevi hiçbir desteği esirgemeyen anneme ve babama,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Bu çalışma, TÜBAP 2012/195 no'lu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
SİMGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
BÖLÜM 1.....	1
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.....	3
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. Biyosensörler.....	3
2.1.1. Biyosensörlerin Yapısı Ve Fonksiyonu.....	3
2.1.2. Biyobileşenler.....	4
2.1.2.1. Enzim Biyosensörleri.....	5
2.1.2.2. Doku Biyosensörleri.....	5
2.1.2.3. Mikrobiyal Biyosensörler.....	6
2.1.2.4. DNA Biyosensörleri.....	7
2.1.2.5. İmmüno-sensörler.....	7
2.1.3. Fiziksel Bileşenler.....	8
2.1.3.1. Elektrokimya Temelli Biyosensörler.....	8
2.1.3.1.1. Amperometrik Biyosensörler.....	9
2.1.3.1.2. Potansiyometrik Biyosensörler.....	10
2.1.3.1.3. Yarı İletken Temelli Biyosensörler.....	10
2.1.3.2. Optik Temelli Biyosensörler.....	10
2.1.3.3. Piezoelektrik Temelli Biyosensörler.....	10
2.1.3.4. Kalorimetri Temelli Biyosensörler.....	11
2.1.4. Biyobileşenlerin İmmobilizasyonu.....	11
2.1.4.1. Biyosensörlerde Aranan Özellikler.....	13
2.1.5. Biyotabaka Bileşenleri.....	15
2.1.5.1. İmmobilizasyonda Kullanılan Enzimler.....	15

2.1.5.1.1. Lipaz.....	15
2.1.5.1.1.1. <i>Candida rugosa</i> Lipazı.....	16
2.1.5.1.2. Gliserol Kinaz.....	18
2.1.5.1.3. Adenozin 5'-Trifosfat.....	19
2.1.5.1.4. Gliserol 3-fosfat Oksidaz.....	20
2.1.5.3. İmmobilizasyon Materyalleri.....	20
2.1.5.3.1. Jelatin.....	20
2.1.5.3.2. Glutaraldehit.....	21
2.1.5.3.3. Sığır Serum Albumini (BSA).....	22
2.2. Triglicerid Substratları ve Yüzey Aktif Maddeler.....	23
2.2.1. Gum Arabik (Arap Zamkı).....	24
2.2.2. Triton X-100.....	24
BÖLÜM 3.....	25
MATERYAL VE METOTLAR.....	25
3.1. Materyaller.....	25
3.1.1. Kimyasal Maddeler.....	25
3.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	25
3.1.3. Hazırlanan Çözeltiler.....	25
3.1.3.1. Substrat Çözeltilerinin Hazırlanması.....	26
3.1.3.2. Enzim Çözeltilisinin Hazırlanması.....	26
3.2. Metotlar.....	27
3.2.1. Biyosensörün Çalışma Prensibi.....	27
3.2.2. Biyosensör Hazırlanması.....	28
3.2.3. Biyosensörün Ölçüm Prosedürü.....	30
3.2.4. ÇEB'in İmmobilizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu.....	33
3.2.4.1. Biyosensör Cevabına Jelatin Miktarının Etkisi.....	33
3.2.4.2. Biyosensör Cevabına Glutaraldehit Yüzdesinin Etkisi.....	33
3.2.4.3. Biyosensör Cevabına BSA Miktarının Etkisi.....	34
3.2.5. Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonu.....	34
3.2.5.1. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi.....	34
3.2.5.2. Optimum pH'ın Belirlenmesi.....	35
3.2.5.3. Optimum Tampon Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	35

3.2.6. Biyosensörün Karakterizasyonu	35
3.2.6.1. Biyosensörün Lineer Ölçüm Aralıkları.....	35
3.2.6.2. Biyosensörün İşlem Kararlılığı.....	36
3.2.6.3. Biyosensör Cevabının Tekrarlanabilirliği.....	36
BÖLÜM 4	37
DENEY SONUÇLARI VE BULGULAR	37
4.1. Biyosensörün Hazırlanma Koşullarının Optimizasyonuna Ait Bulgular	37
4.1.1. Biyosensör Cevabına Jelatin Miktarının Etkisi.....	37
4.1.2. Biyosensör Cevabına Glutaraldehit Yüzdesinin.....	38
4.1.3. Biyosensör Cevabına BSA Miktarının Etkisi Etkisi.....	39
4.2. Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonuna Ait Bulgular	40
4.2.1. Optimum Sıcaklık.....	40
4.2.2. Optimum pH.....	41
4.2.3. Optimum Tampon Konsantrasyonu.....	41
4.3. Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	42
4.3.1. Trioleinin Lineer Çalışma Aralıkları.....	42
4.3.2. Biyosensörün İşlem Kararlılığı.....	43
4.3.3. Biyosensör Cevabının Tekrarlanabilirliği.....	44
BÖLÜM 5	45
SONUÇLAR VE TARTIŞMA	45
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	55

SİMGELER DİZİNİ

ATP	: Adenozin trifosfat
BSA	: Sığır serum albumini (Bovine Serum Albumin)
ÇEB	: Çoklu enzim biyosensörü
GPO	: Gliserol 3-fosfat oksidaz
GK	: Gliserol Kinaz
LP	: Lipaz
MEB	: Multi enzyme biosensor
TG	: Trigliserid
TO	: Triolein
U	: Ünite

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi.....	3
Şekil 2.2. Enzim biyosensörünün çalışma ilkesi.....	9
Şekil 2.3. İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi.....	12
Şekil 2.4. Kobay pankreatik lipazının 3 boyutlu yapısı.....	15
Şekil 2.5. <i>C. rugosa</i> 'nın üç boyutlu yapısı.....	17
Şekil 2.6. Lipazların genel hidroliz reaksiyonu.....	18
Şekil 2.7. GK enziminin katalizlediği fosfat transferi.....	18
Şekil 2.8. Adenozin trifosfatın yapısı.....	19
Şekil 2.9. Gliserol 3-fosfatın DHAP'a yükseltgenmesi.....	20
Şekil 2.10. Jelatinin yapısı.....	21
Şekil 2.11. Glutaraldehitin formülü.....	22
Şekil 2.12. BSA'nın üç boyutlu yapısı.....	23
Şekil 3.1. Biyosensör biyotabakasında oluşan reaksiyonların mekanizması.....	28
Şekil 3.2. Camsı karbon elektrot üzerine tutuklanmış çoklu enzim sistemi.....	30
Şekil 3.3. Reaksiyonda kullanılan elektrotların dizilimi.....	31
Şekil 3.4. ÇEB ile hazırlanan düzenek.....	32
Şekil 4.1. Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	37
Şekil 4.2. Biyosensör cevabına glutaraldehit yüzdesinin etkisi.....	38
Şekil 4.3. Biyosensör cevabına BSA miktarının etkisi.....	39
Şekil 4.4. ÇEB'in sıcaklık - bağıl aktivite (%) grafiği.....	40
Şekil 4.5. ÇEB'in pH - bağıl aktivite (%) grafiği.....	41
Şekil 4.6. ÇEB'in optimum tampon konsantrasyonu grafiği.....	42
Şekil 4.7. ÇEB için trioleinin lineer çalışma aralıkları grafiği.....	43
Şekil 4.8. ÇEB'in işlem kararlılığı.....	43

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Biyosensör bileşenlerinin içeriği.....	4
Tablo 3.1. Substratların hazırlanma prosedürü.....	26
Tablo 3.2. Biyosensörün hazırlanma prosedürü.....	29
Tablo 4.1. ÇEB'in deney sonuçlarının tekrarlanabilirliği.....	44

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Tüm canlılar yaşadıkları ortamdaki değişimleri algılayıp yaşamlarını devam ettirebilmek için değişimlere ayak uydurmak zorundadırlar. Bu algılama mekanizması biyosensörlerin in vitro (hücre dışı) uygulamaları için temel oluşturmuştur [1].

Canlılarla ilgili mesajları algılamayı sağlayan sistemlerin, fiziksel analiz sistemleriyle birleştirilmesiyle biyosensörler oluşur. Biyosensörler fizikokimyasal analiz sistemleri ve biyolojik materyallerin birleştirilmesi ile oluşan analitik sistemlerdir. Biyosensörlerde biyolojik sistemin yüksek spesifikliği ile fiziksel analiz sisteminin tayin duyarlılığı birleştirilmiştir. Çok sayıda biyoorganik molekül ve bazı inorganik moleküllerin analizinde kullanmak amacı ile birçok biyosensör geliştirilmiştir. Günümüzde biyosensörler, özellikle sağlık başta olmak üzere; çevresel analizlerde, askeri sahada, gıda, farmasötik ve kimya endüstrilerinde kullanılmaktadır [2].

Clark ve Lyons'un 1962 yılında kan örneklerindeki glukoz konsantrasyonunun belirlenmesi için fiziksel ölçüm sistemi olarak amperometrik oksijen elektrodunu ve algılayıcı sistemi olarak glukoz oksidaz enzimini kullanarak hazırladıkları sistem, tanımlanan ilk biyosensördür [3]. Canlı yaşamının önemli unsurlarından olan görme, işitme, tat alma, koklama, dokunma gibi algılama mekanizmaları, doğal ve en mükemmel biyosensörük sistemler olarak düşünüldükleri için biyosensör çalışmalarına güzel örnekler oluşturmaktadırlar. Klasik elektrokimya ile sadece katyon ve anyonları belirleyen sensörler hazırlanabilirken, sisteme biyomateryalin de katılmasıyla diğer birçok maddenin tayini de mümkün hale gelmiştir.

Biyosensörler; tıp, tarım, gıda, eczacılık, çevre kirliliği ve birçok endüstriyel aktivitede özellikle otomasyon, kalite kontrolü, durum tespiti ve enerji saklanması çok önemli rol oynarlar. Ayrıca, gıda maddeleri, metabolitler, vitaminler, antibiyotikler, ilaçlar gibi organik maddeler, bazı anorganik bileşikler, enzimler, virüsler ve mikroorganizmaların tayinlerinde de kullanılırlar [4].

Yağ asitleri ve gliserolün birleşmesiyle oluşan trigliseridler doğal yağlar olarak da tanımlanabilirler ve bitkisel ve hayvansal yağların ana bileşenini oluştururlar. Hayvansal trigliseridler, oda koşullarında katı halde bulunurken bitkisel olan trigliseridler oda koşullarında sıvı görünümde olurlar. Trigliseridler deri tabakasının hemen altında oluşur. Oluşumları günlük enerji ihtiyacının karşılanmasından sonra geriye kalan maddelerin depolanması şeklinde gerçekleşir. Karaciğer bölgesinde üretilmekte olan trigliseridler, bağırsağın emdiği besinlerin esterleşmesi sonucunda meydana gelir. Vücudumuzda besin ve enerjinin depo şekli olan trigliseridler vücuda alınan ancak yakılamayan besinlerin fazlalarından, organların etrafında ve deri altında biriktirilerek oluşturulurlar. Canlılarda deri altında birikerek vücut ısısının korunmasını sağladıkları gibi organların etrafında birikmeleri ve bu organların darbelerden daha az etkilenmelerini sağlamaları, iyi bir enerji deposu olmaları ve bazı vitaminlerin depo edilmelerinde önemli görev üstlenmelerinin yanısıra trigliseridler fazla alındıklarında ise bazı metabolik aksaklıklara, ateroskleroz ve dolayısıyla koroner kalp hastalıklarına da sebep olurlar. Bu sebeple insan kanındaki trigliseridlerin miktarını tespit edebilmek çok önemlidir.

Bu yüksek lisans tezi çalışmasının amacı; trigliseridlerin hidrolizinden sorumlu birbirine bağlı olarak çalışan enzim sistemlerinin kullanımıyla trigliserid tayinine yönelik kolay, ucuz, pratik uygulama olanaklı, güvenilir ve hassas çoklu enzim esaslı biyosensör hazırlanması, optimizasyonu, karakterizasyonu ve örneklerde TG tayininde uygulanabilirliğinin incelenmesidir.

BÖLÜM 2

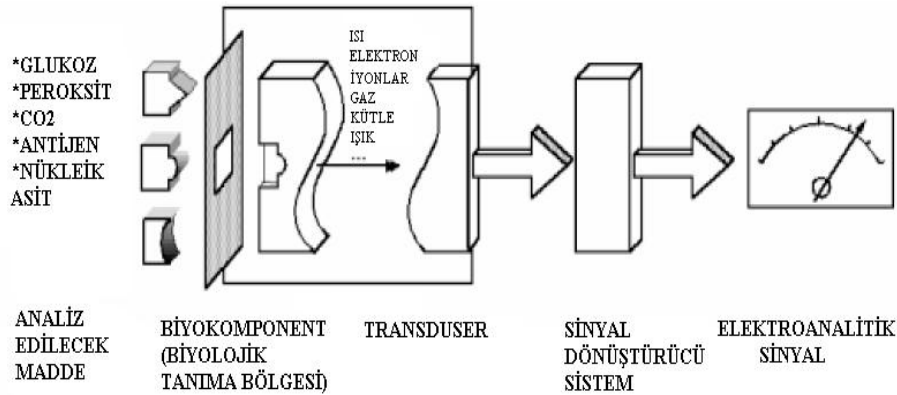
KURAMSAL TEMELLER

2.1. Biyosensörler

2.1.1. Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonu

Biyosensörler biyobileşenler ile fiziksel bileşenlerden oluşurlar ve temel olarak; analiz edilecek maddenin biyosensör yüzeyindeki biyobileşenle etkileşime girmesi sonucu, fiziksel bileşen (transduser) yüzeyinde analit miktarıyla orantılı bir sinyalin oluşumu ve bu sinyalin ölçüm cihazına iletilmesi ilkesine dayanır.

Biyosensörlerde biyobileşen olarak enzimler, mikroorganizmalar, bitkisel ve hayvansal dokular, reseptörler, antikorlar ve nükleik asitler kullanılabilir. Analiz edilecek moleküle uygun olarak bir biyobileşen ve analitin dönüşümü sonucunda oluşan elektrokimyasal, optik ya da gravimetrik sinyali elektriksel sinyale çeviren uygun bir transduser seçilmelidir. Transduser ve biyobileşen birbirine uygun fiziksel ya da kimyasal yöntemle bağlanabilir [5]. Şekil 2.1’de bir biyosensör sisteminin birimleri şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi [6]

Günümüzde biyosensörler; biyobileşen ve transduser olarak pek çok farklı maddeyi ve sistemi içermektedir. Bunların en önemli olanları Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1. Biyosensör bileşenlerinin içeriği

Analit	Biyobileşen	Sinyal İletici Sistem
Metaller		Elektrokimyasal Esaslı
Hormonlar	Enzimler	Amperometri
Enzim - Koenzimler	Antikorlar	Potansiyometri
Substrat	Hücre - doku kesitleri	Yarı iletken esaslı
Aktivatör – İnhibitör	Mikroorganizmalar	Optik esaslı
Antikor- Antijen	Nükleik asitler	Fotometri esaslı
Nükleik asit	Lipidler	Fluorometri esaslı
Mikroorganizmalar	Hücre organelleri	Biyoluminesans
Virüsler	Reseptörler	Piezoelektrik
		Kuartz kristal mikrobals

2.1.2. Biyobileşenler

Biyosensörlerin yapısında yer alan biyobileşenler genellikle biyoreseptör olarak adlandırılır. Bunların içinde en yaygın olarak kullanılanları enzimler ve antikorlardır. Enzim-substrat ve antikor-antijen arasındaki etkileşimin ilk adımı analitlerin protein moleküllerine bağlanmasıdır. Hidrolazlar dışındaki enzimler koenzim yokluğunda sadece substratı kendilerine bağlarlar. Aynı durum inhibitörler için de geçerlidir. Son yıllarda geliştirilen katalitik antikorlar yalnızca antikoru bağlamakla kalmaz kimyasal bir dönüşümü de katalizlerler. Tek bir enzimle istenilen maddenin analizi gerçekleştirilemiyorsa ikili veya üçlü enzim sistemlerinin biyolojik bileşen olarak birlikte kullanılmasıyla bienzim ve multienzim sistemleri oluşturulur. Örneğin; kreatinin amino hidrolaz, kreatin amino hidrolaz ve sarkonin hidrolaz, kreatinin tayini için, L-malat dehidrojenaz ve salisilat hidrolaz malat tayini için ve glukoz-6-fosfat dehidrojenaz ve salisilat hidrolaz, glukoz-6 fosfat tayini için birlikte kullanılmıştır [7].

2.1.2.1. Enzim Biyosensörleri

Biyosensör teknolojisinin tarihsel geçmişine bakıldığında bu alandaki ilk çalışmaların enzim sensörleriyle başladığı görülmektedir. 1962’de Clark ve Lyons ve 1967’de Updike ve Hick tarafından rapor edilen glukoz tayinine yönelik “glukoz oksidaz enzim elektrodları” bu konudaki ilk örnekleri oluşturmaktadır. Biyosensör hazırlamada enzimleri kullanmak; spesifiklik bakımından avantajlı ancak saf enzimin pahalı oluşu da dezavantajlıdır.

Temel bilimlerdeki ilerlemeler enzimlerin yanı sıra diğer biyolojik materyallerin fonksiyonlarının da çok daha ayrıntılı bir şekilde ortaya çıkarılmasına imkân vermiştir. Bu ilerlemelerin doğal bir sonucu olarak farklı biyolojik materyallerin ve iletim sistemlerinin kombinasyonuyla çok çeşitli biyosensörler geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam edilmektedir. Bugünkü sonuca bakıldığında, hangi temel iletim sistemi söz konusu olursa olsun pratik ve ticari uygulamalarda enzim elektrotlarının büyük bir üstünlüğü göze çarpmaktadır. Ancak elektrokimyasal esaslı olanların tartışılmaz bir ağırlığı söz konusudur. Bu sonuçtaki canlı sistemlerle ilgili en büyük etmen hemen hemen her türlü maddenin doğrudan veya dolaylı olarak analizinde kullanılabilecek binlerce enzimin varlığıdır. Bilinen enzimlerin yanı sıra bilinmeyenlerin potansiyel varlığı, piyasada yüzlerce ticari enzim preparatının bulunabilirliği ve bu sayının her geçen gün yükselmesi enzim sensörlerinin tartışılmaz üstünlüğünün devam edeceğinin bir göstergesidir [1, 2].

2.1.2.2. Doku Biyosensörleri

1981’de ilk defa bitki dokusu temelli elektrot hazırlanmasından itibaren, birçok bitki dokusu temelli biyosensör geliştirilmiştir. Bitki doku materyalleri kullanılarak oluşturulan biyosensörler, izole enzimlerle oluşturulan biyosensörlere bir alternatiftir [8]. Hayvansal ve bitkisel dokuların ve organellerin kimi enzimlerce özellikle zengin olduğu bilinmektedir. İşte bu enzimlerin izole edilmiş preparatları yerine doğrudan yoğun buldukları bu kaynaklar biyosensör hazırlanmasında kullanılır [1].

Doku biyosensörlerinde enzimin saflaştırılması gerekliliği ortadan kalkar, ayrıca doku biyosensörleri bazı enzimler için doğal ortamda artan kararlılık ve düşük maliyet gibi avantajlara sahiptirler [9].

Doku kesitleri kullanıldığında biyosensörün cevap süresi genellikle uzundur. Bu süreyi kısaltmak için direkt doku kesiti yerine doku ezilerek veya iyice homojenize edilerek hazırlanır. Böylece difüzyon problemi de azaltılmış olur [1].

2.1.2.3. Mikrobiyal Biyosensörler

Saflaştırılmış enzimler yüksek spesifik aktivitede olmalarına rağmen pahalı ve kararsız olmaları biyosensör alanında uygulamalarını sınırlandırmaktadır. Mikroorganizmalar ise biyosensörlerin biyoaktif tabaka materyalleri olarak pek çok avantaja sahiptirler.

Bugün bir *Esheria coli* hücresinde bile 3000'den fazla enzim bulunduğu kabul edilmektedir. Gelişmiş hücrelerdeki enzim sayısının çok daha fazla olacağı açıktır. Saf enzimlerle gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonları elbette bu enzimi içeren hücre ile de gerçekleştirilebilir. Bunun için ana koşul hedeflenen biyotransformasyon reaksiyonunun hücrenin içerdiği diğer enzimler tarafından etkilenmemesidir. Şimdiye kadar bilinen enzimlerin % 90'ından fazlası hücre içidir. Bu bakımdan, hücre içi enzimlerin kaynağı olarak bütün hücrelerin kullanımı, çeşitli endüstriyel işlemlerde saflaştırılmış enzimlere daha iyi bir alternatif olarak gösterilmektedir. Biyosensörlerde enzim kaynağı olarak mikroorganizmaların kullanımı enzim saflaştırılmasının uzun ve pahalı işlemlerini gerektirmez, enzimler doğal çevresinden ayrılmadığından daha uzun süre aktivitelerini kaybetmeden durabilir ve ağır metaller gibi dıştan gelen toksiklerin inaktivasyonundan korunurlar. Ancak mikroorganizmaların bütün hücreler olarak kullanıldığı biyosensörler, enzim esaslı biyosensörlerle karşılaştırıldığında daha yavaş biyosensör cevabı vermektedir. Bunun sebebi hücre çeperi boyunca analitin ve ürünlerin difüzyonudur. Analitlerin hücre zarından difüzyonunu önleme yollarından biri geçirgen hücreler kullanmaktır. Bu hücreler, donma ve erime gibi fiziksel, organik çözücüler ve temizleyiciler ile kimyasal ve lizozim ya da yün kreatini ile enzimatik yollarla geçirgen hale getirilebilirler. En yaygın yöntem, toluen, kloroform, etanol ve bütanol gibi organik çözücüler veya Na deoksikolat, digitonin gibi yüzey aktif maddeler kullanarak kimyasal yolla hücreleri geçirgen hale getirmektir. Bu gibi kimyasal muameleler, hücre membranlarından lipidlerin bazılarının uzaklaştırılmasıyla çok küçük porlara yol açar, hücrenin iç kısmındaki enzimler gibi makromoleküller bileşiklerin önemlilerini tutarken hücre

membranındaki küçük moleküller analitlerin serbest difüzyonuna izin verir. Ancak bu yollarla hücre zarının daha geçirgen hale getirilmesi hücreye zarar verebilir ama yine de hücre içi enzimlerin kaynağı olarak kullanılabilirler [10].

Mikrobiyal biyosensörlerde ölçümün esası, mikroorganizmaların ölçümü yapılacak olan analiti bir karbon kaynağı olarak enzimleriyle metabolize ederek solunum aktivitesinin ölçülmesi esasına dayanır. Bu nedenle çözünmüş oksijen elektrodu mikrobiyal sensörler için en yaygın transdüserlerdir. Bunun dışında CO₂ elektrodu, NH₃ elektrodu, cam elektrod ve termistör de kullanılmaktadır.

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

2.1.2.4. DNA Biyosensörleri

Biyosensör tasarımında kullanılan dizi tanıma yüzeyleri, analitik kimya alanında yeni ve ilgi çekicidir [11]. Bu tür tanıma yüzeyleri, sahip olduğumuz bilinen elektrokimyasal biyosensörlere yeni boyutlar kazandıracak ve gelecekte doktor gözetimindeki analizlerde önemli bir rol oynayacaktır [12].

Tanıma yüzeyi olarak DNA'nın kullanıldığı biyosensörlere DNA biyosensörleri adı verilir [13, 14]. DNA tanıma yüzeyleri, dizisi belli hibridizasyon olaylarının izlenmesinde [15,16] veya bu yüzey ile etkileşime giren analizlenecek maddelerin (karsinogen maddeler, ilaçlar, vb.) tayininde kullanılabilir [17].

2.1.2.5. İmmünosensörler

Yüksek seçicilikteki antijen-antibadi etkileşiminden yararlanılarak hazırlanan biyosensörler immünosensörlerdir. Her iki bileşik de diğerinin analizi için biyolojik bileşen olarak kullanılabilir. Bu tip sistemler antijen-antibadi etkileşimine dayandığı için mükemmel seçiciliğe sahiptirler.

İmmünojenik sensörler ile hücreler, sporlar, toksinler, mikroorganizmalar, virüsler, pestisidler ve endüstriyel kirleticiler analizlenebilir [18, 19]. İmmünosensörlerde elektrokimyasal, optik, kütle ve termal özellikli fiziksel bileşenler kullanılabilir [20].

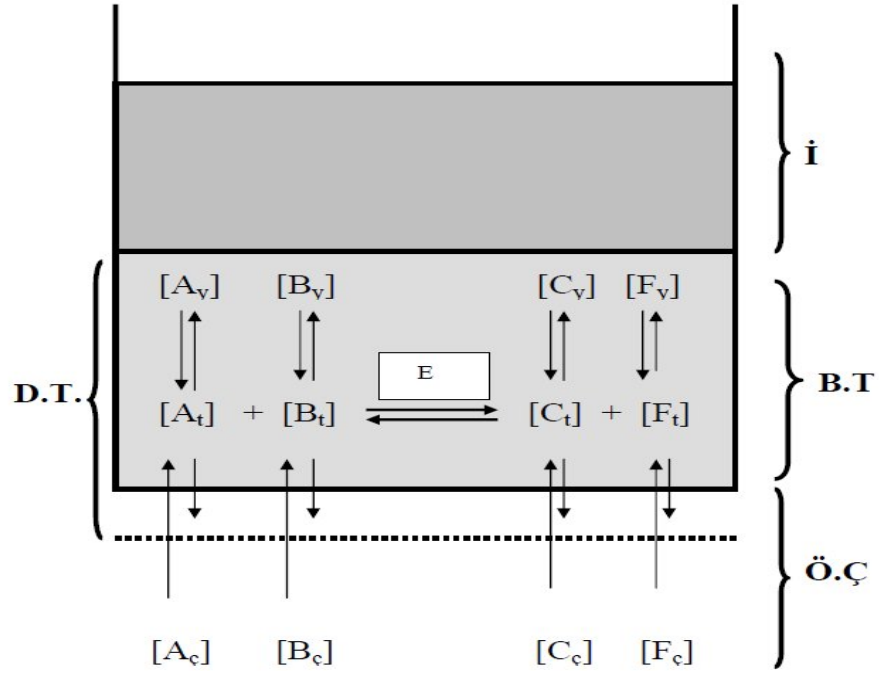
2.1.3. Fiziksel Bileşenler (transduser)

Biyolojik ve biyokimyasal sinyalleri veya cevabı belirlenebilir sinyale dönüştürebilen sistemlere transduser denir [21]. Bir substrat için bileşenin aktivitesi O₂ tüketimiyle, H₂O₂ oluşumuyla, NADH konsantrasyonundaki değişimle, floresans, absorpsiyon, pH değişimiyle, kondüktivite, sıcaklık ya da kütledeki değişimle izlenebilmektedir [22, 23]. Örneğin; O₂ elektrodunda çözülmüş oksijen, pH elektrodunda H⁺ iyonu belirlenir. Termal biyosensörlerde enerji değişimleri, piezoelektrik sensörlerde kristalin salınım rezonansının kütle yüklenimi nedeniyle değişimi, optik sensörlerde de ışık temel alınmaktadır [1].

Bu yüksek lisans konusunun tezinde; çoklu enzim sisteminin immobilizasyonuna dayanan amperometrik bir biyosensör hazırlanmıştır. Amperometri genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümü esasına dayanır. Söz konusu akım yoğunluğu çalışma elektrodunda yükseltgenen ya da indirgenen elektroaktif türlerin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak tanımlanır. İkinci elektrot referans elektrodu olarak iş görür (Ag/AgCl elektrot). Kalibrasyondan sonra akım yoğunluklarından, ilgili türlerin konsantrasyonlarının belirlenmesinde yararlanır. Üçüncü elektrot, Pt karşıt elektrottur [24, 25].

2.1.3.1. Elektrokimya Esaslı Biyosensörler

Enzim temelli biyosensörlerin pek çoğunda elektrokimyasal esaslı transduserler kullanılır. Bu transduserler ile amperometri ve/veya potansiyometri ilkelerine göre ölçümler alınabildiğinden genellikle oksidoredüktaz (elektron açığa çıkaran enzimler) sınıfı enzimler kullanılır [5]. Bir enzim biyosensörü şekil 2.2’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Enzim biyosensörünün çalışma ilkesi [2]

(A: Substrat, B: Kosubstrat veya Koenzim, C ve F: Ürünler, ç: Ölçüm çözeltisi içindeki, t: biyoaktif tabakadaki ve y: elektrot yüzeyindeki konsantrasyonlar. D.T: Difüzyon tabakası, Ö.Ç.: Ölçüm çözeltisi, B.T.: Biyoaktif tabaka, İ: İletici)

Şekilden de görüldüğü üzere A substratı elektrot yüzeyine immobilize olmuş enzim tarafından B koenziminin yardımıyla C ve F'ye dönüştürülür. Bu dönüşüm sonrasında elektrot yüzeyindeki madde konsantrasyonlarındaki farklanma iletici tarafından sinyal olarak yansıtılır.

2.1.3.1.1. Amperometrik Biyosensörler

Amperometri genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. Söz konusu akım yoğunluğu çalışma elektrodunda yükseltgenen ya da indirgenen elektroaktif türlerin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak tanımlanır. İkinci elektrot referans elektrot olarak iş görür. Kalibrasyondan sonra, akım yoğunluklarından ilgili türlerin konsantrasyonlarının belirlenmesinde yararlanır. İletici sistem olarak bir amperometrik sensörün kullanılması durumunda potansiyometrik sensörlerden en büyük fark, ürünlerden sinyal oluşturan türün elektrot yüzeyinde tüketilmesidir [2].

2.1.3.1.2. Potansiyometrik Biyosensörler

Potansiyometri bilindiği gibi en genel anlamda bir çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümünü esas alır. Elektrot potansiyelinin belirlenmesi doğrudan analit konsantrasyonunu tanımlar. Potansiyometrik biyosensörlerde kullanılan temel sensörler pH ya da tek değerlikli iyonlara duyarlı cam elektrotlar, anyon ya da katyonlara duyarlı iyon seçimli elektrotlar ve karbondioksit ya da amonyağa yönelik gaz algılayan elektrotlardır.

2.1.3.1.3. Yarı İletken Temelli Biyosensörler

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

MOSFET'lerin, gazların ölçümüne uygun hale getirilmesiyle oluşan gaz duyar sensörlerde (GASFET) adsorblanan gaz moleküllerinin disosiyasyonu ve oluşan yükün oksit tabakasına transferi temel ilkeyi oluşturur. Bu durum tabanın dielektrik sabitini değiştirerek ve drain akımda bir modifikasyona yol açarak ölçüme imkan verir.

2.1.3.2. Optik Temelli Sensörler

Optik biyosensörler iletici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle uygun bir biyomolekülün immobilize edilmesiyle hazırlanan ölçüm aygıtlarıdır.

Etkileşim sonucu meydana gelen kimyasal ya da fizikokimyasal bir değişimin ölçümünü esas alırlar. Sinyal, ışık yansımaları, saçılımı ya da yayımı sonucu meydana gelir. Örneğin optik lifin üzerine enzim immobilizasyonu ile hazırlanan optik esaslı enzim sensörleri temelde absorpsiyon, floresans, biyoluminesans gibi temel ilkeler çerçevesinde işlev görürler.

2.1.3.3. Piezoelektrik Temelli Biyosensörler

Piezoelektrik sensörler en genel anlamda karakteristik rezonans frekansındaki değişimleri belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlesinin ölçülmesi esasına göre çalışan gravimetrik aygıtlardır. Sensör seçiciliği, kristal yüzeyindeki madde ile spesifik etkileşime sahip analitin birikimiyle ilişkilidir. Sensör

yüzeyinde bir madde adsorblanmış veya biriktiğinde piezoelektrik kristalin rezonans frekansındaki değişimin ölçülmesiyle sonuca ulaşılır.

Bir piezoelektrik temelli sensörün üzerinde enzim immobilizasyonu ile gerçekleştirilen piezoelektrik enzim sensörlerinde, enzim moleküllerine substratların bağlanmasından dolayı meydana gelen kütle değişimlerinin, piezoelektrik kuartz diskin vibrasyonunda sebep oldukları farklanmadan yararlanılarak madde miktarına ulaşılır.

2.1.3.4. Kalorimetri Temelli Biyosensörler

Kalorimetri temelli enzim sensörleri, termal enzim sensörleri, enzim termistörleri ya da entalpi metrik enzim sensörleri gibi değişik isimlerle tanımlanırlar. Temel ilkeleri bir enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanarak substrat konsantrasyonunu belirlemekten oluşur. Genellikle enzimatik reaksiyonların ekzotermik doğasından yararlanır. Enzimatik reaksiyon sonucunda meydana gelen sıcaklık değişimi ile substrat konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca varılır.

Kalorimetri temelli termal biyoanalizör ile termal enzim sensörleri arasında biyosensör kavramı açısından önemli farklar vardır. Termal biyoanalizörler, yalıtılmış bir sistemde genelde biri referans olmak üzere iki immobilize enzim kolonu içerirler. Pompalar yardımıyla bir sürekli akış olayı gerçekleşir. Enzimatik reaksiyon sonucu substrat konsantrasyonuna bağlı sıcaklık değişimi termofiller yardımıyla izlenir.

2.1.4. Biyobileşenlerin İmmobilizasyonu

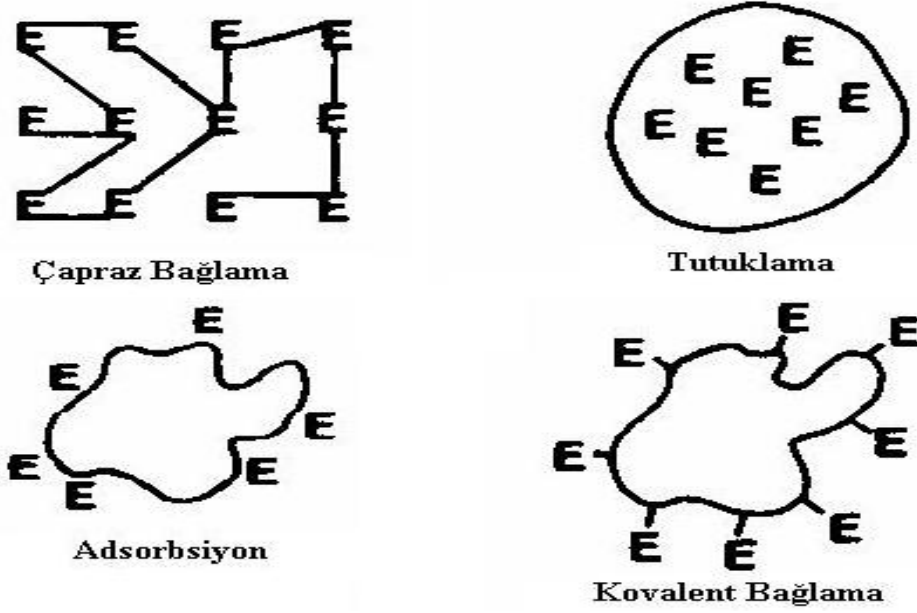
Analizlenmesi hedeflenen örneğe uygun biyobileşen ve transduser seçildikten sonra bu iki eleman birbirine bağlanmalı yani biyobileşen transduser yüzeyine immobilize edilmelidir.

İmmobilizasyon için kullanılan temel yöntemler şöyledir:

- I. Adsorpsiyon (kovalent olmayan bağlama)
- II. Kovalent Bağlama
- III. Tutuklama
- IV. Çapraz Bağlama

Bu immobilizasyon yöntemleri şematik olarak Şekil 2.3’de gösterilmiştir.

Biyosensörün ömrü immobilizasyon işlemiyle biyobileşenin transduser yüzeyinde ne kadar süre tutulabildiğine bağlı olduğundan, biyobileşenin uzun süre yüzeyden ayrılmasını engellemelidir. Enzimlerin immobilizasyonunda enzim aktif merkezi immobilizasyon esnasında zarar görmemeli ya da enzim aktivitesinde sterik engel nedeniyle düşüş olmamasına dikkat edilmelidir.



Şekil 2.3. Immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi [2].

Adsorbsiyon

Immobilizasyon için kullanılan en basit yöntemlerden biridir. Biyobileşenin transduser yüzeyine non-kovalent etkileşimler (hidrojen bağları, çoklu tuz köprüleri, elektron geçiş kompleksleri ve Van der Waals kuvvetleri) ile tutturulması prensibine dayanır. Adsorbsiyonda kullanılan başlıca adsorbanlar; selüloz, silikajel, cam, hidroksiapatit, kollajen, kil, polimerik aromatik reçinelerdir.

Tutuklama

Yüksek molekül kütleli biyomoleküller sentetik veya doğal jel matrislerde, yarı geçirgen membranlarda, misellerde ve mikro kapsüllerde tutuklanarak etkin bir şekilde immobilize edilebilirler. Jel matriste tutuklamada kullanılan başlıca malzemeler

akrilamit polimerleri, jelâtin tabakaları, nişasta, kalsiyum aljinat jelleri, silikon lastiği, polivinil klorür, polivinil alkoldür.

Çapraz Bağlama

Çapraz bağlama; küçük moleküllü bi ya da multi-fonksiyonel gruplar içeren kimyasal reaktifler kullanarak biyobileşen ile adsorban arasında çözünmeyen kompleksler oluşturma prensibine dayanır. En çok kullanılan çapraz bağlama ajanı glutaraldehitir. Glutaraldehit dışında heksametilen diizosiyanat, 2-izosiyanato-4-izotiyasiyanato-toluen, 1,5-difloro-2,4-dinitrobenzen, bisdiazobenzidin-2,2-disülfonikası gibi kimyasallarda çapraz bağlamada kullanılabilir.

Kovalent Bağlama

Kovalent bağlamının gerçekleşmesi için bağlanma yüzeyinde ve/veya biyomolekül üzerinde tiyol (-SH), hidroksil (-OH), amin (-NH₂), karbonil (-C=O), karboksil (-COOH) gibi reaktif grupların olması gerekmektedir. Bu reaktif gruplar olmadığı takdirde çeşitli manipülasyonlarla (kendiliğinden oluşan tek tabakalar, SAM vb. gibi) reaktif gruplar oluşturulabilir. Biyomolekül aktive edilmiş transduser yüzeyine bağlanabileceği gibi önceden uygun bir materyale kovalent bağlanıp immobilize biyobileşeni içeren tabaka ile transduser yüzeyinde film oluşturulabilir.

Biyobileşenlerin kovalent bağlama ile immobilizasyonu pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi değişkenlere karşı direnç sağlar ve biyosensörün ömrünü uzatır ancak biyoaktif tabakada bir miktar aktivite kaybına sebep olabilir [2, 4].

2.1.4.1. Biyosensörlerde Aranılan Özellikler

Duyarlılık: Sensörün analitteki değişime (konsantrasyon) birebir cevap vermesi demektir. Duyarlılık yüksekse analitteki birim değişim sensörün ekranında aynen gözükür.

Seçicilik: Sensörün sadece analite özgünlüğünü gösterir. Sensör başka reaktiflere ilgi göstermez ve hatalı sonuç vermez.

Ölçüm aralığı: Sensörün ölçebildiği analit konsantrasyonun aralığıdır. Analit belli bir konsantrasyondan az veya çoksa sensör iyi bir duyarlılıkta sonuç vermeyebilir.

Ölçüm süresi: Analit konsantrasyonundaki bir basamak değişime karşı sensörün vereceği son yanıtı tespit etmek için gerekli süredir. Bir tür sensörün ölçme hızını gösterir.

Tutarlılık: İdeal bir biyosensör için, elektrodun aynı koşullar altında artarda yapılan ölçümlerde hemen hemen hep aynı sonuçların okunması istenir.

Hızlı yanıt süresi: Bir biyosensör elektrodunun yanıt süresi elde edilen akım-zaman eğrilerinden anlaşılabilir. Örneğin elde edilen eğrilerde basamakların şekli yayvan ve geniş ise cevap zamanı uzun, tersi söz konusu ise cevap zamanı kısadır.

Tespit sınırı: Sensörün tesbit edebileceği en düşük analit konsantrasyonunu ifade eder.

Kullanım ömrü: Sensörün, performansında gözle görülür bir azalma olmadan verdiği hizmet ömrünü ifade eder.

Kararlılık: Elektrot kararlılığının yüksek olması ideal biyosensörler için gereklidir. Kararlılık, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır. Ayrıca; pH, sıcaklık, nem, O₂ derişimi gibi parametrelerden de etkilenmektedir.

2.1.5. Biyotabaka Bileşenleri

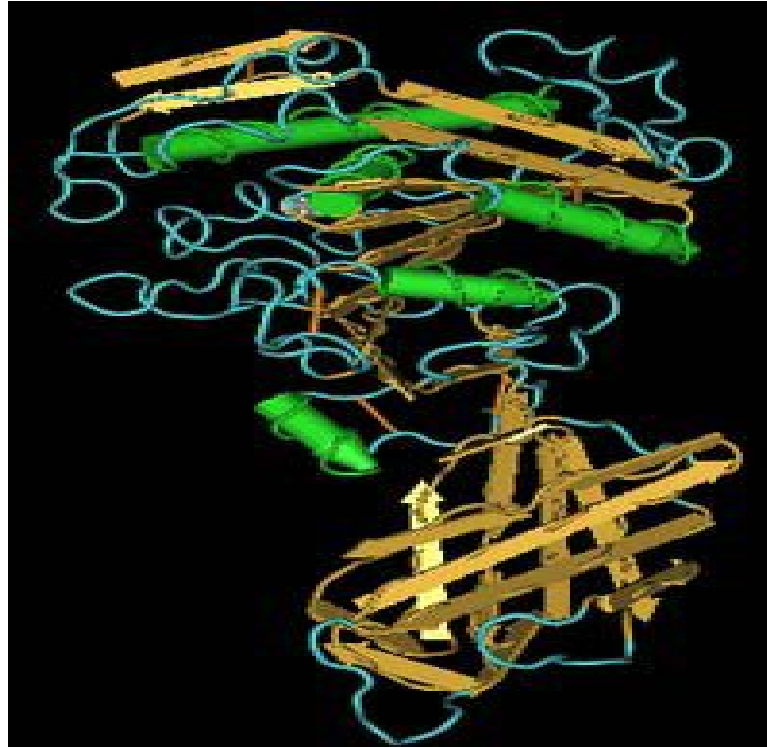
2.1.5.1. İmmobilizasyonda Kullanılan Enzimler

2.1.5.1.1. Lipazlar

Lipazlar (Triaçilgliserol hidrolaz; EC. 3.1.1.3) canlılarda, fizyolojik koşullarda, bitkisel ve hayvansal yağların hidrolizlerinden sorumlu enzimlerdir. Yağların enzimatik hidrolizleri tersinirdir ve su varlığında hidroliz yönünde, su azlığında ya da yokluğunda ise esterifikasyon yönünde reaksiyonları katalizlenmektedir [26].

Lipazlar; serin hidrolazlar sınıfı içinde yer alırlar ve bu nedenle kofaktöre ihtiyaç duymazlar. Geniş substrat spektrumları, pH, yüksek sıcaklık ve organik çözücülere karşı kararlılıkları gibi sebeplerden lipazlar, günümüzde en önemli endüstriyel biyokatalizörler arasında yer almaktadırlar. Lipazlar; hem sulu hem de susuz ortamda çalışabildiklerinden gerçekleştirilmesi zor reaksiyonların başarılmasını sağlarlar [27].

Şekil 2.4’de kobay pankreatik lipazının 3 boyutlu yapısı yer almaktadır.



Şekil 2.4. Kobay pankreatik lipazının 3 boyutlu yapısı

(<http://tr.wikipedia.org/wiki/Lipaz>)

Lipazlar, aktif konumunu koruyan sarmal bir oligopeptid birimine sahiptirler. Bu birim aynı bir yağ damlacığı gibi hidrofobik ara yüzeylerle etkileşime geçmekte ve böylece aktif merkez ile substrat daha kolay bir araya gelmektedir [26].

Çoğu lipaz bir lipit substratın gliserol omurgasının belli konumlarında etkir. İnsanlarda sindirim sisteminde yağları sindirmekten sorumlu esas enzim olan pankreatik lipaz örneğinde, enzim, yağlarda bulunan trigliseridleri karboksilik ester bağlarına etkileyerek digliseritlere, monogliseritlere, serbest yağ asitlerine ve gliserole katalizler.

Lipazlar, bitkisel, hayvansal ve doğal ya da genetik olarak iyileştirilmiş mikrobiyal kaynaklardan izole edilebilirler. Bu kaynaklar arasında en geniş uygulama alanı bulan lipazlar; mikrobiyal lipazlardır. Bunun sebebi; mikroorganizmaların kolay ve hızlı yetiştirilebilmeleri, üretimlerine ve genetiklerine de kolaylıkla müdahale edilebilmeleridir [28].

Lipaz aktivitesini ve substratlarının miktarlarını belirlemek için farklı biyosensörler geliştirilmiştir. Ancak elektrokimyasal biyosensörler, uygun saklama koşullarında çevresel faktörlerden etkilenmeden çalışma kolaylığı sağladığından daha yaygın olarak kullanılabilirdiği öngörülmektedir. Lipaz kaynağının, elektrot cinsinin, ölçüm esasının ve immobilizasyon maddelerinin cinsi ve miktarlarının reaksiyonun türüne göre optimize edilmeleri gerekir. Bazı biyosensör çalışmalarında lipazlar, elektrotlara birçok farklı immobilizasyon malzemeleri kullanılarak immobilize edilmişlerdir. Bu materyallerden bazıları; kollajen membran [29], Prusya mavisi modifiye screenprinted elektrot [30], gözenekli silikon [31], selüloz asetat [33] ve polivinil klorür (PVC) dür [32].

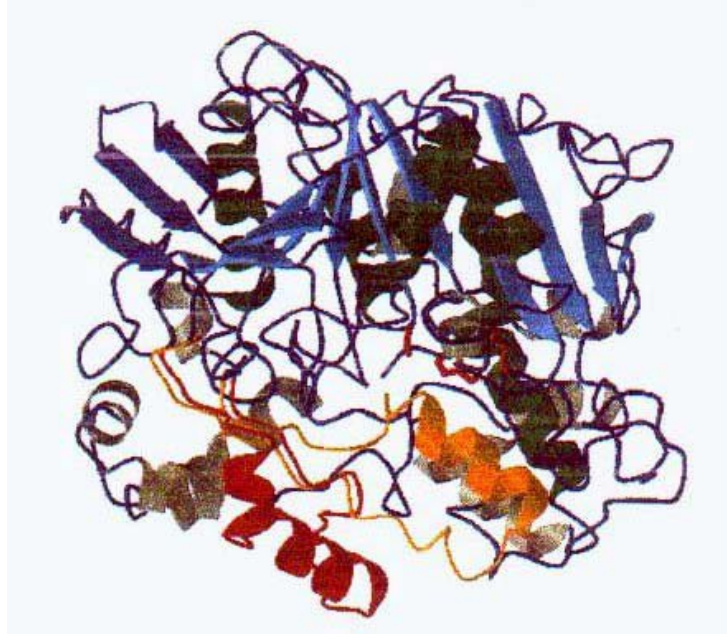
2.1.5.1.1.1. *Candida rugosa* Lipazı

Candida rugosa lipaz enzimi, *candida rugosa* mayasından elde edilen geniş çaplı uygulama alanı bulan lipazlardır. Bunun sebebi; mikroorganizmaların kolay ve hızlı yetiştirilebilmeleri, üretim ve genetiklerine kolaylıkla müdahale edilebilmeleridir. *C. rugosa* lipaz enzimi lipidlerin biyolojik dönüşümünde çok önemli bir role sahiptir. Lipazlar, lipidlerin biyolojik membranda bulunmalarından dolayı hücre içi metabolizmada görev alırlar [34].

Günümüzde lipazların ve özellikle *C. rugosa* lipazının biyotransformasyonlarda

potansiyel uygulamaları iyi belirlenmiştir. Hem sulu ortam hem de organik ortamda gerçekleştirilen reaksiyonlarda kataliz performansı yüksektir [34 - 37].

C. rugosa yaklaşık olarak 154 cins içeren *Candida* ailesi içindedir. *C. rugosa*'nın üç boyutlu yapısı Şekil 2.5'de görülmektedir.

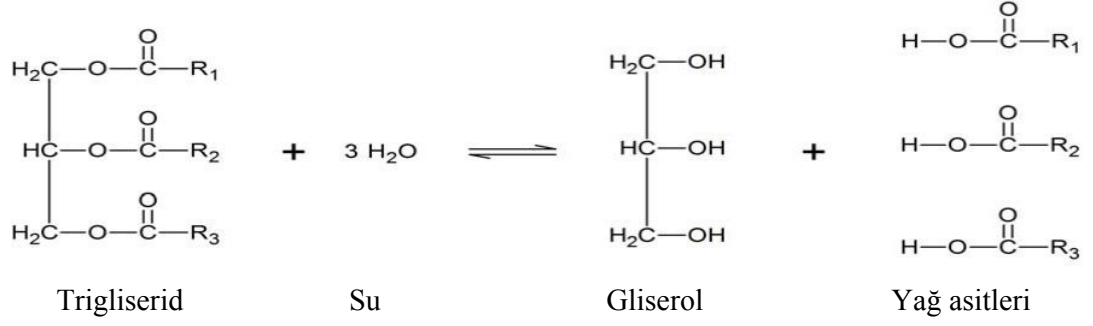


Şekil 2.5. *C. rugosa*'nın üç boyutlu yapısı.

(www.au-kbc.org)

Birçok lipaz üreten maya arasında; *C. rugosa* ticari lipaz kaynağı olarak en çok kullanılan mayadır [38]. Bu kullanımının nedeni hem sentez hem hidroliz gibi çeşitli proseslerdeki yüksek aktivitesinden dolayıdır [39].

Non-spesifik lipaz enzimleri, özellikle yüksek spesifik aktivitesiyle *C. rugosa* gliserinin hızlı hidrolizini sağlamak üzere seçilmiş olup hidroliz, esterleşme, alkoliz ve triaçilgliseridlerin ve diğer hidrofobik esterlerin transesterifikasyonu katalizleyen çok yönlü bir biyokatalizördür [40].



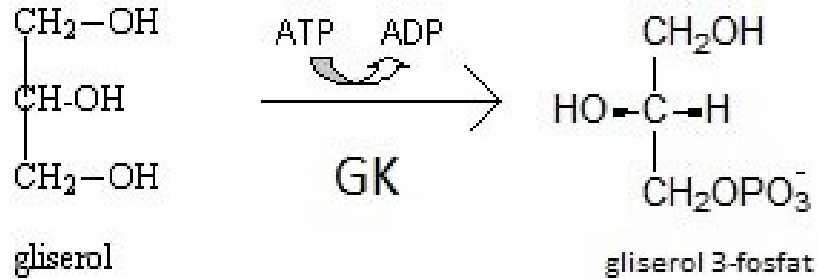
Şekil 2.6. Lipazların genel hidroliz reaksiyonu

2.1.5.1.2. Gliserol Kinaz

Gliserol kinaz (GK), trigliseridlerin ve gliserofosfolipidlerin sentezinde görev alan bir fosfotransferaz enzimidir. GK, hücre içi biyokimyasal reaksiyonlar için gereken kimyasal enerjiyi taşıyan Adenozin 5'-trifosfat (ATP) molekülünden fosfat grubunu gliserole taşıyarak gliserol 3-fosfat oluşumunu katalizler [41].

Adipoz dokular GK yokluğu çekmelerinden dolayı trigliseridlerin hidrolizi sonucu açığa çıkan gliserolu metabolize edemezler. Bunun yerine gliserol kan ile karaciğere taşınarak buradaki GK yardımıyla gliserol 3-fosfata ve devamında dihidroksiaseton fosfata (DHAP) dönüştürülür.

Şekil 2.7'de gliserol kinazın katalizinden sorumlu olduğu reaksiyon görülmektedir.



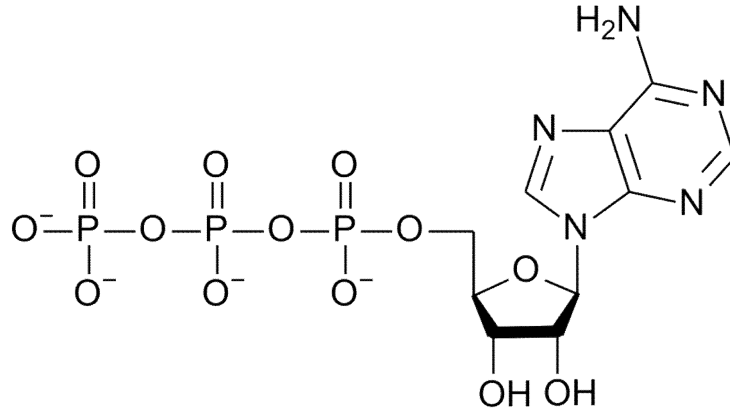
Şekil 2.7. GK enziminin katalizlediği fosfat transferi.

2.1.5.1.3 Adenozin 5'-Trifosfat

Hücre içi biyokimyasal reaksiyonlar için gereken kimyasal enerjiyi taşıyan ATP fotosentez ve hücre solunumu sırasında oluşur. ATP bunun yanı sıra RNA sentezinde gereken dört monomerden biridir. Ayrıca ATP, hücre içi sinyal iletiminde protein kinaz reaksiyonu için gereken fosfatın kaynağıdır.

ATP'nin enerjisi onun ADP'ye dönüşmesine yol açan fosfat bağının hidrolizi ile açığa çıkar. Hücre içinde çeşitli enzim, motor protein ve taşıma proteini bu enerjiyi kullanırlar. ATP'nin bozunumu ADP ve inorganik fosfat (Pi) oluşturur, ADP sonra AMP ve Pi olarak ayrıca bozunur. ATP'nin bir diğer bozunum yolu AMP + PPi şeklindedir. Hücrelerin enerji kaynağı olan ATP, biyolojik olarak aktivite gösterebilmesi için Mg^{+2} iyonuyla bir arada bulunmalıdır.

Şekil 2.10'da ATP'nin yapısı verilmiştir.



Şekil 2.8. Adenozin trifosfatın yapısı

(http://commons.wikimedia.org/wiki/File:ATP_chemical_structure.png)

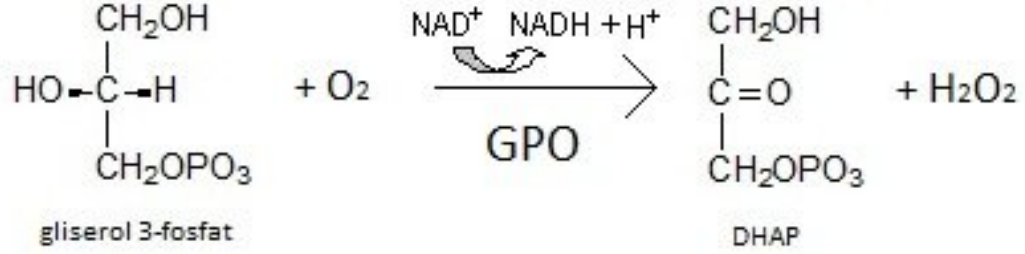
ATP'nin hücrede enerji kaynağı olarak kullanıldığı yerler kısaca şöyle sıralanabilir:

- Biyosentetik reaksiyonlarda: protein, yağ, karbonhidrat ve nükleik asidin sentezi
- Fiziksel hareketlerde: kas kasılması, stoplazmik hareketler, hücre bölünmesi
- Aktif taşımayı sağlayan biyokimyasal reaksiyonlarda
- Sinirsel iletimi sağlayan reaksiyonlarda
- Salgılama olaylarında

2.1.5.1.4. Gliserol-3-fosfat Oksidaz

Gliserol 3-fosfat oksidaz, gliserol 3-fosfatın dihidroksiaseton fosfata katalizinden sorumlu oksidoredüktaz ailesinin üyesi bir enzimdir. Bu reaksiyonun gerçekleşebilmesi için ortamda oksijene de ihtiyaç duyulmaktadır.

Şekil 2.9'da gliserol 3-fosfat oksidazın katalizlediği reaksiyon görülmektedir.



Şekil 2.9. Gliserol 3-fosfatın DHAP'a yükseltgenmesi

2.1.5.3. İmmobilizasyon Materyalleri

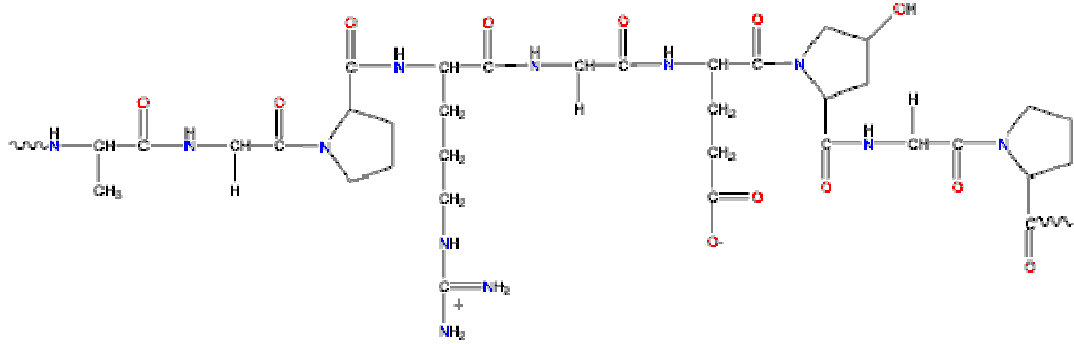
2.1.5.3.1. Jelatin

Jelatin, sığır, domuz, koyun gibi hayvanların kemik, deri ve tendonlarındaki kollajenin hidroliziyle elde edilen bir proteindir. Jelatinin karakteristik özelliği, prolin, glisin ve hidroksiprolin aminoasitlerini yapısında çok bulundurmasıdır. Yapısı genel olarak tekrarlanan glisin-X-Y triplet yapısını içerir ve genellikle X prolin, Y ise hidroksiprolindir. Bu aminoasitler, jelatinin üçlü bir heliks yapı oluşturmasında ve jelleşme özelliği kazanmasında etkilidirler. Jelatin oda sıcaklığında katıdır, tamponda çözülüp ısıtıldıktan sonra oda sıcaklığına getirildiğinde jel kıvamını alır. Bu özelliğinden dolayı iyi ve kolay kullanılabilir bir immobilizasyon malzemesidir [42].

Jelatin eğer biyomalzeme olarak kullanılmak isteniyorsa çapraz bağlı olmak zorundadır. Son zamanlarda jelatin filminin çapraz bağları fiziksel olarak termal ısı ve ultraviyole ışınlar yardımıyla oluşturulmakta, kimyasal olarak ise formaldehit, glutaraldehit, suda çözünen karbodiimid, diepoksi bileşenleri ve diizosiyanatlar gibi çapraz bağlayıcı ajanlar kullanılarak elde edilmektedir. Biyosensör çalışmalarında ise

termal ve mekanik kararlılığının artırılması amacıyla immobilizasyonda genellikle çapraz bağlayıcı glutaraldehit ile birlikte kullanılır [43, 44, 45].

Şekil 2.11’de jelatinin yapısı görülmektedir.



Şekil 2.10. Jelatinin yapısı

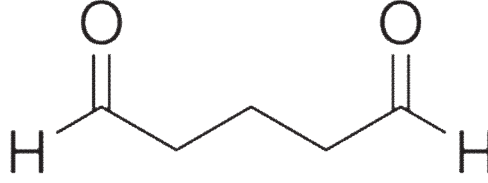
(<http://www.lsbu.ac.uk/water/hygel.html>)

2.1.5.3.2. Glutaraldehit

Virüs ve bakterilere karşı tıpta sıkça kullanılan renksiz, sıvı bir dezenfektan ve sterilizasyon kimyasalıdır. Aynı zamanda elektron mikroskoplarında doku belirleyici olarak da kullanılmaktadır [46, 47].

Glutaraldehit özellikle enzimlerin kovalent immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılan homo bifonksiyonel bir kimyasaldır. Homo bifonksiyonel maddeler, proteindeki lizin kalıntısının amino grupları gibi primer aminlerle seçici olarak etkileşime girerler. Suda ve benzen, alkol gibi susuz ortamlarda kararlı ve çözünebilir olması nedeniyle kullanımları çok yaygındır [48].

Glutaraldehit, içerdiği iki aktif aldehit grubu ile biyosensör geliştirilmesinde kullanılan enzim, mikroorganizma ve doku kesitleri gibi biyolojik bileşenlerin, kitosan, kolajen, jelatin ve karragenan gibi biyolojik matris moleküllerinin polimerleri üzerindeki –NH₂ gibi gruplarla H₂O çıkararak birleşir ve iki polimer zincirini birbirine çapraz bağlar. Bu esasa dayalı immobilizasyon yöntemi oldukça sık kullanılmaktadır [49, 50]. Yöntem kolay uygulanabilir olup genellikle sistemin termal, işlem ve depo kararlılıklarını da arttırmaktadır. Şekil 2.12’de glutaraldehitin formülü görülmektedir.



Şekil 2.11. Glutaraldehitin formülü

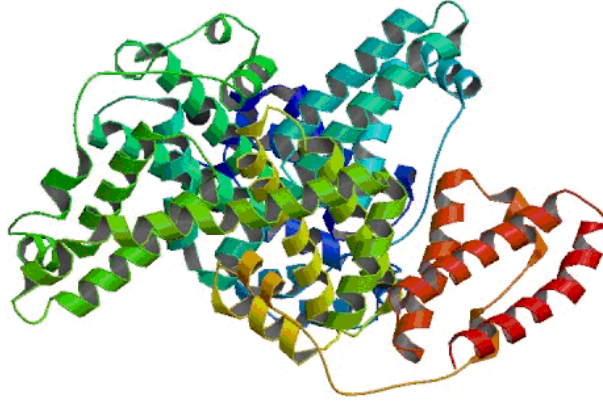
(<http://www.sigmaaldrich.com/medium/structureimages/25/mfcd00007025.png>)

2.1.5.3.3. Sığır Serum Albumini (BSA)

Kısaca albümin diye de bilinen serum albümini, insan ve diğer memeli hayvanların kan plazmasında bulunan en yaygın proteindir. Kanda bulunan proteinlerin % 60'ını oluşturur. Ayrıca, doku sıvılarında, özellikle kas ve deride, az miktarda ter, göz yaşı, mide suları ve safrada da bulunur. Sığır serum albumini ise sığır kanından izole edilen bir kan proteindir. BSA proteini 607 amino asitten oluşmuştur. Proteinin N terminal ucunda 18 amino asitten oluşan sinyal peptid dizisi, salgılanma sırasında öncül proteinden çıkarılır. Böylece protein 589 amino asit içerir. Ayrıca olgun BSA proteini olması için bu proteinden 4 amino asit (N terminal uçtan) daha çıkarılır. Sonuç olarak elimizde 585 amino asit içeren bir protein bulunur.

İmmobilizasyon çalışmalarında özellikle tutuklama yöntemlerinde çapraz bağlayıcılarla oluşturulan çapraz bağ sayısını arttırmak için ve enzimle yapılan çapraz bağ sayısını azaltarak enzimin aktivitesinin düşmesinin engellenmesi amacıyla kullanılır.

Şekil 2.13'de BSA'ya ait üç boyutlu yapı gösterilmiştir.



Şekil 2.12. BSA'nın üç boyutlu yapısı

(http://en.wikipedia.org/wiki/Bovine_serum_albumin)

2.2. Trigliserid Substratları ve Yüzey Aktif Maddeler

Son yıllarda dünya genelinde obezite denilen aşırı şişmanlığın artması, insanın kan ve idrar gibi vücut sıvılarında lipid miktarı analizinin pratik olarak yapılmasını çok önemli ve gerekli hale getirmiştir. Trigliseridler (TG) (nötral yağlar), lipidlerin bir alt sınıfıdır ve kan lipidlerinin çoğunluğunu oluşturur. Trigliseridler üç mol yağ asiti ve gliserinin esterleşme reaksiyonu sonucu oluşurlar. Vücutta fazla TG'ler adipoz yağ dokularında depolanırlar. TG seviyesi sağlıklı insanlarda 150–190 mg/dl arasındadır. Yüksek trigliserid seviyesi 200–499 mg/dl ve aşırı yüksek seviye >500 mg/dl dir. Kandaki TG yüksekliğinin sebepleri arasında; kronik hepatit, arteroskleroz, ikincil hipolipoproteinemi, böbrek sendromu ve şeker hastalığı (*Diabetes mellitus*) vardır [51].

Bir enerji kaynağı olarak metabolizmada önemli rol oynayan TG'ler, karbohidratlar ve proteinlerin iki katı enerji taşırlar (9 cal/g). İnce bağırsakta trigliseridler, lipaz enzimleri ve safranin etkisiyle gliserol ve yağ asitlerine ayrışırlar, buradan da kana geçerler. Kanda, gliserin ve yağ asitlerinin biraraya gelmesiyle ihtiyaç duyulan özel trigliseridler yeni baştan oluşurlar ve lipoproteinlere katılırlar. Lipoproteinler, diğer işlevlerinin yanı sıra, yağ hücreleriyle diğer hücreler arasında yağ asitlerinin taşınmasında da görevlidirler. Vücuttaki çoğu hücre, gereksinimlerine bağlı olarak yağ asitlerini ya salgılar ya da içine alır. Yağ hücreleri ayrıca trigliseridleri sentezleyip depolama yeteneğine de sahiptirler. Vücut, enerji kaynağı olarak yağ

asitlerine ihtiyaç duyduğunda, glukagon hormonunun verdiği işaret üzerine, hormon duyarlı lipaz enzimi trigliseridleri yağ asitlerine parçalar.

Beyin, yağ asitlerini enerji kaynağı olarak kullanamaz, bu yüzden bu organda trigliseridler parçalandığında ortaya çıkan gliserol yakıt olmak için glukoza dönüştürülür. Beynin yakıt gereksinimi vücudun geri kalanın gereksinimini aştığı durumda aynı reaksiyon yağ hücrelerinde de gerçekleşir. Şekil 2.14’de trigliseridlerin genel formülü verilmiştir.

2.2.1. Gum Arabik (Arap Zamkı)

Gum arabik, kimyasal olarak bir karbonhidrat polimeridir. Alkolsüz içecek üretiminde olduğu gibi içecek sanayinde aromaları ve yağları stabilize edici olarak kullanılan emülgatör, yapı düzeltici ajan ve film yapıcı gibi maddelerin pahalı kaldığı durumlarda kullanılmaktadır.

Gum arabik, su ve benzeri polar zclerde znmeyen, lipidlerin ve buna benzer apolar substratların enzimatik tayinlerinde ve biyosensör uygulamalarında substrat zeltisinin üzücü ortamında emlsiyede halde kararlı kalmasını ve lipazların ara yüzeydeki hidroliz aktivitesini arttırıcı özelliğe sahip emlsiyede edici bir maddedir.

2.2.2. Triton X-100

Triton X-100, hidrofilik polietilen oksit ve hidrofobik bir hidrokarbon grubu içeren bir noniyonik yüzey aktif maddedir. Gum arabike benzer Şekilde emlsiyede edici özelliği sayesinde lipid hidrolizi reaksiyonlarında kullanımı oldukça yaygındır.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOTLAR

3.1. Materyaller

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Potasyum dihidrojenfosfat, disodyum hidrojenfosfat, magnezyum klorür, Merck (Darmstadt, Almanya), sığır serum albümini (BSA), jelatin, glutaraldehit, Gum arabic, Triton X-100, TG substratları, Triolein % 65, Gliserol Kinaz (*Cellulomonas sp.*), Gliserol 3-fosfat oksidaz (*Aerococcus viridans*), Adenozin 5'-trifosfat, Lipaz (*C. rugosa*) Sigma (St. Louis, ABD) firmasından sağlanmıştır.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

- pH Metre (Jenco 6173)
- Ultrasonik su banyosu (Wiseclean Daihan)
- Terazı (Precisa XB 220A)
- Isıtıcı ve manyetik karıştırıcı (IKA RH basic-2)
- Mikro pipet takımı (Eppendorf)
- Dış sirkülasyonlu su banyosu (Nuve BM 302)
- Camsı karbon çalışma elektrodu
- Platin karşıt elektrot
- Ag/AgCl referans elektrot
- Palmsens potansiyostat
- Buzdolabı ve bulaşık makinası (Arçelik, ev tipi)

3.1.3. Hazırlanan Çözeltiler

- 0.1 M Fosfat tamponu (pH:7)
- %2.5'luk Glutaraldehit çözeltisi
- Triolein Çözeltisi
- Enzimler karışımı

3.1.3.1. Substrat Çözeltilerinin Hazırlanması

ÇEB'in aktivite denemelerinde kullanılacak substrat çözeltisinin hazırlanma prosedürü Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Substratların hazırlanma prosedürü

İŞLEM SIRASI	İŞLEM
1	3 g Gum arabic + 30 mL 0.1 M pH: 7 fosfat tamponu içerisinde çözüldü. Çözünme, hızlı gerçekleşebilmesi için kullanılan cam malzeme ultrasonik su banyosu içine alındı ve sadece sonikasyon çalıştırılarak 10 dk. sonikasyon gerçekleştirildi. Çözünmeden kalan tortu süzgeç kağıdı ile süzülerek uzaklaştırıldı.
2	3.07 gram substrat (3.37 mL) tartılarak ilk adımda hazırlanan gum arabic çözeltisi ile 30 mL'ye tamamlandı.
3	Substratın çözünmesine yardımcı olmak için beher tekrardan ultrasonik su banyosuna alındı ve üzerine 50 µL Triton X-100 ilave edilerek 10 dk. sonikasyon yapıldı.
4	Hazır hale gelen substrat çözeltisi ölçümler esnasında sürekli manyetik karıştırıcı üzerinde bekletilerek homojen çözelti hali korundu.
5	Ölçüm yapılmadığı zamanlarda bu substrat çözeltisi +4 °C'de iki hafta boyunca kararlılık gösterdi.

3.1.3.2. Enzim Çözeltisinin Hazırlanması

Lipaz (*C. rugosa*), Gliserol Kinaz (*Cellulomonas sp.*) ve Gliserol 3-fosfat oksidaz (*Aerococcus viridans*) enzimlerinin her biri önce pH: 7.0 fosfat tamponu içerisinde çözülmüş ve istenilen ünitelerde 10 µL'lik porsiyonlar oluşturulmuştur.

Biyosensör hazırlanmadan önce Lipaz (LP), Gliserol Kinaz (GK), Gliserol 3-fosfat oksidaz (GPO) enzimlerinin porsiyonları ve önceden aynı şekilde porsiyonlanmış olan ATP ve MgCl₂'e ait porsiyonlar birbirleriyle karıştırılarak 40 µL'lik enzim karışımı elde edilmiştir. Bu karışımdaki enzimlerin birbirleriyle olan oranları sırasıyla 10:5:2 ünitedir. Bu enzim karışımı daha sonra biyoaktif tabaka oluşturmak amacıyla

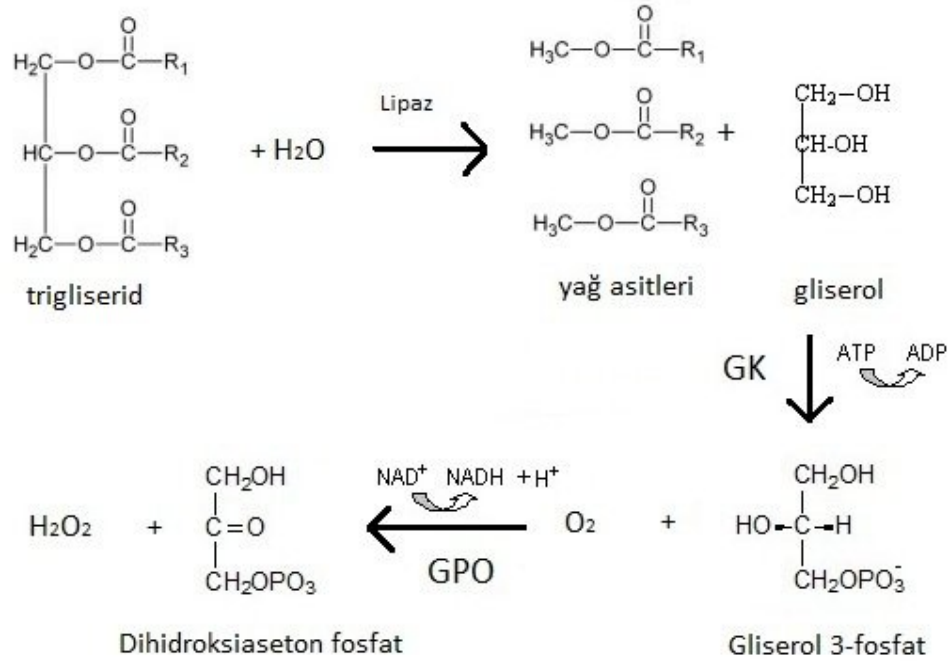
içerisinde optimum miktarları belirlenmiş olan 10 µL jelatin ve BSA immobilizasyon çözeltisi ile bir araya getirilecektir. Ortamın son ATP ve MgCl₂ konsantrasyonu sırasıyla 9.06 µM ve 6.3 µM'dır.

3.2. Metodlar

3.2.1. Biyosensörün Çalışma Prensibi

Reaksiyon ortamında substrat bulunmadığı sırada biyobileşenin immobilize edildiği elektrot yüzeyindeki oksijen konsantrasyonu devreden geçen akım miktarıyla belirlenir. Reaksiyon ortamına substrat ilavesi yapıldığında gerçekleşen enzimatik reaksiyon sonucu gliserol 3-fosfat, dihidroksiaseton fosfata dönüştürürken elektrot yüzeyindeki oksijen miktarında azalma görülür. İlave edilen trigliserid konsantrasyonu ile orantılı olarak devreden geçen akım miktarı azalma gösterir ve yeniden kısa bir süre içinde dengeye gelir.

Her iki denge arasındaki akım miktarı farkı potansiyostat (Palm Sens) ile tespit edilir. Substrat konsantrasyonu arttıkça, jelatin-enzim yüzeyinde daha fazla oksijen harcanacak ve akım değerinde de aynı oranda azalmalar meydana gelecektir. Şekil 3.1'de biyosensörün biyoaktif tabakasında meydana gelen reaksiyonlar gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Biyosensör biyotabakasında oluşan reaksiyonların mekanizması.

3.2.2. Biyosensör Hazırlanması

ÇEB'lerin hazırlanması için kullanılan çalışma elektrodu camsı karbon elektrottur. Şekil 3.1'de belirtilmiş olan mekanizma sırasında meydana gelen çözünmüş oksijen mekanizmanın üçüncü basamağında reaksiyona girerek harcanır ve çözünmüş oksijen miktarında azalma olur. Bu azalma, sabit potansiyel farkı altında sistemden geçen akım miktarındaki azalma ile doğru orantılıdır. Camsı karbon çalışma elektrodu ile akımdaki bu azalma belirlenir.

Biyosensörün biyoaktif tabakasının oluşturulması amacıyla camsı karbon çalışma elektrodun uç yüzeyi jelatin + BSA + enzimler karışımı ile kaplandı ve ardından glutaraldehit ile çapraz bağlama gerçekleştirildi.

ÇEB'in hazırlanmasında izlenen yol Tablo 3.2'de ayrıntılı olarak verilmiştir. Tablolarda belirtilen değerler; çok sayıda ön denemeler ve optimizasyon çalışmaları sonrasında belirlenen en uygun değerlerdir. Bütün denemeler aynı elektrot kullanılarak yapılmıştır. Hazırlanan elektrot her zaman önce destile su ile yıkanmış, argon gazı ile yüzeyin nemi giderilmiş ve ölçümler arasında biyotabakanın kurumasının önüne

geçilmesi için içinde fosfat tamponunda ıslanmış pamuk bulunduran bir beherde biyotabaka yüzeyi pamuğa temas etmeyecek şekilde karanlıkta bekletilmiştir.

Tablo 3.2. Biyosensörün hazırlanma prosedürü

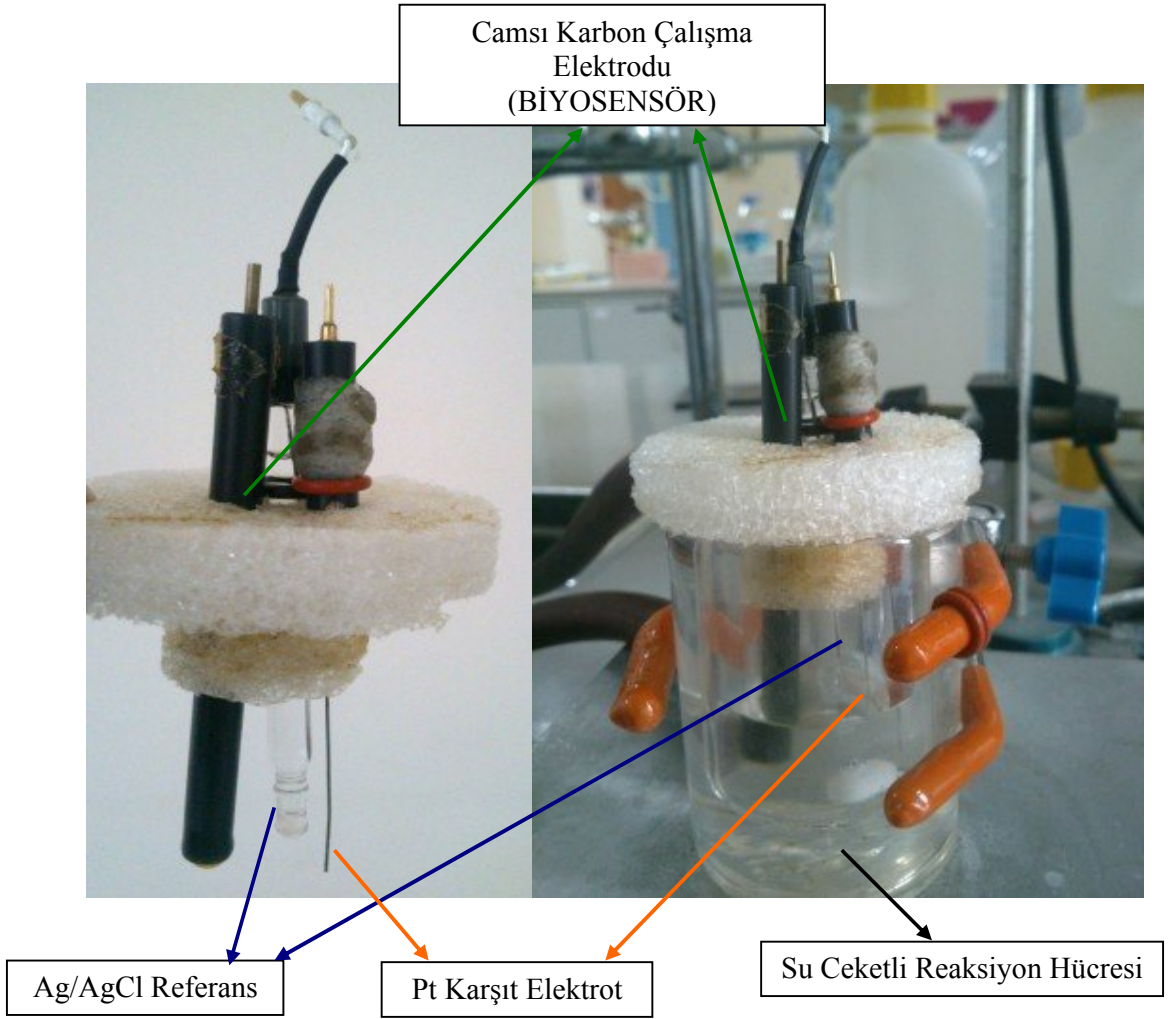
İŞLEM SIRASI	İŞLEM
1	45 mg jelatin + 30 mg BSA, içerisinde 31.5 μ M MgCl ₂ içeren 300 μ L pH:7 fosfat tamponu içerisinde çözülüp 40 °C de 15 dk bekletildi.
2	Karışımın 10 μ L'si 40 μ L enzim çözeltisi ile karıştırılarak elde edilen toplam hacim 50 μ L olarak camsı karbon çalışma elektrodu üzerine yayıldı.
3	+ 4 °C de 30 dk bekletildi.
4	Bekleme süresinin sonunda % 2.5'luk glutaraldehit çözeltisinde 5 dk çapraz bağlanmanın gerçekleştirilmesi için daldırılarak bekletildi.
5	Son olarak biyosensör saf su ile yıkandı ve içerisinde pH:7 fosfat tamponu bulunan reaksiyon hücrelerine alındı.

3.2.3. Biyosensörün Ölçüm Prosedürü

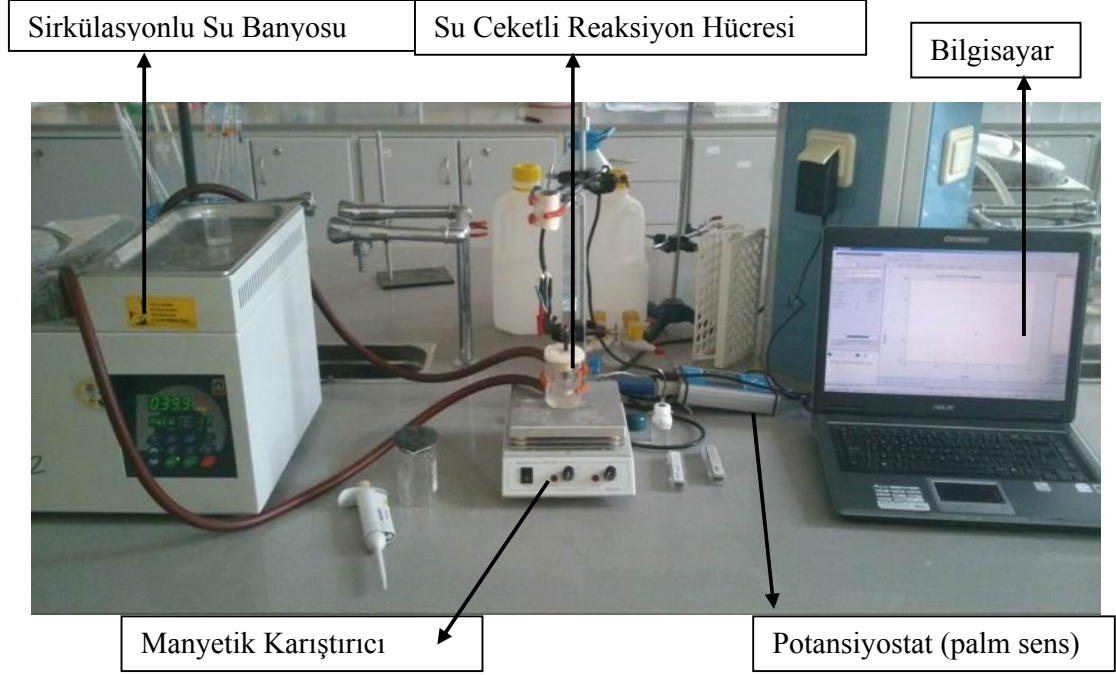
ÇEB ile yapılan ölçümlerde kullanılan düzenek Şekil 3.2’de, reaksiyon hücresindeki elektrotların dizilimi Şekil 3.3’de, çoklu enzim esaslı çalışma elektrodu ise Şekil 3.4’de gösterilmiştir



Şekil 3.2. Camsı karbon elektrot üzerine tutuklanmış çoklu enzim sistem



Şekil 3.3. Reaksiyonda kullanılan elektrotların dizilimi



Şekil 3.4. ÇEB ile hazırlanan düzenek

Biyosensör, hazırlanması ardından içerisinde pH:7 fosfat tamponu bulunan çalışılmak istenilen sıcaklığa gelmiş reaksiyon hücresine Ag/AgCl referans ve Pt karşıt elektrotlarla beraber yerleştirildi. Elektrotların bağlantılarının kurulması ardından manyetik karıştırıcı sabit bir hızda çalıştırıldı ve substrat ilave edilmeden önce oksijenin indirgenme potansiyeli olan -0,700 Voltta potansiyel fark sabitlendi ve reaksiyon süresi boyunca sabit tutuldu. Belirli bir süre ardından grafikte görülen akım değeri dengeye gelip sabit bir değere ulaştığında substrat eklemesi yapıldı ve reaksiyon başlatıldı. Bir süre sonra çoklu enzim sisteminin ikinci basamağındaki reaksiyon sonucu meydana gelen gliserol 3-fosfat, ortamdaki oksijenin ile GPO katalizörlüğünde dihidroksiaseton fosfata dönüşeceğiinden eklenen substrat konsantrasyonu ile orantılı olarak akım şiddetinde bir azalmaya sebep olacaktır. Oksijen miktarının azalması -0,700 V potansiyelde devreden geçen akım miktarını da azaltır. Bu durum yeni denge kurulana kadar sürer. Yapılan tüm denemelerde iki denge durumu arasındaki akım şiddeti farkları alındı ve bu fark ile orantılı olan substrat konsantrasyonu tayin edildi.

3.2.4. ÇEB'in İmmobilizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu

ÇEB için en iyi biyosensör cevabının elde edilebileceği optimum immobilizasyon koşullarının tespit edilmesi amaçlandı. Bu amaçla jelatin miktarının, serum albumini miktarının ve çapraz bağlayıcı glutaraldehit miktarının biyosensör cevabına etkileri araştırılmıştır. Her bir immobilizasyon parametresinin optimum miktarının tayin edilmesi için, diğer değişkenler sabit tutularak optimizasyonu yapılacak parametre değiştirilip biyosensör hazırlanmış ve ölçümler alındı.

3.2.4.1. Biyosensör Cevabına Jelatin Miktarının Etkisi

ÇEB için en uygun enzim miktarları belirlendikten sonra, biyoaktif tabakadaki jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi amacıyla; çapraz bağlayıcı glutaraldehit miktarı ve serum albumini miktarı sabit tutularak farklı jelatin miktarları ile biyosensörler hazırlandı.

Hazırlanan her biyosensörle yapılan ölçümlerden elde edilen ΔI ile substrat konsantrasyonu arasındaki grafik yardımıyla en uygun jelatin miktarı tespit edildi. Bu grafikler yardımıyla en uygun jelatin miktarı tespit edildi. Bu amaçla BSA miktarı 1 mg/cm² ve glutaraldehit yüzdesi %2.5 olacak şekilde sabit tutularak 1, 1.5, 2 mg/cm² miktarlarında jelatin ile biyosensörler hazırlandı. Ölçümler 100 mM, pH 7.0 fosfat tamponunda 40 °C'de 40 µL enzim çözeltisi kullanılarak hazırlanan biyosensörlerle gerçekleştirildi. Alınan her ölçüm sonrası pH: 7.0 100 mM fosfat tamponu içerisinde 40 °C'de 15 dk rejenerasyon gerçekleştirildi.

3.2.4.2. Biyosensör Cevabına BSA Miktarının Etkisi

En uygun jelatin miktarı belirlendikten sonra, biyosensörlerin cevabına BSA miktarının etkisinin belirlenmesi için jelatin miktarı ve glutaraldehit yüzdesi sabit tutularak farklı BSA miktarları kullanılmasıyla biyosensörler hazırlandı.

Hazırlanan biyosensörlerle yapılan ölçümlerden grafikler elde edildi. Bu grafikler yardımıyla en uygun BSA miktarı tespit edildi. Bu amaçla jealtin miktarı 1.5 mg/cm², glutaraldehit yüzdesi %2.5 olacak şekilde sabit tutularak 0, 0.5, 1, 1.5 mg/cm² miktarlarında BSA ile biyosensörler hazırlandı. Ölçümler 100 mM, pH 7.0 fosfat tamponunda 40 °C'de 40 µL enzim çözeltisi kullanılarak hazırlanan biyosensörlerle

gerçekleştirildi. Alınan her ölçüm sonrası pH: 7.0 100 mM fosfat tamponu içerisinde 40 °C'de 15 dk rejenerasyon gerçekleştirildi.

3.2.4.3. Biyosensör Cevabına Glutaraldehit Yüzdesinin Etkisi

En uygun BSA ve jelatin miktarları belirlendikten sonra, biyosensörlerin cevabına glutaraldehit yüzdesinin etkisinin belirlenmesi için BSA ve jelatin miktarları sabit tutularak farklı glutaraldehit yüzdeleri içeren çözeltiler kullanılmasıyla biyosensörler hazırlandı.

Hazırlanan biyosensörlerle yapılan ölçümlerin verileri grafiklendirildi ve en uygun glutaraldehit yüzdesi tespit edildi. Bu amaçla jelatin miktarı 1.5 mg/cm² ve BSA miktarı 1 mg/cm² olacak şekilde sabit tutulup %1.5, %2.5, %3.5'lik glutaraldehit çözeltileri kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Ölçümler 100 mM, pH 7.0 fosfat tamponunda 40 °C'de 40 µL enzim çözeltisi kullanılarak hazırlanan biyosensörlerle gerçekleştirildi. Alınan her ölçüm sonrası pH: 7.0 100 mM fosfat tamponu içerisinde 40 °C'de 15 dk rejenerasyon gerçekleştirildi.

3.2.5. Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

3.2.5.1. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Biyosensörün yanıtı üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi amacıyla 20, 30, 40, 45 ve 50 °C'de düşük sıcaklıktan yüksek sıcaklığa doğru optimum tampon ve optimum pH konsantrasyonlarında ölçümler gerçekleştirildi. Ölçümlerde önceden hazırlanmış olan 0.562 mM Triolein çözeltisi kullanıldı. Farklı sıcaklıklarda ölçüme geçilirken biyosensörler çalışılacak tampon içerisinde 5 dk bekletildi. Alınan her ölçüm sonrası pH: 7.0 100 mM fosfat tamponu içerisinde 40 °C'de 15 dk rejenerasyon gerçekleştirildi.

Bu çalışma sonucunda sıcaklık ve % biyosensör yanıtı arasında grafik çizildi ve optimum sıcaklık tayin edildi.

3.2.5.2. Optimum pH'in Belirlenmesi

ÇEB'in optimum pH'ının belirlenmesi için pH 5.0 100 mM asetik asit/asetat; 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 ve 9.0 100 mM sodyum fosfat tamponu kullanılarak en iyi biyosensör yanıtının hangi pH değerlerinde elde edildiği belirlendi. Ölçümler 40 °C'de ve 0.562 mM triolein çözeltisi konsantrasyonunda yapıldı. Alınan her ölçüm sonrası pH: 7.0 100 mM fosfat tamponu içerisinde 40 °C'de 15 dk rejenerasyon gerçekleştirildi.

Bu çalışma sonucunda tampon pH'ı ve % biyosensör yanıtı arasında grafik çizildi ve optimum pH belirlendi.

3.2.5.3. Optimum Tampon Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Biyosensörler ile en iyi yanıtların görüldüğü tampon konsantrasyonlarını belirlemek için bir önceki çalışma ile belirlenen optimum pH değerinde, molar konsantrasyonu 66 mM, 100 mM ve 132 mM olan tampon sistemleri kullanılarak denemeler gerçekleştirildi. Ölçümler 40 °C'de ve 0.562 mM triolein konsantrasyonunda yapıldı. Alınan her ölçüm sonrası 15 dk rejenerasyon gerçekleştirildi.

Bu çalışma sonucunda tampon konsantrasyonu ve % biyosensör cevabı arasında grafik çizildi.

3.2.6. Biyosensörün Karakterizasyonu

ÇEB'de kullanılmış olan biyobileşenlerin immobilizasyon parametrelerinin ve çalışma koşullarının optimizasyonlarının tamamlanmasından sonra biyosensörün karakterizasyonu çalışmalarına geçildi.

3.2.6.1. Biyosensörün Lineer Ölçüm Aralıkları

Optimum şartlarda sağlanan immobilizasyon parametrelerine göre hazırlanan biyosensörler ile farklı triolein konsantrasyonlarında ölçümler yapılarak, triolein konsantrasyonları için ölçüm aralıkları belirlendi. Ölçümler optimum şartlarda gerçekleştirildi.

3.2.6.2. Biyosensörün İşlem Kararlılığı

Biyosensörün işlem kararlılıklarının belirlenmesi amacıyla, 100 mM pH 7.0 fosfat tamponu içinde 40 °C'de 0.562 mM triolein çözeltisi kullanılarak ardarda aynı sensör ile 45 dk arayla 10 ölçüm gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlarla aynı biyosensör ile aynı gün içerisinde kaç ölçüm alınabileceği belirlendi. Sonuçlar % aktiviteye karşı zaman grafiği olarak verildi.

3.2.6.3. Biyosensör Yanıtının Tekrarlanabilirliği

ÇEB'in ölçüm sonuçlarının güvenilirliği ve tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi için, 100 mM pH 7.0 fosfat tamponu içinde 40 °C'de gerçekleştirilen denemelerde, 0.562 mM triolein çözeltisi kullanılarak arka arkaya ara vermeksizin aynı sensörle ölçümler yapıldı. Ölçümlere ilişkin standart sapmalar ve varyasyon katsayıları hesaplandı.

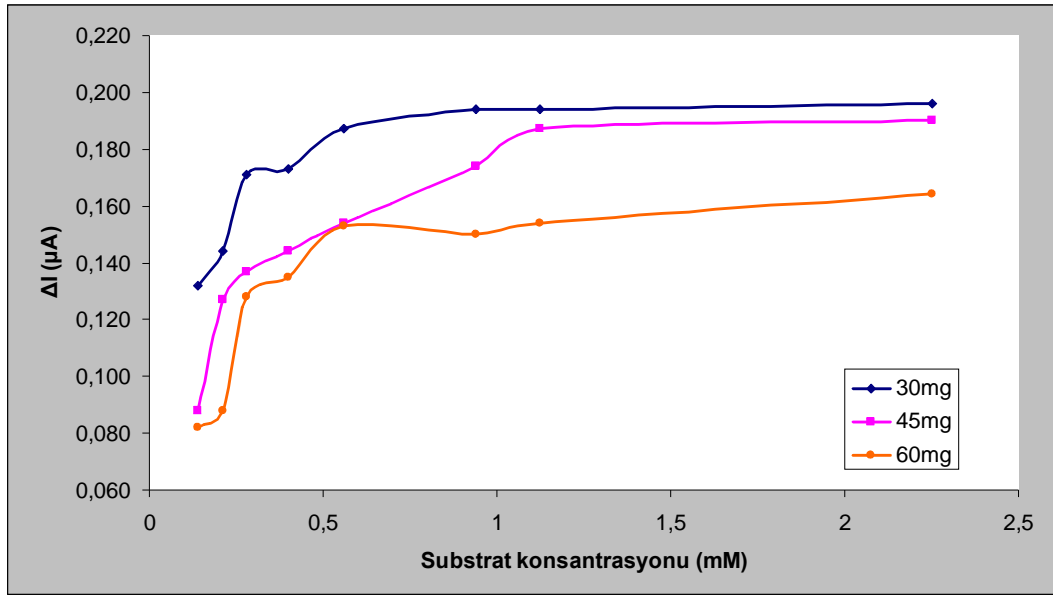
BÖLÜM 4

DENEY SONUÇLARI VE BULGULAR

4.1. Biyosensörün Hazırlanma Koşullarının Optimizasyonuna Ait Bulgular

4.1.1. Biyosensör Cevabına Jelatin Miktarının Etkisi

Çalışmanın bu kısmında immobilizasyonda kullanılan jelatin miktarlarının biyosensörün cevabı üzerine etkisi incelendi. Biyosensörün hazırlanmasında kullanılan jelatin miktarları ile biyosensör cevapları arasındaki ilişki Şekil 4.1’de verildi.



Şekil 4.1. Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Biyoaktif tabakadaki jelatin miktarının artışı biyoaktif tabaka yoğunluğunu artırarak oksijenin ve de substratın biyoaktif tabaka içerisine difüzyonunu zorlaştırır. Jelatin miktarındaki artış ile biyosensör cevabının düşmesi bu sebepten dolayı beklenen bir sonuçtur. Jelatin miktarının 45 mg'dan az olduğu durumda çapraz bağ sayısındaki azalma nedeniyle oksijen ve substrat difüzyonunun kolaylaşmasından dolayı biyosensör

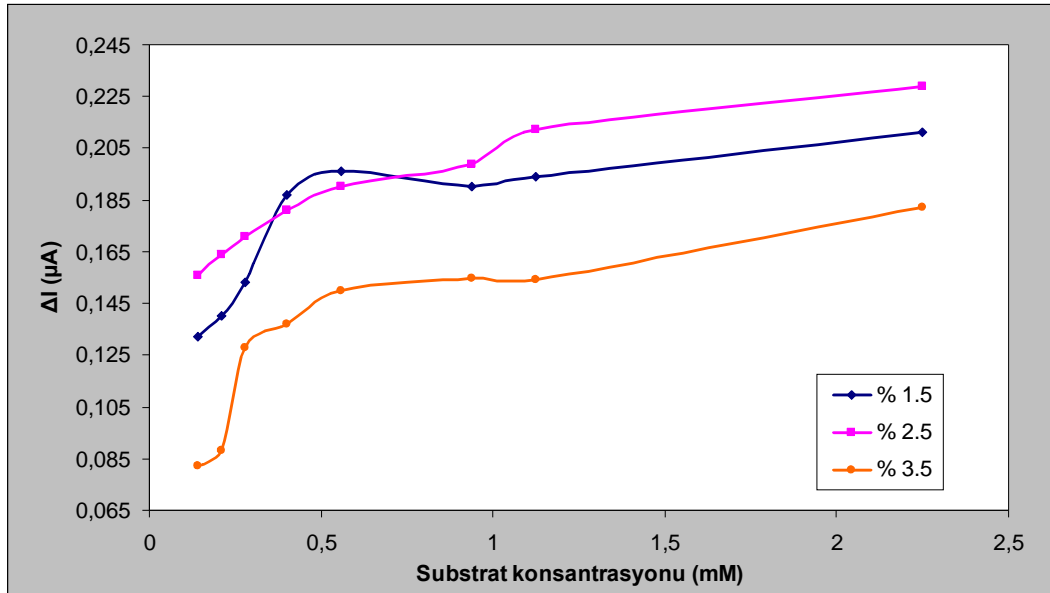
cevabında bir artış gözlenmiş fakat biyoaktif tabakadan substrat çıkışının da kolaylaşmış olması lineerlikte bir bozulmaya sebebiyet verilmiştir.

Şekil 4.1'de görüldüğü gibi doğrusal aralığı en iyi olan biyosensör cevabı, biyoaktif tabakada; 1,5 mg/cm² jelatin içerecek şekilde hazırlanmış olan biyosensör ile alındı.

4.1.2. Biyosensör Cevabına Glutaraldehit Yüzdesinin Etkisi

Optimum jelatin ve BSA miktarları belirlendikten sonra, glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi için jelatin ve BSA miktarları optimum değerlerde sabit tutularak değişen glutaraldehit miktarlarıyla yeniden biyosensör hazırlandı.

Hazırlanan biyosensör ile çapraz bağlayıcı glutaraldehitin biyosensör cevabına etkisi incelendi. Sonuçlar Şekil 4.2'de verildi.



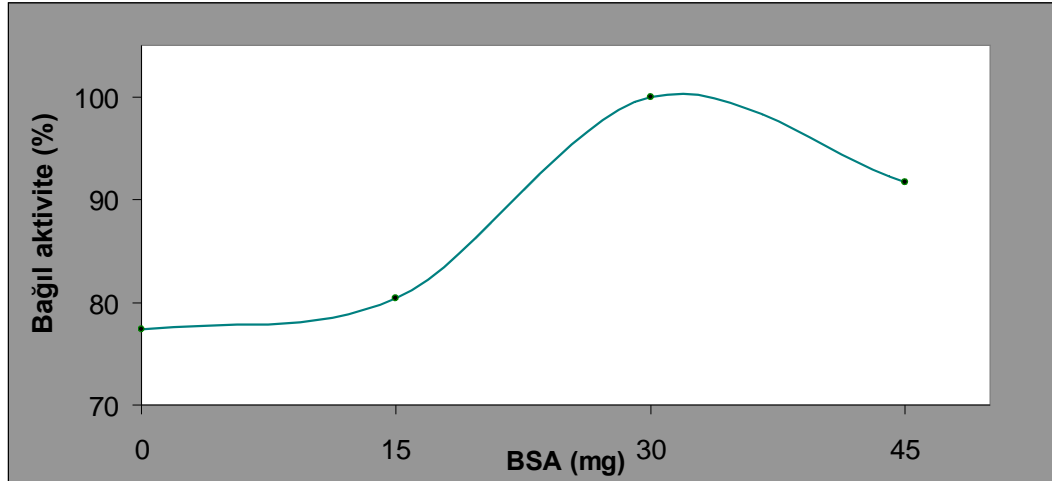
Şekil 4.2. Biyosensör cevabına glutaraldehit yüzdesinin etkisi

Glutaraldehit yüzdesinin yüksek olması durumunda, düşük olduğu duruma göre biyoaktif tabakanın daha dar gözenekli olması beklenir. Bu nedenle yüksek glutaraldehit miktarlarında biyosensör cevabının düşük olması beklenen bir sonuçtur.

Düşük glutaraldehit yüzdesi kullanılarak hazırlanan biyosensörde enzim-jelatin, enzim-enzim, jelatin-jelatin, jelatin-BSA, BSA-enzim, BSA-BSA arasındaki çapraz bağ sayısının azalması substratın biyoaktif tabakadan kaçışına olanak sağlayabilir. Ayrıca çapraz bağ sayısının azalması oksijenin reaksiyon ortamından biyoaktif tabakaya daha kolay difüzyonuna imkan sağlayacağından oksijen konsantrasyonu ile orantılı olması gereken devreden geçen akım miktarını etkiler.

4.1.3. Biyosensör Cevabına BSA Miktarının Etkisi

Çalışmanın bu kısmında immobilizasyonda kullanılan BSA miktarlarının biyosensörün cevabı üzerine etkisi incelendi. Önceden belirlenmiş optimum jelatin miktarı ve glutaraldehit yüzdesi sabit tutularak çeşitli BSA miktarları ile biyosensörler hazırlandı. Şekil 4.3’de farklı BSA miktarlarının biyosensörün cevabına etkisi verildi.



Şekil 4.3. Biyosensör cevabına BSA miktarının etkisi

En iyi biyosensör cevabı BSA miktarı 1 mg/cm^2 olarak 30 mg BSA kullanıldığında elde edildi. BSA miktarındaki artış çapraz bağ sayısını arttıracığından dolayı biyosensör cevabında gözlenen düşüş beklenen bir durumdur. Kullanılan BSA

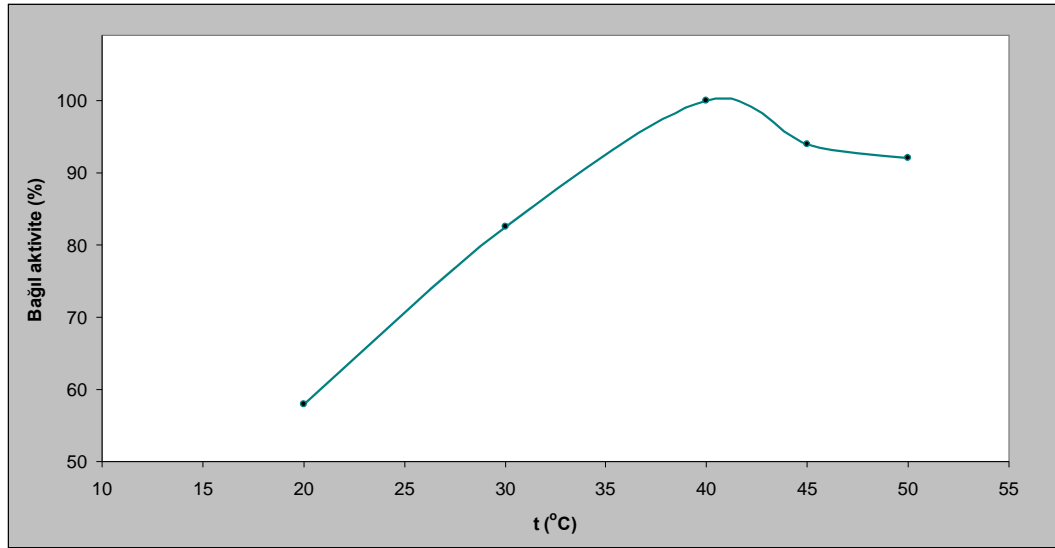
miktarındaki azalma biyoaktif tabakadaki toplam çapraz bağ sayısını azaltmasına rağmen aynı zamanda enzim-jelatin, enzim-enzim, enzim-BSA arasındaki çapraz bağ sayısının da artmasına neden olur. Bu durumda enzimlerin aktif merkezlerinden oluşabilecek olası bağlanmaların da sayısı artar. Bu nedenle BSA miktarındaki azalma biyosensör cevabının da düşmesine sebebiyet verebilir.

4.2. Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonuna Ait Bulgular

4.2.1. Optimum Sıcaklık

Biyosensörün cevabı üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi amacıyla 20, 30, 40, 45 ve 50 °C’de düşük sıcaklıktan yüksek sıcaklığa doğru optimum tampon ve optimum pH konsantrasyonlarında ölçümler gerçekleştirildi. Ölçümlerde önceden hazırlanmış olan 0.562 mM Triolein çözeltisi kullanıldı. Sonuçlar Şekil 4.4’de verildi.

Şekil 4.4’de görüldüğü üzere ÇEB’in cevabında 40 °C’ye kadar bir artış görüldü, bu sıcaklığın üzerine çıkıldığında ise azalma tespit edildi. Sıcaklık artışının, çözülmüş oksijen konsantrasyonlarında azalmalara sebep olduğu kadar aynı zamanda enzim aktivitelerinde de kayıplara sebep olduğu optimum sıcaklık üzerine çıkıldığında rahatlıkla gözlenmektedir. Daha yüksek sıcaklıklarda ise biyoaktif tabakayı oluşturan bileşenler bozulmaya uğradıklarından daha fazla ölçüm alınamamıştır.

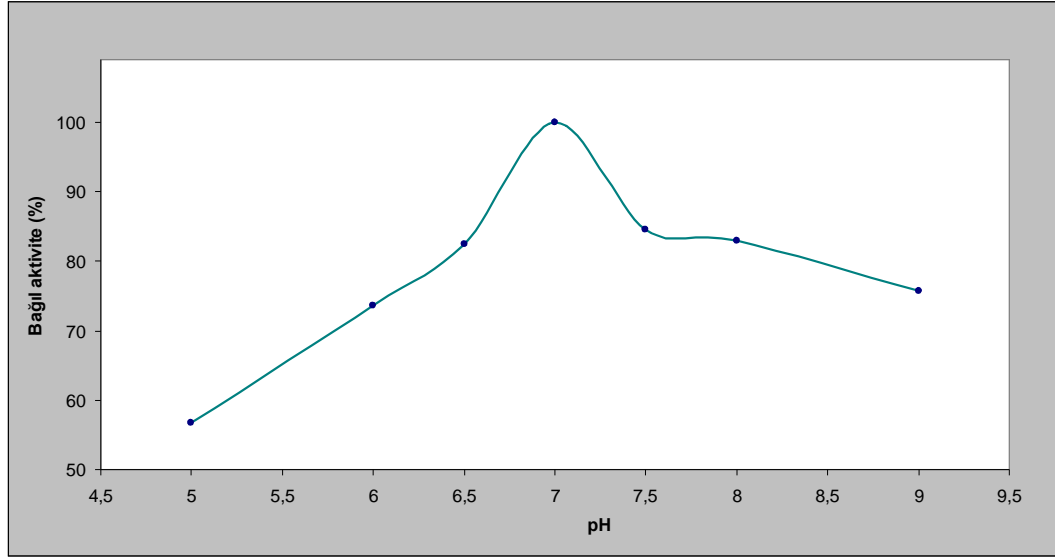


Şekil 4.4. ÇEB'in sıcaklık - bağıl aktivite (%) grafiği

4.2.2. Optimum pH

Çoklu enzim sistemi içeren biyosensörün biyoaktif tabaka ve immobilizasyon bileşenlerinin optimizasyonu sonrası, yeni biyosensör hazırlanarak bu biyosensöre ait optimum pH denemeleri yapıldı.

Yapılan denemeler arası en iyi cevabın pH 7.0 değerinde oluştuğu görüldü. Sonuçlar Şekil 4.5’de verildi.



Şekil 4.5. ÇEB’in pH - bağıl aktivite (%) grafiği

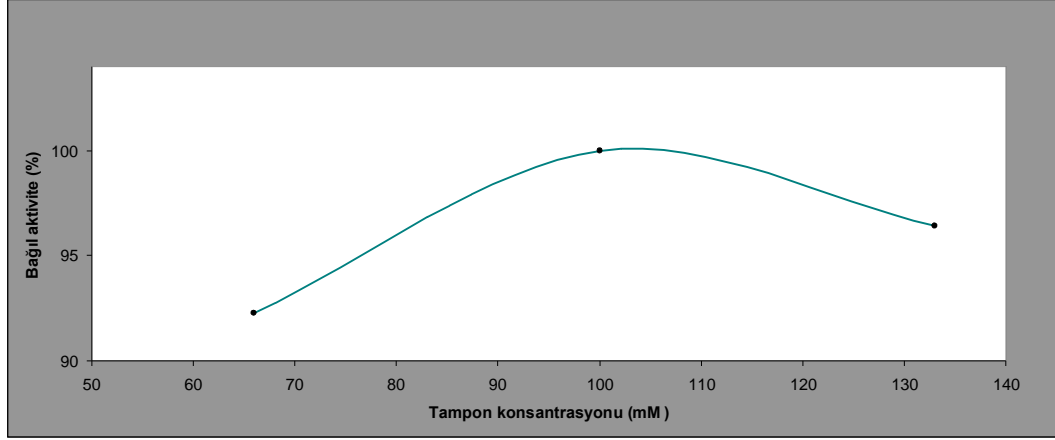
Şekil 4.5’den de görüldüğü üzere, biyoaktif tabakaya immobilize edilmiş çoklu enzim sisteminin optimum pH’ı 7 olarak tespit edilmiştir.

4.2.3. Optimum Tampon Konsantrasyonu

ÇEB’in sıcaklık ve pH optimizasyonu sonrası, yeni hazırlanan biyosensörde optimum pH ve sıcaklık değerlerinde, farklı konsantrasyonlarda tamponlar kullanarak, en iyi biyosensör cevabının hangi tampon konsantrasyonunda alındığının belirlenmesine yönelik çalışmalar yapıldı. Bu çalışmalar ile aynı zamanda ortamın iyonik şiddetinin de optimizasyonu yapılmış oldu.

Bu amaçla denemelerde pH 7.0 fosfat tamponunun 66, 100 ve 132 mM’lık konsantrasyonları kullanıldı. Denemeler sonucunda çoklu enzim sistemi içeren

biyosensör için tampon konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisinin diğer parametrelerdeki değişimlere oranla fazla bir değişim göstermediği ve en uygun çalışma tamponu konsantrasyonunun 100 mM olduğu kararına varıldı. Sonuçlar Şekil 4.6’da verildi.

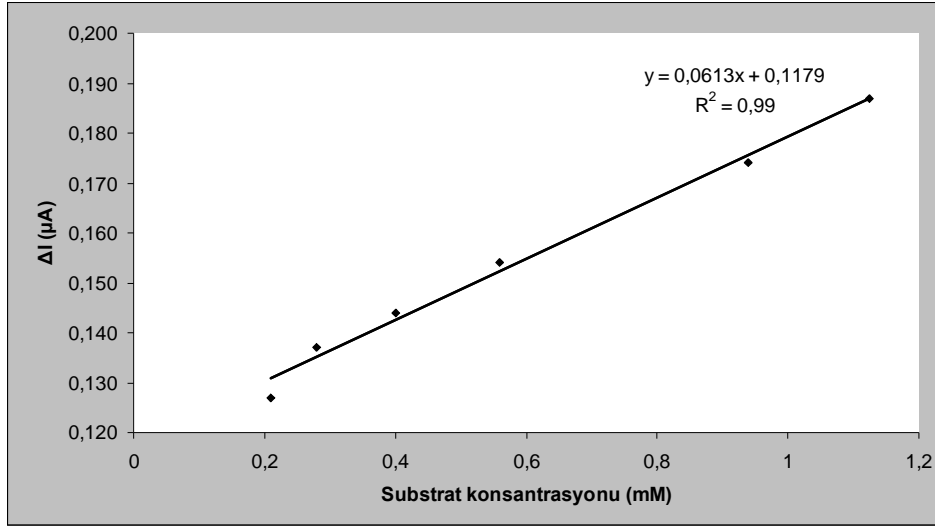


Şekil 4.6. ÇEB’in optimum tampon konsantrasyonu grafiği

4.3. Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

4.3.1. Trioleinin Lineer Çalışma Aralıkları

ÇEB’in çeşitli substrat konsantrasyonlarında biyosensör cevaplarını incelemek ve triolein standart grafiklerini belirlemek amacıyla, trioleinin farklı konsantrasyonları kullanılarak biyosensör cevapları belirlendi. Optimum çalışma koşullarında gerçekleştirilen denemeler sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 4.7’de verildi.

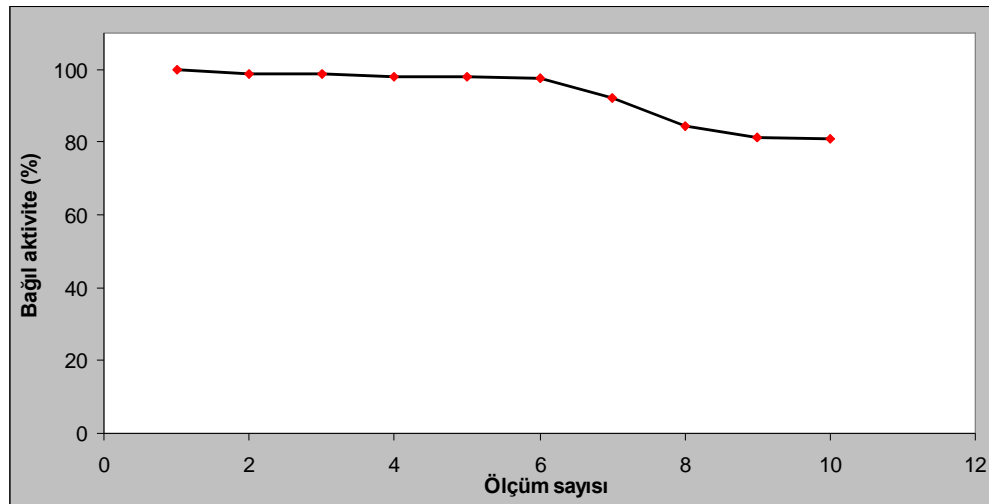


Şekil 4.7. ÇEB için trioleinin lineer çalışma aralıkları grafiği

Şekil 4.7'den da görüldüğü gibi ÇEB'nin lineer tayin aralığı 0.2-1.2 mM olarak belirlendi ve R^2 değeri 0.99 olarak hesaplandı.

4.3.2. Biyosensörün İşlem Kararlılığı

ÇEB'in işlem kararlılığını belirlemek amacıyla, yeni hazırlanan biyosensör daha önceden optimizasyonları yapılan çalışma sıcaklığı (40 °C) ve tamponu içinde (Fosfat tamponu pH 7.0 - 100 mM) bekletilerek 40 dk aralıklarla sabit substrat konsantrasyonlarında ölçümler alındı, sonuçlar Şekil 4.8'de verildi.



Şekil 4.8. ÇEB'in işlem kararlılığı

Şekil 4.8’de görüldüğü gibi ÇEB’nin 6 ölçüm sonunda aktivitesini % 97, 10 ölçüm sonunda % 80 oranında koruduğu belirlendi. Sonuçlar göz önüne alındığında ÇEB’nin işlem kararlılığı bakımından iyi olduğu söylenebilir.

4.3.3. Biyosensör Cevabının Tekrarlanabilirliği

ÇEB ile yapılan analizlerin tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi amacıyla, sabit triolein konsantrasyonlarında optimum koşullarda arka arkaya 6 ölçüm gerçekleştirildi. Elde edilen biyosensör cevaplarından bulunan standart sapma (S.S) ve varyasyon katsayıları Tablo 4.1’de verildi.

Tablo 4.1. ÇEB’in deney sonuçlarının tekrarlanabilirliği

	Triolein Kons. (mM)	Ortalama Değer (mM)	Standart Sapma (mM)	Varyasyon Katsayısı (%)
ÇEB	0.5620	0,5834	±0,02229	3,82

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Son yıllarda dünya genelinde obezite denilen aşırı şişmanlığın ve kalp damar hastalıklarının artması, insanın kan ve idrar gibi vücut sıvılarında lipid miktarı tayininin pratik olarak yapılmasını çok önemli hale getirmiştir. Lipidlerin alt sınıfından olan trigliseridler (nötral yağlar), kan lipidlerinin çoğunluğunu oluşturur. TG seviyesinin 150–190 mg/dl aralığı dışına çıkması insanlarda bazı metabolik bozuklukların olduğuna işarettir. Kandaki TG yüksekliğinin sebeplerine; kronik hepatit, ateroskleroz, ikincil hipolipoproteinemi, nefrotik sendrom ve şeker hastalığı örnek verilebilir [51].

Bugün kanda trigliserid düzeyinin belirlenmesi için birçok farklı biyokimyasal yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları; titrimetrik, spektrofotometrik, florimetrik, kolorimetrik, türbidimetrik, kromatografik, radyometrik, fiziksel, enzimatik ve immünolojik yöntemlerdir.

TG aktivitesi ve TG konsantrasyonlarının belirlenmesi için farklı biyosensörler geliştirilmiştir. Bu tür biyosensör çalışmalarında; lipaz cinsi, elektrot cinsi, ölçüm esası ve immobilizasyon maddelerinin cinsi ve miktarlarının reaksiyon cinsine göre optimize edilmeleri gerekir. Bazı biyosensör çalışmalarında lipazlar, elektrotlara çeşitli immobilizasyon malzemeleri kullanılarak immobilize edilmişlerdir. Bu malzemelerden bazıları; kollajen membran [29], Prusya mavisi modifiye screenprinted elektrot [30], gözenekli silikon [31], selüloz asetat [33] ve polivinil klorür (PVC) dür [32]. Literatürde trigliseridlerin tayinine yönelik ikili ve üçlü enzim sistemleri sınırlı sayıda olduklarından, bu çalışmanın sonuçları tekli ve ikili enzim içeren sensörlerin sonuçları ve çok az sayıdaki çoklu enzim biyosensör çalışmaları ile karşılaştırıldı [30, 32, 33, 61, 62]. Yapılmış olan bu çok enzimli biyosensör çalışmalarında ise biyobileşen olarak saf enzimler yerine ‘enzokit’adı altında lipaz – gliserol kinaz – gliserol 3-fosfat oksidaz enzimleri, aktivatörleri ve koenzimlerini de içeren ve günümüzde TAG lerin tıbbi kurumlarda tayini için de kullanılan bir kit kullanılmıştır. Literatürde bu enzimlerin ayrı ayrı saf olarak bir araya getirilerek kullanıldığı bir çoklu enzim biyosensör çalışmasına rastlanmamıştır.

Bu yüksek lisans tezinde “lipaz – gliserol kinaz – gliserol 3-fosfat oksidaz” dan oluşan üçlü enzim sisteminin biyomalzeme olarak kullanılmasıyla TAG tayini için amperometrik esaslı bir biyosensör geliştirildi. Bu enzimlerin, ATP ve MgCl₂ ile beraber camı karbon çalışma elektrodu yüzeyine immobilize edilmesiyle substrat olarak kullanılan trioleine karşı verdiği biyosensör cevabı incelendi. Hazırlanan ÇEB’in hazırlanma ve çalışma koşullarının optimizasyonu ve biyosensörün karakterizasyonu incelendi.

Biyosensörün immobilizasyon malzemelerinin optimizasyon çalışmalarında;

Jelatin miktarının optimizasyonunda; değişik jelatin miktarlarıyla hazırlanan biyosensörlerde, biyoaktif tabakanın fiziksel dayanıklılıkları jelatin miktarı ile ilişkilidir [57]. Dayanıklı ancak substrat difüzyonunu engellemeyen jelatin miktarı Şekil 4.1’den görüldüğü gibi 1.5 mg/cm² olarak belirlendi. Kartal vd.’nin geliştirdiği enzim temelli pH elektrodu biyosensöründe *C. rugosa* lipazı immobilize edilebilmesi için gerekli jelatin miktarı 20 mg bulunmuştur [53]. Özcan ve Sagirolu’nun hazırlamış olduğu muz dokusu temelli amperometrik biyosensör çalışmasında optimum jelatin miktarı 0.88 mg/cm² ve bakla dokusu temelli amperometrik biyosensör çalışmasında 0.98 mg/cm² olarak verilmiştir (Özcan ve Sagirolu, 2013). Kartal vd.’nin kullandıkları elektrotlar pH elektrotlarıdır [53]. Özcan ve Sagirolu’nun kullandığı elektrotlar bu çalışmada kullanılan elektrot ile aynı olduğundan dolayı elektrot yüzeyindeki jelatin miktarlarının birbirlerine benzer olması beklenen bir durumdur [56].

Glutaraldehit yüzdesinin optimizasyonunda; % 1.5, 2.5 ve 3.5’luk glutaraldehit çözeltileri kullanıldı. Verilere bağlı olarak hazırlanan şekil 4.2’de görüldüğü gibi optimum glutaraldehit yüzdesi % 2.5 olarak bulundu. Kartal vd.’nin geliştirdiği *Candida rugosa* lipazı immobilize pH biyosensöründe optimum glutaraldehit yüzdesi % 2.5 [53], C. Altug ve U. Mengulluoglu’nun geliştirdiği glukoz oksidaz immobilize edilmiş Clark tipi oksijen elektrodu biyosensöründe % 2,5 [55]. Aynı immobilizasyon yönteminin kullanıldığı Özcan ve Sagirolu’na ait, bitkisel doku esaslı bir biyosensör çalışmasında ise optimum glutaraldehit yüzdesinin % 1.25 bulunduğu belirtilmiştir [56].

Biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyon çalışmalarında;

pH optimizasyonunda; fosfat tamponunun (100 mM) pH 'ı 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 9.0 olan tamponlar hazırlandı. Bu tamponlarda hazırlanan biyosensör ile ölçümler yapıldı. Sonuçta; değişen pH'a karşı bağlı aktivite grafiği elde edildi. Şekil 4.6'dan optimum biyosensör cevabı pH: 7.0 olarak bulundu. Setzu vd.'nin geliştirdiği *C. rugosa* lipazının immobilizasyonu için gözenekli silikon esaslı potansiyometrik biyosensörde optimum pH: 7 fosfat tamponu [31], Minakshi ve Pundir'in trigliserid tayini için geliştirdiği amperometrik biyosensör için optimum pH: 6.5 [33], Narang vd.'nin trigliserid tayini için geliştirdikleri amperometrik biyosensör için optimum pH: 7.5 olarak bulunmuştur [32]. Tribütirin ve pestisid tayini için geliştirilen *C. rugosa* lipazının biyobileşen olarak kullanıldığı pH biyosensöründe ise optimum pH: 7.5 fosfat tamponu olarak belirtilmiştir [53]. Mikroemülsiyon esaslı jelle cam elektroda immobilize edilen *C. rugosa* lipazının biyobileşen olarak kullanıldığı bir çalışmada ise optimum pH Tris-HCl tamponunda 8.5 olarak bulunmuştur [58].

Tampon konsantrasyonunun optimizasyonunda; 66, 100, 133 mM derişimlerinde pH: 7.0 fosfat tamponları hazırlandı. Geliştirilen biyosensör ile alınan ölçümlerde en iyi biyosensör cevabı 100 mM'lık tampon ile (pH: 7.0) sağlandı. Kartal vd.'nin çalışmasında pH biyosensöründe en iyi biyosensör cevabı pH: 7.5, 50 mM fosfat tamponu ile [53], Narang vd.'nin çalışmasında bu çalışmadaki enzimlerle aynı enzimler kullanılarak geliştirilen biyosensörde en iyi biyosensör cevabı pH: 7.0, 100 mM fosfat tamponu ile [32], Minakshi ve Pundir'in bu çalışmada kullanılan enzimlerle aynı enzimleri kullanarak trigliserid tayini adına geliştirdiği biyosensörde en iyi biyosensör cevabı pH: 7.0, 100 mM fosfat tamponu ile alınmıştır [33].

Sıcaklığın optimizasyonunda; sırasıyla 25, 30, 40, 45, 50 °C sıcaklıklarda reaksiyonlar gerçekleştirildi. Hazırlanan biyosensör ile alınan biyosensör cevapları yüzde aktivite olarak sıcaklığa karşı grafiklendirildi. Şekil 4.5'ten optimum sıcaklık en yüksek biyosensör cevabının görüldüğü 40 °C olarak bulundu. Kartal vd.'nin geliştirdiği enzim esaslı pH elektrodu biyosensöründe en iyi biyosensör cevabı 30 °C [53], Rejeb vd.'nin geliştirdiği çoklu enzim sistemi temelli amperometrik biyosensörde en iyi biyosensör

cevabı 37 °C [30], Huang vd.'nin geliştirdiği *C. rugosa* lipazının cam elektroda mikroemülsiyon temelli jelle immobilize edildiği çalışmada optimum sıcaklık 37 °C [58], Minakshi ve Pundir'in bu çalışmada kullanılan enzimlerle aynı enzimleri kullanarak trigliserid tayini adına geliştirdiği biyosensörde en iyi biyosensör cevabı 37 °C olarak belirlenmiştir [33].

Trigliseridlerin lineer ölçüm aralığının belirlenmesi için; çeşitli triolein konsantrasyonlarına karşı biyosensörün cevabı belirlenerek Şekil 4.9 grafiği elde edildi. Doğrusal ölçüm aralığı 0.2–1.2 mM triolein olarak belirlendi. Domuz pankreatik lipazının gözenekli silikonla immobilize edilmesiyle trigliseridlerin belirlenmesi için oluşturulan potansiyometrik biyosensör çalışmasında tribütirin substratının 10-25 mM derişimleri aralığı bulunmuştur [59, 60]. Tribütirin tayini için geliştirilen pH biyosensöründe lineer tayin aralığı 0.065-0.455 mM olarak belirlenmiştir [53]. *C. rugosa* lipazının cam elektroda mikroemülsiyon temelli jelle immobilize edildiği çalışmada lineer ölçüm aralığı 0.002-2 mM olarak bulunmuştur [58]. Trigliserid tayini için geliştirilen çoklu enzim biyosensörü çalışmasında lineer ölçüm aralığı 0.1-3.5 mM olarak bildirilmiştir [33]. Gene trigliserid tayini için geliştirilen başka bir çoklu enzim biyosensörü çalışmasında lineer ölçüm aralığı 0.56-2.25 mM olarak bildirilmiştir [32]. Literatür göz önüne alındığında geliştirilen biyosensörün tayin aralığının oldukça iyi olduğu söylenebilir.

Biyosensörün tekrarlanabilirliğinin ve işlem kararlılığının belirlenmesi için; Triolein ile arka arkaya ölçümler alındı. 10 ölçüm için ortalama değer (X_{ort}): 0.04975 mM, standart sapma (S.S): ± 0.00144 ve varyasyon katsayısı (C.V): %2.89 olarak hesaplandı. Cam elektroda *C. rugosa* lipazının mikro emülsiyon esaslı jelle immobilize edildiği çalışmada; 8.6×10^{-5} mol/l zeytinyağı için işlem kararlılığı 7 ölçüm ve varyasyon katsayısı: % 2.8 bulunmuştur [58]. Bazı bitkisel dokularda fenol oksidaz enziminin kullanılabilirliği çalışmasında standart sapma (S.D): ± 0.3294 , varyasyon katsayısı: % 1.4, işlem kararlılığı 7 ölçüm çıkmıştır [63]. Serumda trigliserid tayini için geliştirilen amperometrik enzim biyosensöründe iki farklı immobilizasyon destekleri için varyasyon katsayıları: % 6.2 ve 7.4 bulunmuştur [61]. Etanol tayini için *Candida*

tropicalis hücrelerinin kullanıldığı bir biyosensörün tekrarlanabilirlik çalışmalarında varyasyon katsayısı: % 3.39, işlem kararlılığı 10 ölçüm çıkmıştır [62].

Sonuç olarak;

Bu tez kapsamında trigliserid tayini amacıyla biyoaktif tabakasında farklı enzim sınıflarından üç enzim içeren amperometrik bir biyosensör geliştirildi. Biyoaktif tabaka camsı karbon elektrodu üzerinde hazırlandı. Referans elektrodu Ag/AgCl ve Pt karşıt elektrodu ile birlikte kullanıldı. Potansiyostat kullanılarak sabit potansiyel farkında değişen akım şiddeti ölçüldü.

Biyosensörde camsı karbon elektrodun ucunda biyoaktif tabakanın hazırlamasında kullanılan immobilizasyon materyalleri sebebiyle biyosensörün reaksiyonlar boyunca kararlı olduğu görüldü. Böylece ortamdaki trigliserid derişiminin, hassas ve pratik olarak tayinine olanak sağlayan kullanışlı bir biyosensör elde edildi.

Birbirine bağılı olarak katalitik fonksiyon gösteren üç enzimli biyosensörün immobilize halde biyoaktif tabaka içindeki ortak performanslarının, ortamdaki etkenlerin çokluğu nedeniyle düşük olması beklenir. Ancak bu tez kapsamında hazırlanan çoklu enzim biyosensörünün performansı pratikte kullanılabilir düzeyde bulundu. Geliştirilen çoklu enzim biyosensörünün; biyobileşenleri ve çalışma koşulları optimize edildi ve karakterizasyon çalışmaları yapıldı.

Bu çalışmada; yapılan literatür araştırmaları göz önüne alındığında Türkiye’de ilk kez birden fazla enzimin kullanılmasıyla hazırlanan bir biyosensör geliştirilmiştir.

Literatürde, lipid tayinine yönelik çoklu enzim sistemlerini içeren, tek bir ticari hazır çoklu enzim kitinin enzim kaynağı olarak kullanıldığı biyosensörler bildirilmiştir. Bu çalışmanın farkı; üç farklı saf enzimin ayrı ayrı aynı elektrot yüzeyindeki biyotabaka içinde immobilizasyonlarının yapılmış olmasıdır. Bu metotla trigliserid tayinine yönelik amperometrik bir çoklu enzim temelli bir biyosensör ilk kez tanımlanmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Telefoncu, A., **Mikrobiyal Biyosensörler, Biyosensörler** (Ed. Azmi Telefoncu), Ege Üniversitesi yayınları, 178-185, (1999)
- [2] Dinçkaya, E., **Enzim sensörleri, Biyosensörler** (Ed. Azmi Telefoncu), Ege Ün. Yayınları, 81-142, (1999)
- [3] Clark, L.C.Jr., Lyons, C., **Electrode system for continuous monitoring in cardiovascular surgery**. Ann. NY Acad. Sci. 102: 29-45, (1962)
- [4] Telefoncu, A., **İmmobilize enzimler**, Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu Kitabı, (Ed. Azmi Telefoncu), Ege Üniversitesi yayınları, 183-196, (1997)
- [5] Bartlett, P.N., **Biosensors**, (Cass, A.E.G. ed.), *Oxford University Press*, Oxford, 42. p, (1990)
- [6] Newman, J.D., Tigwell, L.J., Warner, P.J., Turner, A.P.F., **Biosensors: boldly going into the new millennium**, *Sensor Review* 21: 268 – 271, (2001)
- [7] Tombach, B., Schneider, J., Matzkies, F., Schaefer, R.M., Chemnitz, G.C., **Amperometric creatinine biosensor for hemodialysis patients**. *Clinica Chimica Acta*, 312(1-2), 129-134, (2001)
- [8] Sidweel, S.K., Rechnitz, G.A., **Progress and challenges for biosensors using plant tissue materials**. *Biosensors*, 2(4), 221-233, (1986)
- [9] Macholan, L., **Recent progress in developing enzyme and tissue-based membrane electrodes**. *Acta-Biotechnol.*, 7(69), 547-553, (1987)
- [10] D'Souza, S.F., **Microbial biosensors**, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 337-353, (2001)
- [11] Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Dontha, N., Shiraishi, H., Luo, D., Valera, F. S., **Sequence-specific electrochemical biosensing of M. tuberculosis DNA**, *Anal. Chim. Acta*, 337: 41-48, (1997a)
- [12] Wang, J., Rivas, Cai, X., Palecek, E., Nielsen, P., Shirashi, H., Dontha, N., Luo, D., Parrado, C., Chicharro, M., farias, P.A.M., Valera, F.S., Grant, D.H., Ozsoz, M., Flair, M.N., **DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring**. A Review, *Anal. Chim. Acta* , 347: 1-8, (1997b)
- [13] Wang, J., Rivas, G., Fernandes, J.R., Jiang, M., Paz, J.L.L., Waymire, R., Nielsen, T.W., Getts, R.C., **Adsorption and detection of DNA dendrimers at carbon electrodes**, *Electroanalysis*, 10(8): 553-556, (1998)
- [14] McGown, L.B., Joseph, M.J., Pitner, J.B., Vonk, G.P. ve Linn, C.P., **The Nucleic acid ligand: A new tool for molecular recognition**, *Anal. Chem.*, 67: 663 A-668 A,

(1995)

- [15] Wang, J., Nielsen, P., Jiang, M., Cai, X., Fernandes, J.R., Grant, D.H., Ozsoz, M., Beglieter, A., Mowat, M., ***Mismatch sensitive hybridization detection by peptide nucleic acids immobilized on a quartz crystal microbalance***, Anal. Chem., 69: 5200-5202, (1997c)
- [16] Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Ozsoz, M., ***Indicator-free DNA biosensor based on adenine and guanine signals***, Electroanalysis, 14(18): 1245-1250, (2002)
- [17] Brett, A.M., Oliveira, Macedo, T.R.A., Raimundo, D., Marques, M.H., Serrano, S.H.P., ***Voltammetric behaviour of mitoxantrone at a DNA-biosensor***, Biosensors and Bioelectronics, 13: 861-867, (1998)
- [18] Malhotra, B.D., Chaubey, A., ***Biosensor for clinical diagnostics industry***. Sensors and Actuators B, 91, 117-127, (2003)
- [19] Leonard, P., Hearty, J., Brennan, J., Dunne, L., Quinn, J., Chakraborty, T., O’Kennedy, R., ***Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water***. Enzyme and Microbial Technology, 32, 3-13, (2003)
- [20] D’Orazio, P., ***Biosensors on clinical chemistry***. Clinica Chemica Acta, 334, 41-49, (2003)
- [21] Gursoy D., Jurowski C., Uysal M., ***Resident Attitudes: A Structural Modeling Approach***, Annals of Tourism Research, 29(1): 79-105, (2002)
- [22] Luong C., Miller A., Barnett J., Chow J., Ramesha C., Browner M.F., ***Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2***. Nat Struc Biol. 3:927–933, (1996)
- [23] Mello L. D. ve Kubota L. T., ***Review of the Use of Biosensors as Analytical Tools in the Food and Drink Industries***, Food Chemistry, 77, 237-256, (2002)
- [24] Yıldız, A., ***Elektrokimyasal Biyosensörler***, Biyosensörler (Ed. Azmi Telefoncu), Ege Üniversitesi yayınları, 42-50, (1999)
- [25] Killard, A.J., Smith, M.R., ***Creatin biosensors: principles and desings***, Reviews, TIBTECH, 18, 433-437, (2000)
- [26] Paiva A.L., Balcao V.M., Malcata F.X., ***Kinetics and Mechanisms of Reactions Catalyzed by Immobilized Lipases***, Enzyme and Microbial Technology, 27:187- 204, (2000)

- [27] Villeneuve P., Muderhwa J., Graille J., Haas M., *Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches*. J Mol Catal B: Enzym 9:113-148, (2000)
- [28] Türk B., *İmmobilize Lipaz Enzimi Kullanılarak Etil Bütirat Üretimi*, (2008)
- [29] Winartasaputra J., Kutan S.S. ve Guilbault G.C., *Amperometric enzyme determination of triglyceride in serum*. Anal. Chim., 54: 1987–1990, (1982)
- [30] Rejeb BI, Arduini F, Amine A, Gargouri M, Palleschi G., *Amperometric biosensor based on Prussian Blue-modified screen-printed electrode for lipase activity and triacylglycerol determination*. Anal Chim Acta 594:1–8, (2007)
- [31] Setzu S., Salis S., Demontis V., Salis A., Monduzzi M., Mula Guido., *Porous silicon-based potentiometric biosensor for triglycerides*. Phys. Stat. Sol. 204: 1434–1438, (2007)
- [32] Narang J, Bhambi M, Minakshi, Pundir CS., *Fabrication of an amperometric triglyceride biosensor based on PVC membrane*. Anal Lett 2010;43:1–10, (2010a)
- [33] Minakshi, Pundir C.S., *Construction of an amperometric enzymic sensor for triglyceride determination*. Sens Actuat B: Chem 133:251–5, (2008)
- [34] Schmidt Rolf D. ve Verger Robert., *Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications*. Angewandte Chemie (International ed. in English), 37: 1608-1633, (1998)
- [35] Bornscheuer U.T., Kazlauskas R.J., *Hydrolases in organic synthesis- regio- and stereoselective biotransformations*. Wiley-VCH, Weinhei, (1999)
- [36] Drauz K. ve Waldman H, (eds.), *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim. Volumes 1-3, (2002)
- [37] Faber K., *Biotransformations in organic chemistry*, Springer-Verlag, Berlin, 330-331, (2004)
- [38] Vakhlu J., *Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning*. Electronic Journal of Biotechnology 0717-3458 Vol.9 No.1, (2006)
- [39] Redondo O., Herro A., Bello J.F., Roig M.G., Calvo M.V., Plou F.J. ve Burguillo F.J., *Comparative kinetic study of lipases A and B from Candida rugosa in the hydrolysis of lipid P-nitrophenyl esters in mixed micells with triton X-100*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1243: 15-24, (1995)
- [40] Pandey Ashok, Benjamin Sailas, Soccol Carlos R., Nigam Poonam, Krieger Nadia ve Soccol, Vanete T., *The realm of microbial lipases in biotechnology*. Biotechnology and Applied Biochemistry, vol. 29: 119-131, (1999)

- [41] T. Selwood and E. K. Jaffe., ***Dynamic dissociating homo-oligomers and the control of protein function.***, Arch. Biochem. Biophys. 519 (2): 131–43, (2011)
- [42] Rose, P.J., Mark, H.F., Bikales, N.M., Overberger, C.G., Menges, G., Kroschwitz, J.I., ***Encyclopedia of polymer science and engineering***, vol.7, Wiley Interscience, New-York. 89, (1987)
- [43] Sezgintürk, M.K., Göktuğ, T., Dinçkaya, E., ***Detection of benzoik asit by an amperometric inhibitor biosensor on mushroom tissue homogenate***, Food Technol. Biotechnol. 43 (4), 329-334, (2005)
- [44] Odacı, D., Timur, S., Telefoncu, A., ***Immobilized Jerusalem Artichoke (Helianthus tuberosus) Tissue Electrode for Phenol Detection***, Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology, 32, 2, 315-323, (2004)
- [45] Espesito, E., Cortesi, R., Nastrazzi, C., ***Gelatin microspheres: influence of preparation parameters and thermal treatment on chemico-physical and biopharmaceutical properties***, Biomaterials, 20, 2009-2020, (1995)
- [46] HSDB., ***Hazardous Substances Data Bank***. National Library of Medicine, Bethesda, MD (TOMES CD-ROM Version). Denver, CO: Micromedex, Inc. (1996)
- [47] Thomas, S., Russell, A.D., ***Temperature-Induced Changes in the Sporocidal Activity and Chemical Properties of Glutaraldehyde***, Applied Microbiology, 28(3), 331-335, (1974)
- [48] Kapoor, M., ***How to cross-link proteins***, Cellular, Molecular and Microbial Biology Division, University of Calgary, Calgary, Canada, T2N 1N4, (1996)
- [49] Sezgintürk, M.K., Dinçkaya, E., ***Direct determination of sulfite in food samples by a biosensor based on plant tissue homogenate***, Talanta 65, 998-1002, (2004a)
- [50] Akyılmaz, E., Dinçkaya, E., ***A mushroom (Agaricus bisporus) tissue homogenate based alcohol oxidase electrode for alcohol determination in serum***, Talanta, 53, 505-509, (2000)
- [51] Haim M., Benderly M., Brunner D., Behar S., Graff E., Reicher-Reiss H., Goldbourt U., ***Elevated Serum Triglyceride Levels and Long-Mortality in Term Patients With Coronary Heart Disease***, BIP, (1999)
- [52] Deeth H.C. ve Touch V., ***Methods for detecting lipase activity in milk and milk products***. Aust. J. Dairy Technol. 55(2), 153-168, (2000)
- [53] Kartal F., Kılınç A., Timur S., ***Lipase biosensor for tributyrin and pesticide detection***, International Journal of Environmental and Analytical Chemistry 87: 715–722, (2007)

- [54] E. Yorganci, E. Akyılmaz, *Alkaline Phosphatase Based Amperometric Biosensor Immobilized by Cysteamine-Glutaraldehyde Modified Self-Assembled Monolayer*, Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology, 39: 317–323, (2011)
- [55] C. Altug, U. Mengulluoglu, *A Novel Biosensor Based on Glucose Oxidase for Activity Determination of α – Amylase*, Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology, 39: 298–303, (2011)
- [56] Özcan M. H., Sagiroglu, A., *A novel amperometric biosensor based on banana peel (Musa cavendish) tissue homogenate for determination of phenolic compounds*, Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology an International Journal, 38, (4), 208–214, (2010)
- [57] Yahşi, A., *Aljinat jel boncukları ve poli(akrilamid-ko-akrilik asit) hidrojellerle tirozinaz enziminin binari yöntemi ile immobilizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 17-25, (2005)
- [58] Huang XR, YZ Li, GL Yang, LL Liu, YB Qu ve WJ Zhang., *A novel method for fabrication of a glass-electrode-based lipase sensor*. Chinese Chemical Letters 12(5):4536, (2001)
- [59] Reddy R.R.K., Chadha A. ve Bhattachary A., *Porous silicon based potentiometric triglyceride biosensor*. Biosensors and Bioelectronics 16(4-5):313-7, (2001)
- [60] Reddy R.R.K., Basu I. ve Bhattachary E., *Estimation of triglycerides by porous silicon based potentiometric biosensor*. Current Applied Physics 3:155-161, (2003)
- [61] Narang J, Bhambi M, Minakshi, Pundir CS., *Determination of serum triglyceride by enzyme electrode using covalently immobilized enzyme on egg shell membrane*. International Journal of Biological Macromolecules 47, 691–695, (2010b)
- [62] Akyılmaz E. ve Dinçkaya E., *An Amperometric Microbial Biosensor Development based on Candida tropicalis Yeast Cells for Sensitive Determination of Ethanol*, Biosensors and Bioelectronics, (20), 1263–1269, (2004)
- [63] Sagiroglu A., Ozcan H.M., Hasancebi O., *Scanning of Some Herbal Tissues to be Used with Biosensors as Polyphenol Oxidase Enzyme Source*. Hacettepe J. Biol. & Chem., 37 (4) 303-312, (2009)

http://en.wikipedia.org/wiki/Gum_arabic

ÖZGEÇMİŞ

30.05.1988 tarihinde İstanbul'da doğdum. İlk öğrenimimi İlhami Ahmet Örnekal İlköğretim Okulunda, orta öğrenimimi Behiye Dr. Nevhiz Işıl Anadolu Lisesinde tamamladım. 2007 yılında Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde lisans eğitimime başlayıp, 2011 yılında tamamladım. 2011 yılında başladığım Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimimi sürdürmekteyim.