



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ÇAPRAZ BAĞLI ETOKSİLE AKRİLAT REÇİNESİNE ENZİM İMMOBİLİZASYONU

GAREN KARABURUN

520620002

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Efe Baturhan ORMAN

EŞ-DANIŞMAN

Prof. Dr. Ayşe Ogan

İSTANBUL, 2024



MARMARA UNIVERSITY
INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES
IN PURE AND APPLIED SCIENCES



ENZYME IMMOBILIZATION ON CROSS- LINKED ETHOXYLATE ACRYLATE RESIN

GAREN KARABURUN

520620002

MASTER THESIS

Department of Chemistry
Biochemistry Programme

Thesis Supervisor

Asst. Prof. Efe Baturhan ORMAN

Thesis CO- Supervisor

Prof. Dr. Ayşe Ogan

İSTANBUL, 2024

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın danışmanlığını yürüten Marmara Üniversitesi Fen Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Efe Baturhan ORMAN'a bana sunduğu multidisipliner çalışma olanağı için teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım sırasında her türlü desteği sunan, değerli hocam ve eş-danışmanım Sayın Prof. Dr. Ayşe OGAN'a, en içten minnettarlığımı ifade ederim. Çalışmalarım esnasında desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Emrah ÇAKMAKÇI'ya minnet borçluyum. Bana biyokimya alanında kattıkları bilgiler için Prof. Dr. Serap DEMİR ve Prof. Dr. Özkan DANIŞ hocalarıma şükranlarımı sunarım. Hocam olarak gördüğüm, Biyokimya Programı doktora öğrencisi Nazenin AKIN'a çok şey borçluyum; yetişmesinde emeği geçen ilk öğrencilerinden biri olmanın gururunu yaşıyorum.

Yıllar boyunca, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve beni yetiştirmek için nice emek veren sevgili aileme şükranlarımı sunuyorum.

Mezuniyet tezi yazım süreci, benim tez çalışmamla örtüşen ve tezlerimizi yazarken, günlerce birbirimizi motive edip dayanıştığımız değerli arkadaşım Kevser MERT'e minnettarım. Tez çalışmam boyunca çeşitli zamanlarda desteklerini esirgemeyen Şant ESMER ve Indeira'ya teşekkürlerimi iletiyorum.

Mart 2024

Garen KARABURUN

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
SEMBOLLER.....	ix
KISALTMALAR.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
TABLO LİSTESİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	14
1.1. Enzimler.....	15
1.1.1. Enzimlerin Genel Özellikleri	15
1.1.2. Enzim Aktivitesi	16
1.1.3. Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörler	16
1.1.3.1. Substrat ve Enzim Konsantrasyonu	16
1.1.3.2. Sıcaklık	16
1.1.3.3. pH.....	17
1.1.3.4. İnhibitörlerin varlığı.....	17
1.2. A-Amilaz	20
1.2.1. Substrat	20
1.2.2. A-Amilazların Yapısı.....	20
1.3. A-Amilaz Enziminin Endüstriyel Kullanımı	23
1.3.1. Nişasta Dönüşümü: Glukoz, Fruktöz ve Çikolata Şurupları Üretimi	23
1.3.2. Gıda Endüstrisi	24
1.3.3. Alkol Endüstrisi	24
1.3.4. Deterjan Endüstrisi	24
1.3.5. Tekstil Endüstrisi	25
1.3.6. Klinik ve Tıbbi Uygulamalar	25
1.3.7. Yakıt Alkolü Üretimi	25
1.3.8. Kâğıt Endüstrisi	26
1.4. Enzim İmmobilizasyonu ve Yöntemleri	26
1.4.1. Adsorpsiyon İmmobilizasyonu	26
1.4.2. Kovalent Bağlama İmmobilizasyonu.....	27
1.4.3. Hapsetme İmmobilizasyonu	28
1.4.4. Çapraz Bağlama İmmobilizasyonu	29
1.4.5. Afinite İmmobilizasyonu	30
1.4.6. İyonik Bağlama İmmobilizasyonu.....	31

1.4.7. Metal-Organik Çerçeve İmmobilizasyon.....	31
1.5. Fotopolimerizasyon	32
1.6. Çapraz Bağlı Etoksile Akrlat Reçine (Cross-Linked Ethoxylate Acrylate Resin, CLEAR) Polimeri	34
1.7. Biyosensörler	35
1.7.1. Elektrokimyasal Biyosensör Tasarımında Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar	36
1.7.2. Elektrokimyasal Biyosensör Seçiminde Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar	36
1.7.3. Elektrokimyasal Hücre Tasarımı	37
1.7.4. Elektroanalitik Yöntemler.....	39
1.8. Elektrokimyasal Biyosensör Tipleri	39
1.8.1. Amperometrik Biyosensörler.....	39
1.8.2. Potansiyometrik Biyosensörler	40
1.8.3. Kondüktometrik Biyosensörler.....	40
1.9. Elektrokimyasal Ölçüm Teknikleri.....	40
1.9.1. Dönüşümlü Voltametri (Cyclic Voltametry, CV).....	41
1.9.2. Kare Dalga Voltametrisi (Square-Wave Voltametry, SWV).....	42
2. MATERYAL ve METOT	44
2.1. Materyal.....	44
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler	44
2.1.2. Kullanılan Cihazlar	45
2.2. Metot.....	46
2.2.1. Polimerin sentezi.....	46
2.2.2. Polimerik Desteğin Karakterizasyonu	46
2.2.3. A-Amilaz'ın İmmobilizasyonu.....	47
2.2.4. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini	47
2.2.5. Maltoz Standart Grafiğin Hazırlanması	47
2.2.6. Enzim Aktivitesi Tayini.....	48
2.2.7. pH'a Bağlı Olarak İmmobilize Enzimin Aktivite Değişikliği	48
2.2.8. Sıcaklığa Bağlı Olarak İmmobilize Enzimin Aktivite Değişimi	49
2.2.9. Enzim Kinetiğinin İncelenmesi	49
2.2.10.İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi	49
2.2.11.İmmobilize Enzimler Üzerine Depolama Kararlılıklarının Etkisi.....	49
2.2.12.Biyosensör Tasarımı	49
2.2.13.Biyosensör Ölçümleri	50
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	52

3.1. CLEAR Polimerinin Karakterizasyonu	52
3.2. Polimerik Desteğe İmmobilize Olan Enzim Miktarının Hesaplanması	52
3.3. Maltoz Standart Grafiği	54
3.4. pH'a Bağlı Olarak İmmobilize ve Serbest Enzimin Aktivite Değişimi	55
3.5. Sıcaklığa Bağlı Olarak İmmobilize ve Serbest Enzimin Aktivite Değişimi.....	57
3.6. Enzim Kinetiğinin İncelenmesi	58
3.7. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi	59
3.8. Serbest ve İmmobilize Enzim Üzerine Depolama Kararlılıklarının Etkisi	60
3.9. Biyosensör Ölçümleri	61
4. SONUÇLAR.....	63
KAYNAKLAR.....	66
ÖZGEÇMİŞ	81

ÖZET

ÇAPRAZ BAĞLI ETOKSİLE AKRİLAT REÇİNESİNE ENZİM İMMOBİLİZASYONU

Enzim immobilizasyonu, enzimlerin bir katı destek veya matris üzerine fiziksel veya kimyasal olarak bağlanması sürecidir, bağlanma işlemi emilim, kovalent bağlanma, afiniteli immobilizasyon, hapsolme gibi yöntemlerle gerçekleştirilir. Bu işlemler, enzimlerin optimum çalışma koşullarını, pH ve sıcaklık gibi özelliklerini değiştirebilir. İmmobilize edilmiş enzimler serbest enzimlerden farklı olarak endüstriyel süreçlerde birden fazla kez kullanılabilir.

α -amilaz, nişasta moleküllerindeki α -(1,4)-glikozidik bağları hidrolizleyen, özgülüğü yüksek bir enzimdir. Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi çeşitli kaynaklardan elde edilebilir. Amilazlar dünya enzim pazarının yaklaşık %30'unu oluşturur. Gıda, deterjan, kağıt, tekstil, klinik ve tıbbi, biyo-alkol üretimi, atık su arıtma gibi çeşitli endüstrilerde yaygın olarak kullanılırlar. Özellikle gıda endüstrisinde amilazlar; glukoz, fruktoz ve çikolata şurupları üretimi, ekmek ve kek yapımı sırasında dokuyu ve hacmi değiştirme, mayalanmış alkollü içeceklerin üretimi gibi birçok alanda kullanılır.

Çalışmamızda, gıdalarda kullanılabilen yüksek güvenli bir malzeme oluşturma amacıyla monomerleri biyolojik olarak uyumlu ve düşük toksisite seviyelerine sahip olan CLEAR-epoksi tabanlı bir fotopolimer sentezlenmiş ve FT-IR ile karakterize edilmiştir. Karakterizasyon işleminin ardından α -amilaz fotopolimer yüzeyine kimyasal olarak immobilize edilmiştir. Immobilizasyon verimliliği, immobilize enzimin aktivitesi ve aktivite üzerindeki pH ve sıcaklık etkisi, tekrar kullanılabilirliği, depolama kararlılığı ile enzim kinetiği belirlenmiş ve serbest enzimle kıyaslanmıştır. Immobilize edilmiş α -amilazın aktivitesi serbest enzime göre yaklaşık 10 kat daha azdır. Sonuçlarımıza göre, α -amilazın % 27'si immobilize edilmiştir. Asidik ortamda immobilize enzim, serbest enzime göre daha iyi bir aktiviteye sahiptir ve maksimum verimliliğe pH 6.5'te ulaşmıştır. Bulgular bize CLEAR-epoksi tabanlı foto-polimerle immobilize edilmiş α -amilazın asit ortamı endüstriyel koşullarda kullanılabileceğini göstermektedir. Tekrar kullanılabilirliği değerlendirmek için art arda 15 kullanımın sonunda, ılımlı koşullar altında (30°C) immobilize enzimin bağıl aktivitesinin %80.36 olduğu, ekstrem koşullarda (60°C) ise %75.66 olduğu görülmüştür. Depolama kararlılığı denemeleri sonucunda ise 60. gün sonunda immobilize α -amilaz aktivitesinin %68.43'ünü koruduğu bulunmuştur. Immobilize α -amilaz için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla, 0,735 mg.ml⁻¹ ve 27,624

$\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında, elektrokimyasal temelli biyosensörlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bunun için indiyum kalay oksit (ITO) elektrodunun yüzeyine değişik kaplama teknikleri ile α -amilaz, immobilize edilmiştir. Modifiye elektrot yüzeyinde kaydedilen ölçümler; söz konusu polimer ile modifiye edilmiş ITO elektrodunun elektrokimyasal olarak aktif olduğunu ve potansiyel bir biyo-algılama ünitesi olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Mart 2024

Garen KARABURUN

ABSTRACT

ENZYME IMMOBILIZATION ON CROSS-LINKED ETHOXYLATE ACRYLATE RESIN

Enzyme immobilization is a process of physically or chemically attaching enzymes on a solid support or matrix via absorption, covalent binding, affinity immobilization, entrapment. These processes may modify the optimum working conditions of enzymes such as pH and temperature. Immobilized enzymes can be used several times unlike free enzymes in industrial processes. These properties make the immobilization of enzymes a favorable technique to the industry.

α -amylase is a highly specific hydrolytic enzyme that breaks down α -1,4-glycosidic linkage in starch molecules. As a cofactor α -amylase has a calcium ion (Ca^{2+}) which stabilizes the three-dimensional structure and works as an allosteric activator. They can be obtained from several sources, such as plants, animals and microorganisms. Amylases account for approximately 30% of the world's enzyme market. It is commonly used in various industries such as food, detergent, paper, textile, clinical and medical, production of fuel alcohol, treatment of waste water. Significantly in the food industry, amylases find numerous uses including; production of glucose, fructose and chocolate syrups, changing texture and volume when baking breads and cakes, production of fermented alcoholic beverages.

In our study, α -amylase was chemically immobilized to a photo-cured polymeric surface with the intent of creating a rapidly-producible material that is food grade. Photo-curing polymerization technique acquires a quick transformation of a liquid monomer into a solid film. Monomers of the studied polymer are biocompatible and have low toxicity levels. The CLEAR-epoxy-based photo-curable polymer was synthesized and characterized by FT-IR. Immobilization efficiency, effect of pH and temperature on activity, kinetics, reusability and storage stability were determined. According to our results, 27% of α -amylase was immobilized. Immobilized α -amylase showed better activity in acidic conditions than free enzymes, with maximum efficiency at pH 6.5. This indicates that α -amylase immobilized to CLEAR-epoxy-based photocurable polymer can be utilized in industrial processes with acidic conditions. After 15 consecutive uses, it was observed that under moderate conditions (30°C), the relative activity of the immobilized enzyme was 80.36%, while under extreme conditions (60°C), it was 75.66%. Regarding storage

stability, it was found that the immobilized α -amylase retained 68.43% of its activity on the 60th day. The K_m and V_{max} values for immobilized α -amylase were found to be 0.735 mg.ml^{-1} and $27.624 \text{ }\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$, respectively.

In this thesis work, the development of electrochemical-based biosensors is aimed. For this purpose, alpha-amylase has been immobilized on the surface of indium tin oxide (ITO) electrode using different coating techniques. Measurements recorded on the modified electrode surface showed that the polymer modified ITO electrode is electrochemically active and has the potential to serve as a biosensing unit.

March 2024

Garen KARABURUN



SEMBOLLER

°C	: Derece santigrat
M	: Molar
mM	: Milimolar
μM	: Mikromolar
U	: Enzim ünitesi
dk	: Dakika
L	: Litre
mL	: Mililitre
μL	: Mikrolitre
g	: Gram
mg	: Miligram
μg	: Mikrogram
cm	: Santimetre
nm	: Nanometre
%	: Yüzde
Ag	: Gümüş
Pt	: Platin
AgCl	: Gümüş klorür
pH	: Power of hydrogen
Hg	: Civa
Hg₂Cl₂	: Civa klorür
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
O₂	: Oksijen molekülü

KISALTMALAR

ATR : Zayıflatılmış Toplam Yansıma/Attenuated Total Reflection

CLEAR : Çapraz Bağlı Etoksile Akrilat Reçine

CV : Dönüşümlü Voltametri

ES : Enzim-Substrat

ESI : Enzim-Substrat-Inhibitör Kompleksi

FT-IR : Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

IR : Kızılötesi/Infrared

ITO : İndiyum Kalay Oksit

K_m : Michelis-Menten Sabiti

SWV : Kare Dalga Voltametrisi

UV : Morötesi/Ultraviole

V_{maks} : Maksimum Hız

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 Yarışmalı inhibitör kinetiği.....	18
Şekil 1.2 Yarışmasız Tip I (nonkompetatif) inhibitör kinetiği.....	18
Şekil 1.3 Enzim kinetiğinin geri dönüşümlü inhibitörlerin sınıflandırılması için kinetik testi.....	19
Şekil 1.4 Amiloz ve amilopektin yapıları.....	20
Şekil 1.5 A- A-Amilazların genel yapısı. B- Domuz pankreatik alfa-amilazı C- a- İnsan α -amilaz'ındaki ve b- Domuz pankreatik α -amilaz'ındaki loop bölgeleri.....	22
Şekil 1.6 Metakrilat fotopolimerizasyonu.....	34
Şekil 1.7 Tipik bir biyosensör örneği.....	37
Şekil 1.8 En yaygın kullanılan dört voltametri yöntemi.....	41
Şekil 2.1 Polimerik desteğin sentezi ve α -amilaz immobilizasyonu.....	45
Şekil 2.2 Biyosensör üretimi ve ölçümlerin alınması.....	49
Şekil 3.1 GMA'nın ve fotokürlenmiş polimerin enzim immobilizasyonu öncesi ve sonrası ATR-FT-IR spektrumları.....	50
Şekil 3.2 Bradford yöntemiyle hazırlanmış protein standardı grafiği.....	51
Şekil 3.3 Maltoz standart grafiği.....	52
Şekil 3.4 İmmobilize ve Serbest Enzimin pH'a Bağlı Olarak Aktivite Değişimi.....	53
Şekil 3.5 İmmobilize Enzimin 1. ve 21. Gün pH Değişimi.....	54
Şekil 3.6 İmmobilize ve serbest enzimin sıcaklığa bağlı olarak aktivite değişimi.....	55
Şekil 3.7 Enzim Kinetiği – Lineweaver-Burk Grafiği.....	56
Şekil 3.8 İmmobilize enzimin ılımlı koşullarda tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi.....	57
Şekil 3.9 İmmobilize enzimin ekstrem koşullarda tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi.....	57
Şekil 3.10 İmmobilize ve serbest enzimin bağlı depolama kararlılığı grafiği.....	58
Şekil 3.11 CLEAR-ITO elektrodunun, 10 mM fosfat tamponu ve pH 6.5 çözelti ortamında, A- farklı tarama hızlarında kaydedilen dönüşümlü voltametri ölçümlerini (CV), B- ise kare dalga voltametrisi ile kaydedilen ölçümleri.....	62

TABLO LİSTESİ

Tablo 1 İmmobilizasyon çözeltisinde başlangıçtaki, sondaki (polimerik desteğe bağlanmayan), polimerik desteğin bir gramına bağlanan enzim miktarları (mg) ve bağlanma yüzdesi.	53
---	----



1. GİRİŞ

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki çeşitli metabolik ve hücrel süreçlerde katalizör olarak görev alan önemli moleküllerdir. Bu biyokatalizörlerin endüstriyel uygulamalarda daha verimli kullanılabilmesi için immobilizasyon adı verilen bir işlemle sabitlenmeleri gerekmektedir. İyi bir immobilizasyon yöntemi, enzimlerin stabilitesini ve aktivitesini koruyarak verimliliği optimize etmeyi amaçlar. Enzim immobilizasyonunun bir amacı da endüstriyel uygulamalarda maliyetin düşürülmesidir.

Dünya pazarında enzimlerin önemli bir yeri vardır ve α -amilaz da bu pazarda öne çıkan bir konumda bulunmaktadır. Endüstriyel enzimler arasında öne çıkan α -amilaz, geniş bir kullanım alanına sahiptir. Özellikle nişasta endüstrisinde önemli bir rol oynayan bu enzim, nişastanın çeşitli ürünlere dönüştürülmesi katalizler. α -amilaz, nişasta hidrolizi sürecinde α -(1,4)-glikozidik bağları hidroliz ederek α -limit dekstrinlere, oligosakkaritlere, maltoza ve glukozu dönüşüm sağlar. Bu özellik, glukoz, fruktoz ve çikolata şurupları gibi endüstriyel ürünlerin üretiminde kritik bir rol oynar. Nişasta endüstrisinin yanı sıra gıda, alkol, deterjan, tekstil, klinik ve tıbbi uygulamalar, yakıt alkolü üretimi ve kâğıt endüstrisi gibi farklı sektörlerde kullanım alanlarına sahip olmasından dolayı α -amilaza endüstriyel bir önem kazandırır.

Enzimlerin immobilizasyonu, bu önemli biyokatalizörlerin etkin ve verimli bir şekilde kullanılmasını sağlamak adına kritik bir adımdır. α -amilaz için kullanılan en önemli immobilizasyon yöntemlerinden biri, kovalent bağlama immobilizasyonudur. Bu yöntem, enzimleri kovalent bağlarla destek materyaline bağlar. Bu sayede enzimlerin ayrılması ve süzüntü halinde çıkmasının önünü geçirir. Immobilizasyon işlemi tek sefer kullanımla sınırlı enzimleri tekrar kullanılabilir hale getirir. Ayrıca, serbest haliyle karşılaştırıldığında α -amilazın, farklı pH'larda, sıcaklıklarda ve depolama süresince daha stabil kalmasını sağlar. İyi bir immobilizasyon işlemi, immobilize edilen enzimi pH, sıcaklık, depolama kararlılığı yönünden daha kararlı hale getirirken aktivitesinde ve kinetiğinde azalmaya neden olmamalıdır.

CLEAR-epoksi tabanlı fotopolimerin monomerleri biyolojik olarak uyumludurlar ve düşük toksisite seviyelerine sahiptirler. Bu sayede kullanılan polimer gıda endüstrisinde kullanılmak için uygundur. Kovalent immobilizasyon yöntemi sayesinde CLEAR-epoksi tabanlı fotopolimerle immobilize edilmiş α -amilazın süzüntü ile çıkması ihtimali azdır.

Bununla beraber enzimin kendiliğinden-monte-edilmiş-tek-katman (SAM) halinde immobilizasyonu yüksek homojenizasyon sağlar ve immobilize enzim miktarının kontrolüne olanak tanır.

1.1. Enzimler

1.1.1. Enzimlerin Genel Özellikleri

Vücut koşullarında, birçok biyolojik reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek hızlandırabilen enzimler hem sentez hem de biyo-parçalama reaksiyonları için gerekli moleküllerdir. Bu nedenlerle, bilimsel olarak biyokatalizörler olarak isimlendirilirler. Çoğu enzimler, ribozimler dışında protein yapısına sahiptirler. Enzimler, oldukça seçicidirler, bu da kimyasal katalizörlerle benzerdir (Dalby, 2003). Enzimler, uygun şartlar sağlandığında in vitro da faaliyet gösterebilir. Bu özellik, enzimlerin endüstriyel alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmasına olanak sağlamıştır.

Bazı enzimler basit proteinlerden oluşmaktadır. Bazı enzimler ise, apoenzim ve koenzim olmak üzere iki farklı yapıdan oluşur. Apoenzim, enzimlerin proteinden oluşan bölümüdür. Apoenzime katalitik aktivite gösterebilmesi için yardımcı olan ve kendisi proteinden oluşmayan moleküllere "kofaktör" denir. Enzimlerin esas işlevini yerine getiren kofaktör, apoenzimden daha küçük bir yapıya sahiptir. Kofaktör bir metal iyonu veya protein yapısında olmayan bir organik grup olabilir (Broderick, 2001). Bazı enzimler ise bu iki yapıya da ihtiyaç duyarlar. Protein yapıda olmayan organik yapı, enzimin apoenzim bölümüne kovalent bağ ile bağlıysa "prostetik grup" olarak adlandırılır; eğer bu bağ sıkı değilse ve apoenzim bölümünden ayrılabilirse, bu yapı "koenzim" olarak adlandırılır (Bisswanger, 2014). Apoenzim ve koenzim yapılarının birleşimi "haloenzim" (bileşik enzim) olarak adlandırılır. Bu durumda haloenzim, katalitik olarak işlev görür. Aynı kimyasal tepkiyi katalize eden farklı protein yapılarına sahip enzimler "izozim" ya da "izoenzim" olarak adlandırılır. Enzimlerin özel olarak etki ettiği maddeye "substrat" denir. Kimyasal tepkimenin sonunda ortaya çıkan madde ise "ürün" olarak adlandırılır (Şener, 2019).

Enzimler, çok geniş bir etki yelpazesi sergilerler, bu nedenle sınıflandırılmaları gerekir. Enzimlerin sınıflandırılması için her bir enzime, Enzim Komisyon Numarası (EC) denilen bir numara verilmiştir ve bu numara dört bölümden oluşur. İlk bölüm, enzimin sınıfını belirtir; ikinci bölüm, alt sınıfını tanımlar ve genellikle dahil olan bileşiğin veya grubun türü hakkında bilgi içerir; üçüncü bölüm, enzimin türünü daha da belirtir; dördüncü bölüm ise enzimin seri numarasını gösterir (McDonald ve Tipton, 2014).

Enzimler altı sınıfa ayrılır. Bunlar;

- 1) Oksidoredüktazlar (EC1),
- 2) Transferazlar (EC2),
- 3) Hidrolazlar (EC3),
- 4) Liyazlar (EC4),
- 5) İzomerazlar (EC5),
- 6) Ligazlar (EC6) şeklinde sıralanır (Tao, Dong, Teng ve Zhao, 2020).

1.1.2. Enzim Aktivitesi

Enzimler, biyolojik ortamlarda düşük miktarlarda bulunsalar da etkinliklerini sergileyebilirler. Enzim miktarının kısıtlılığı nedeniyle, miktar yerine enzim etkinliği ölçümü tercih edilir. Bu, belirli bir süre içinde, optimum koşullarda, enzim tarafından substratın ürüne dönüştürüldüğü miktar olarak tanımlanır. Enzim ünitesi, 25°C’de, optimum koşullarda, bir dakikada 1 mikromolar substratı ürüne çeviren enzim miktarıdır.

1.1.3. Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörler

1.1.3.1. Substrat ve Enzim Konsantrasyonu

Enzim miktarının sabit kaldığı koşulda, substrat konsantrasyonu arttıkça reaksiyon hızı da artar. Tüm enzimlerin aktif yüzeyleri doygunluğa ulaştığında ise reaksiyon hızı sabitlenir (Sousa, Ramos, Lim ve Fernandes, 2015).

1.1.3.2. Sıcaklık

Optimum sıcaklık, enzimlerin en iyi aktivite sergilediği sıcaklık değeridir ve farklı enzimlerin optimum sıcaklıkları farklı olabilmektedir. Genellikle, memeli canlılara ait enzimleri fizyolojik koşullar altında (37 °C) optimum işlev gösterirler. Reaksiyon

sıcaklığının değişmesi, enzimatik aktivitenin kaybına ve/veya proteinin denatürasyonuna neden olabilir (Frankenberger ve Johanson, 1982).

1.1.3.3. pH

Optimum pH, enzimlerin en iyi aktivite sergilediği pH değeridir ve farklı enzimlerin optimum pH'ları farklı olabilmektedir. Enzim, bu pH değerinden uzaklaştıkça aktivite kaybı yaşar. pH yüksekliği veya alçaklığı nedeniyle enzim denatüre olduğunda, aktivite değeri sıfırlanır (Frankenberger ve Johanson, 1982).

1.1.3.4. İnhibitörlerin varlığı

İnhibitörler enzime geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz bağlanabilen ve aktivitesini durduran maddelerdir. İnhibitörlerin; geri dönüşümsüz ve geri dönüşümlü çeşitleri vardır. Geri dönüşümlü inhibitörler ise kendi aralarında yarışmalı, yarışmasız tip I (nonkompetatif), yarışmasız tip II (ankompetatif) ve karışık inhibitörler olarak dört grupta değerlendirilebilirler (Aziz Amine, Mohammadi, Bourais ve Palleschi, 2006; Bachan Upadhyay ve Verma, 2013; Şener, 2019).

1) Geri Dönüşümsüz İnhibitörler

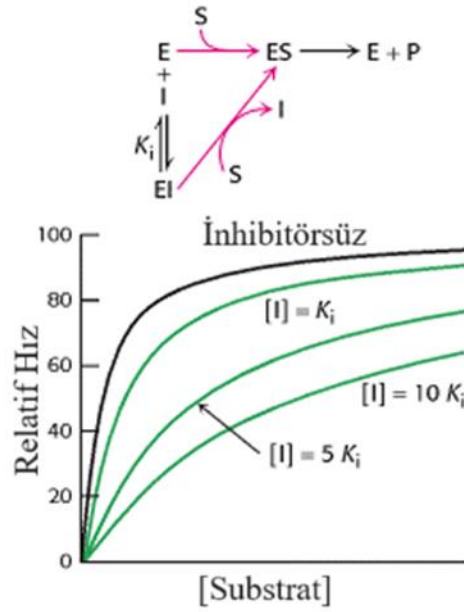
İnhibitör, enzime veya enzim-substrat kompleksine kovalent bağ ile bağlanır. Substratın enzime bağlanmasını engeller. Enzim-İnhibitör Kompleksi (EI) ayrışamaz.

2) Geri Dönüşümlü İnhibitörler

İnhibitör, kovalent olmayan; hidrofobik etkileşimler, iyonik bağlar ve van del Waals etkileşimleri ile enzime bağlanır. İnhibitör ortamdan uzaklaştırıldığında enzim yeniden aktivite gösterir.

a) Yarışmalı İnhibitörler

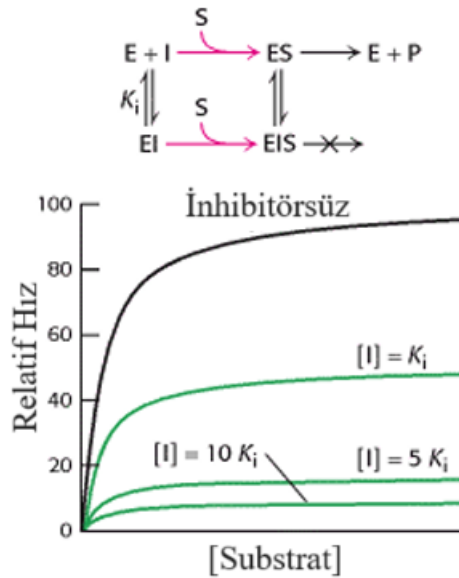
İnhibitörün molekül şekli substrata benzer ve enzime bağlanmak için substrat ile competition (yarış) halindedir. İnhibitör aktif merkeze bağliırken enzim substratı işleyemez. Bunun sonucunda V_{max} değişmez ancak K_m artar (Saboury, 2009).



Şekil 1.1 Yarışmalı inhibitör kinetiği (Berg, Tymoczko ve Stryer, 2002)

b) Yarışmasız Tip I (Nonkompetitif) İnhibitörler

İnhibitör, enzim üzerinde, aktif merkez dışındaki bir bölgeye (allosterik bölgeye) bağlanır. Enzimin üç boyutlu yapısını değiştirir. Bunun sonucunda değişen aktif merkezin şekli substrata uyumunu kaybeder ve substratı işleyemez. Böylece Michelis-Menten Sabiti (enzimin substratına olan ilgisi, K_m) değişmez ancak enzimatik reaksiyonun maksimum hızı (V_{max}) azalır (Ring, Wrighton ve Mohutsky, 2014).



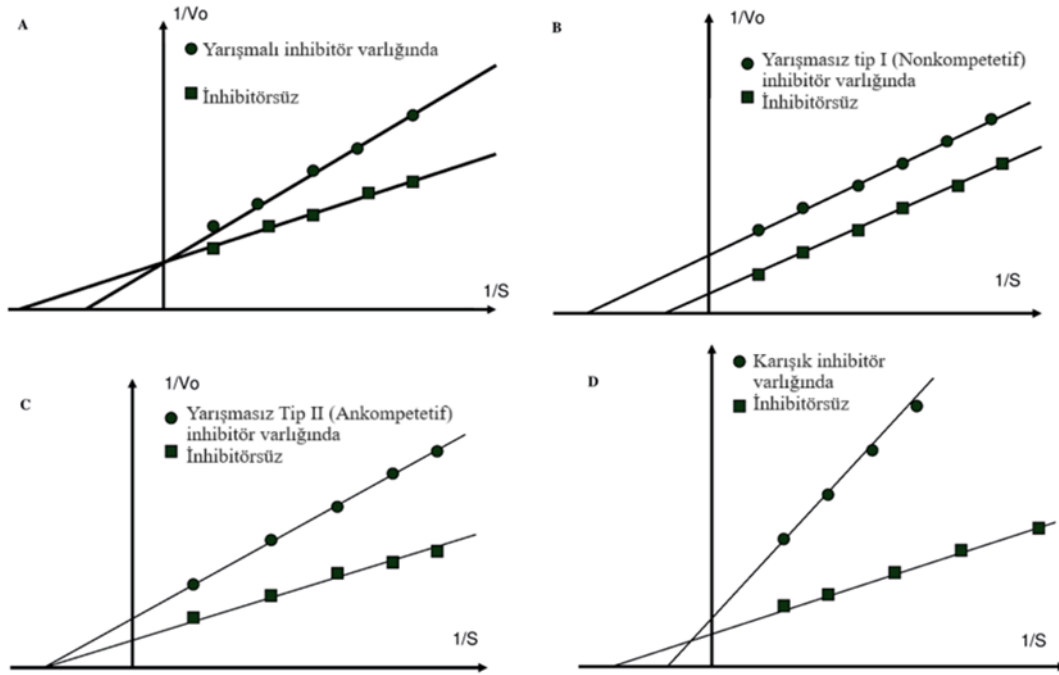
Şekil 1.2 Yarışmasız Tip I (nonkompetatif) inhibitör kinetiği (Berg ve diğerleri, 2002)

c) Yarışmasız Tip II (Ankompetitif) İnhibitörler

İnhibisyon, enzimde konformasyonel değişiklikler olmasıyla gerçekleşse de bu sonuç enzim-substrat (ES) kompleksi ve inhibitörün etkileşimi ile oluşur. Enzim-substrat-inhibitör kompleksi (ESI) oluşur, ürün oluşumu engellenir. Bu inhibisyonda hem K_m hem de V_{max} azalır (A. Amine, Arduini, Moscone ve Palleschi, 2016).

d) Karışık İnhibitörler

Bu tip inhibisyonda, inhibitör yarışmasız inhibisyondan farklı olarak hem serbest enzime hem de substrat-enzim kompleksine farklı ilgiyle bağlanır. Substrat konsantrasyonu artırılarak inhibitör bağlanması azaltılabilir ama tamamen ortadan kaldırılamaz. Sonuç olarak K_m değişir (artabilir veya azalabilir) V_{max} ise azalır (Ochs, 2000).

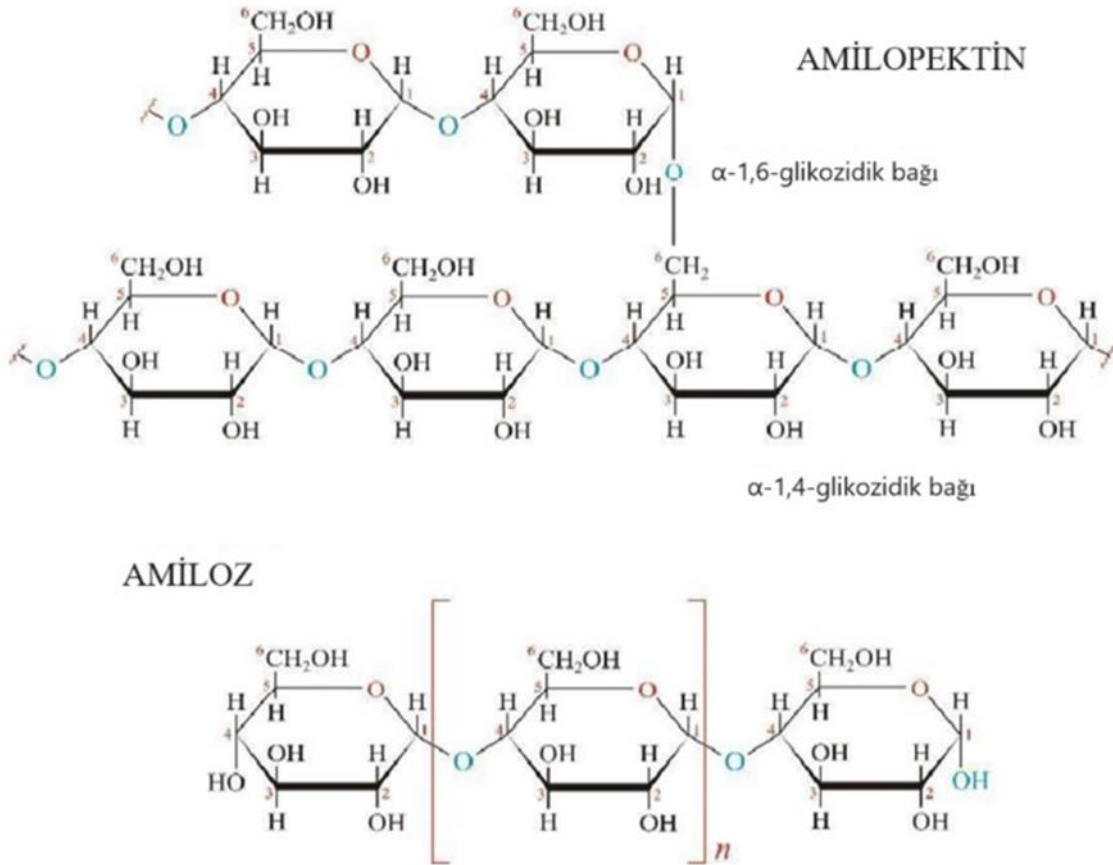


Şekil 1.3 Enzim kinetiğinin geri dönüşümlü inhibitörlerin sınıflandırılması için kinetik testi. A-Yarışmalı inhibitör varlığı, B-Yarışmasız tip-I (Nonkompetitif) inhibitör varlığında, C-Yarışmasız tip-II (Ankompetitif) inhibitör varlığında, D-Karışık inhibitör varlığında Lineweaver-Burk grafiği ($1/V_o$ - $1/S$) değişimleri (Lopina, 2017)

1.2. A-Amilaz

1.2.1. Substrat

A-amilaz (α -1,4-glucan-4-glucanohydrolase, E.C.3.2.1.1), nişasta içindeki α -(1,4)-glikozidik bağların hidrolizini yapar. Enzim, diğer amilolitik enzimlerle birlikte nişastanın α -limit dekstrinlere, oligosakkaritlere, maltoza ve glukoza dönüştürülmesine katılır. (Chi ve diğerleri, 2009). A-amilaz nişastada amiloz yapısı içerisinde bulunan α -(1,4)-glikozidik bağını parçalayabilir ancak α -(1,6)-glikozidik bağına etki edemez ve amilopektin yapısına gelince durur.



Şekil 1.4 Amiloz ve amilopektin yapıları (Korma, 2016)

1.2.2. A-Amilazların Yapısı

α -Amilazlar Arke, Prokaryot ve Ökaryot türlerinde bulunmaktadır, aralarında çok az sekans benzerliği bulunsa da, 3D yapıları oldukça benzerdir (Koukiekolo, Desseaux, Moreau, Marchis-Mouren ve Santimone, 2001). Memeli ve bakteriyel alfa amilazların

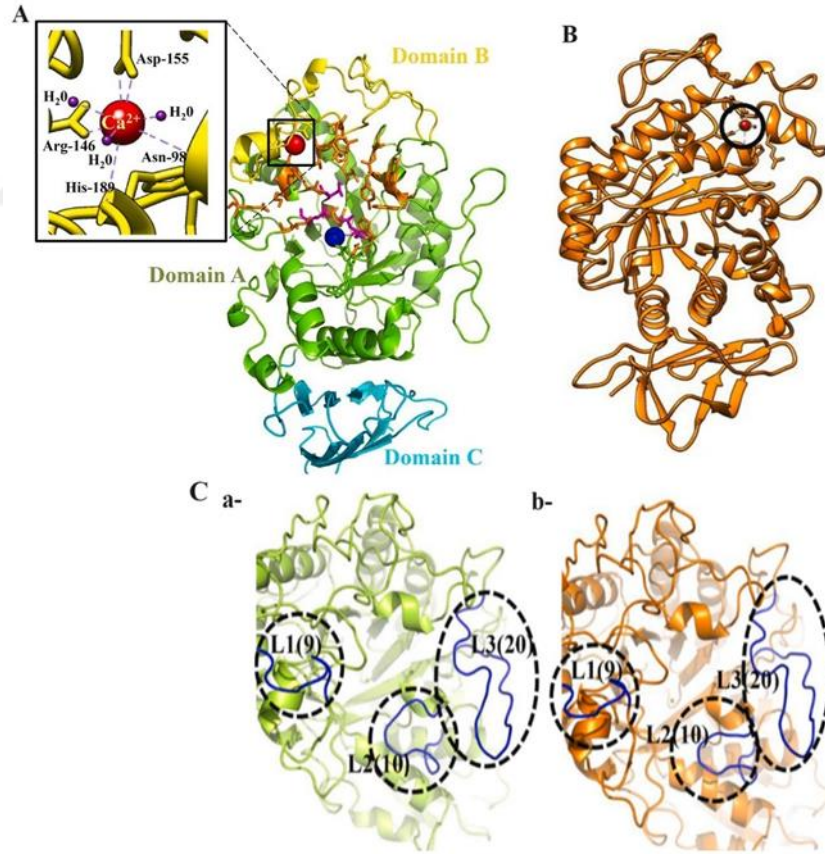
her ikisinde de korunmuş A, B, C bölgelerinin varlığı, yapılan x-ray çalışmalarında ortaya konulmuştur (Koukiekolo ve diğerleri, 2001; Nielsen ve Borchert, 2000). Bakteriyel α -amilazlar evrimsel olarak ökaryotik enzimlerden oldukça uzaktır, çoğu bakteriyel α -amilaz ve domuz pankreatik α -amilazı arasında sadece %15-20 kadar sekans benzerliği mevcuttur (Nielsen ve Borchert, 2000). Bununla beraber domuz pankreatik α -amilazı ile insan α -amilazlarının aminoasit sekansları arasında yapısal karşılaştırma, 496 aminoasit içerisinde sadece 64 amino asit farklılığı (%87.1 benzerlik) göstermiştir (Darnis ve diğerleri, 1999).

Domuz pankreatik α -amilazı, 55436 dalton (Da) molekül ağırlığına sahip ve 496 amino asitten oluşan bir enzimdir. Bu enzimin aminoasit sekansının %12.5'inin aromatik yapıda oluşu dikkat çekici özelliklerindendir (Larson, Day ve McPherson, 2010). Domuz pankreatik α -amilazındaki glutamat²³³, aspartat¹⁹⁷ ve aspartat³⁰⁰ birlikte çalışarak iki şeker molekülü arasındaki glikozidik bağını kırmaktadır (Ishikawa, Matsui, Honda ve Nakatani, 1990; Qian, Haser ve Payan, 1993).

α -Amilazın genel yapısı, A, B ve C olarak adlandırılan üç domaine sahip katlanmış bir polipeptit zincirinden oluşur. En iyi korunan A bölgesi, $(\beta/\alpha)_8$ barrel olarak bilinen (TIM barrel) katalitik domainidir (D'Amico, Gerday ve Feller, 2000). Bu barrel, sekiz α -sarmal ve içinde düzenlenmiş sekiz paralel β -sarmal içeren oldukça simetrik bir katlanma yapısına sahiptir. Kataliz ve substrat bağlanmasında rol alan α -amilaz ailesine ait ve yüksek oranda korunmuş amino asit kalıntıları bu alanda bulunur. TIM barrel dışında kalan kısım, B alanını oluşturan bir bölgedir ve üçüncü α -sarmal ile üçüncü β -sarmal arasında yer alır. Bu alan düzensiz bir β -sarmal yapısına sahiptir ve α -amilaz ailesinin farklı üyeleri arasında yapısal değişkenlik gösterir. Ayrıca, bu alanın α -amilazlarda gözlenen substrat özgülüğü farklılıklarında bir rol oynadığı düşünülmektedir. Alan C, amilazlar arasında sıra ve uzunluk açısından değişkenlik gösteren C-terminal bölümünü oluşturur ve nispeten korunmuş bir antiparalel β -sandviç yapısından meydana gelir. B ve C alanları, TIM barrel'ın zıt taraflarında konumlanmıştır (Ajandouz ve Marchis-Mouren, 1995; Desseaux, Seigner, Pierron, Grisoni ve Marchis-Mouren, 1988; Koukiekolo ve Moreau, 2002; Wiegand, Epp ve Huber, 1995).

α -Amilaz, en az bir Ca^{2+} iyonu içeren bir metalloenzimdir. Ca^{2+} iyonlarının α -amilaz ile ilişkisi diğer iyonlara göre çok daha güçlüdür. Kalsiyum, α -amilazın yapısal bütünlüğünü

korumak için gereklidir. Kalsiyumun çıkarılması, termostabilite ve/veya enzimatik aktivitede azalmaya veya proteolitik bozulmaya artmış hassasiyete yol açabilir (Saboury ve Karbassi, 2000). Bağlanmış kalsiyum miktarı bir ila on arasında değişebilir. Ca^{2+} iyonları enzimin kararlılığına katkıda bulunur. Ca^{2+} iyonlarının enzimin termostabilitesi üzerindeki stabilize edici etkisi, proteindeki hidrofobik kalıntıların Ca^{2+} tarafından çekilmesinden kaynaklanır. Kalsiyumu uzaklaştırılarak aktivitesini kaybetmiş enzim, Ca^{2+} iyonları eklenerek yeniden aktive edilebilir (Rana, Walia ve Gaur, 2013). Bakterilerde, bitkilerde, mantarlarda ve memelilerde, amilaz polipeptit zincirinin üç korunmuş bölgesi kalsiyum bağlanmasına katkıda bulunur. *Bacillus amyloliquefaciens* α -amilazında, aminoasit kalıntıları Gly⁹⁷-Ala¹⁰⁹, Ile²¹⁷-His²³⁵ ve Ser³¹⁴-Ser³³⁴ kalsiyum bağlama bölgeleri olarak tanımlanmıştır. α -amilaza bağlı kalsiyum iyonunun çıkarılmasıyla bu proteinin konformasyonel bir değişiklik geçirdiğini öne sürülmüştür (Machius, Wiegand ve Huber, 1995).



Şekil 1.5 A- α -Amilazların genel yapısı (Rane, Joshi ve Giri, 2020). B- Domuz pankreatik alfa-amilazı (PDB ID: 1PIF; GH13_24) (Rane ve diğerleri, 2020). C- a- İnsan

α -amilaz'ındaki ve b- Domuz pankreatik α -amilaz'ındaki loop bölgeleri (Rane ve diğerleri, 2020).

1.3. A-Amilaz Enziminin Endüstriyel Kullanımı

Nişasta endüstrisinin başlangıcı, Alman bilim insanı Kirchoff'un 1811 yılında nişasta-su süspansiyonunun seyreltik asit muamelesi sonucunda tatlı bir şuruba dönüştüğünü keşfettiği zamana kadar uzanır. Ancak 1921 yılında Newkirk tarafından endüstriye uyarlandı. Bu süreçte, nişasta yüksek sıcaklıklarda çözündürülür ve ardından asit ile hidrolize edilir. 1950'lerden itibaren termostabil amilolitik enzimlerin ortaya çıkmasıyla asit hidroliz yönteminin yerini enzimatik hidroliz almıştır (van der Maarel vd. 2002'den akt. Boy, 2011).

Amilazlar dünyanın enzim marketinin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Pek çok endüstride amilaz enzimi kullanılmaktadır (Kirk, Borchert ve Fuglsang, 2002).

1.3.1. Nişasta Dönüşümü: Glukoz, Fruktöz ve Çikolata Şurupları Üretimi

Glukoz ve fruktoz şurupları, nişasta sakkarifikasyonunun (şekerlenme) ürünleridir. Nişasta dönüşüm süreci üç adımı içerir;

- 1) Jelatinleşme,
- 2) Sıvılaşma,
- 3) Sakkarifikasyon

Jelatinleşme adımında, nişasta granülleri suda çözünür ve viskoz bir süspansiyon oluşur. Bu çözünme sonucunda su artık amiloz ve amilopektin içerir. Sıvılaşma işlemi, α -amilaz tarafından nişasta kalıntılarının yarı hidrolizini yapar ve bu adım nişasta çözeltisinin viskozitesini azaltır. Sakkarifikasyon ile daha fazla hidroliz gerçekleşir ve glikoz şurubu, fruktoz şurubu ve maltozun oluşmasına neden olur. Fruktöz şurubu, glikoz şurubunun glikoz izomeras enzimi etkisiyle oluşturulabilen yapay bir tatlandırıcı olarak içecek endüstrisinde yoğun bir şekilde kullanılır (Farooq ve diğerleri, 2021).

Amilazlar, kakao karışımlarıyla işlenir ve bu sayede çikolata şurubu üretilir. Bu şurup, çikolata nişastasının dekstrinleştiği ve bu nedenle şurubun kalınlaşmadığı bir yapıya sahiptir. Amilaz ve Dutch prosesi (pH 5.5-7.5) kullanılarak kakaodan yüksek kakao

içeriğine sahip, oda sıcaklığında yüksek stabilite ve akış özelliklerine sahip kakao aromalı şuruplar üretilebilir (Ismail et al., 1992'den akt. Saini, Singh Saini ve Dahiya, 2017).

1.3.2. Gıda Endüstrisi

Fırıncılık endüstrisinde, α -amilaz ekmek hamurundaki nişastayı dekstrinlere hidrolize eder. Maya, dekstrini fermante eder, hamurun viskozitesi azalır ve fermentasyon hızı artar. Bu sürecin sonunda ürünün dokusu ve hacmi artar. Bunun yanı sıra, α -amilazın kullanımıyla ekmeğin tadı, kızarma kalitesi ve kabuk rengi de geliştirilir. Ürünler saklandığında kabuğun tazeliğinin kaybı, iç kısmın sertliğinin artışı, ekmek lezzetinde değişiklik ve iç kısmın nem içeriğinin azalması gibi istenmeyen değişiklikler meydana gelir. α -Amilaz konsantrasyonunun hafif yüksekliği bile, ekmeğin yapışkanlığına sebep olan dallı dekstrinlerin üretimine yol açar bu nedenle kontrol altında tutulmalıdır (Suriya, Bharathiraja, Krishnan, Manivasagan ve Kim, 2016).

1.3.3. Alkol Endüstrisi

Tahıl, patates gibi nişastalar, etil alkol üretimine yardımcı olan ham maddeler olarak kullanılır. Amilazların varlığında, nişasta önce fermante edilebilir şekerlere dönüştürülür. Bira endüstrisinde, bakteriyel enzim kullanımı, kısmen arpa maltının yerine geçerek süreci ekonomik açıdan daha avantajlı hale getirir (Santamaría ve diğerleri, 1999).

1.3.4. Deterjan Endüstrisi

Enzimlerin deterjan formülasyonlarındaki kullanımı, deterjanların zorlu lekeleri çıkarma yeteneğini artırır ve deterjanları çevre dostu hale getirir. Tüm sıvı deterjanların %90'ı bu enzimleri içerir. Bu enzimler, deterjanların çamaşır ve otomatik bulaşık yıkama için kullanılır ve nişastalı gıdaların kalıntıları (örneğin patates, soslar, muhallebi, çikolata vb.) dekstrinlere ve diğer küçük oligosakkaritlere parçalamak için kullanılır. Amilazlar düşük sıcaklıklarda ve alkali pH seviyelerinde etkinlik gösterir ve yıkama koşulları altında gerekli stabiliteyi korur; ayrıca amilazların oksidatif kararlılığı, deterjanlarda kullanılmaları için en önemli kriterlerden biridir. Yıkama ortamı oldukça oksitleyicidir. Yüzeylerden nişastanın çıkarılması da beyazlık sağlama açısından önemlidir (Souza ve Magalhães, 2010).

1.3.5. Tekstil Endüstrisi

Amilazlar, tekstil endüstrisinde haşıl sökme (nişasta çıkarma) işlemi için kullanılır. Haşıl sökme, dokuma süreci sırasında yün ipliğinin kopmasını önlemek için güçlendirme maddesi olarak işlem öncesinde eklenen nişastanın kumaştan çıkarılmasını içerir. Nişasta, kumaş üretiminden önce yüne uygulanarak hızlı ve güvenli bir dokuma sürecini sağlamak amacıyla kullanılır.

Nişasta, ucuzdur, dünyanın birçok bölgesinde kolayca bulunur ve oldukça kolay bir şekilde çıkarılabilir, bu yüzden oldukça etkili bir haşıllayıcıdır. Nişasta, dokuma kumaş üretildikten sonra, tekstil işlemleri sırasında ıslak bir işlemde çıkarılır. Amilazlar, nişastayı selektif olarak çıkarır ve liflere zarar vermezler (Iqbal et al.,1997'den akt., John, 2017).

1.3.6. Klinik ve Tıbbi Uygulamalar

Endüstriyel olarak üretilen ilk enzim, 1894 yılında fungal bir kaynaktan elde edilen bir amilazdır. Sindirim bozukluklarının tedavisi için farmasötik bir yardımcı olarak kullanılmıştır.

Biyo-parçalanabilen polimerler, bağırsak dışından verilen kontrollü salım sistemlerinde, ilaç salım hızını kontrol etmek amacıyla kullanılır. Özellikle sınırlı çözünürlüğe sahip veya sindirim sistemi pH'ına duyarlı ilaçlarda, ilaç salımını hızını ayarlamak için böyle bir sistem gereklidir. Biyo-parçalanabilir materyaller arasında nişasta öne çıkmaktadır. A-amilaz ilaç formülasyonuna katılır, nişasta içindeki dekstrinin ve ilacın daha kolay açığa çıkmasını sağlar. (Afzaljavan, Mobini-Dehkordi ve Javan, 2012).

Bununla birlikte, diabetes mellitus tedavisinde α -amilaz inhibisyonu popüler bir araştırma konusu olmuştur (Hussein, 2022).

1.3.7. Yakıt Alkolü Üretimi

Biyo-yakıtlar arasında etanol en yaygın olarak kullanılanıdır. Nişasta ekonomik bir başlangıç malzemesi olduğu için, biyo-yakıt olarak etanol üretiminde kullanılır. Bu işlemde de jelatinleşme, sıvılaşma ve sakkarifikasyon işlemleri uygulanır. Ortaya çıkan şekerler daha sonra maya tarafından alkole dönüştürülür. Bu işlemin bir iyileştirmesi olarak, amilolitik maya *Saccharomyces fibuligera* ve *S. cerevisiae* arasındaki protoplast

füzyonu gerçekleştirilerek nişastadan biyo-yakıtı doğrudan üretebilen yeni bir maya suşu elde edilmiştir, bu da sakkarifikasyon adımına gerek duymadan nişastadan biyo-yakıt üretimini sağlar (Chi ve diğerleri, 2009).

1.3.8. Kâğıt Endüstrisi

A-amilazların hamur ve kâğıt endüstrisinde kullanımı, kaplanmış kâğıtta kullanılan nişastanın özelliklerinin değiştirilmesi içindir. Böylelikle düşük viskoziteli, yüksek moleküler ağırlıklı nişasta üretilebilir. Kaplama işlemi, kâğıdın yüzeyini yeterince düzgün ve sağlam hale getirmek ve kâğıdın yazma kalitesini artırmak amacıyla kullanılır. Bu uygulamada, doğal nişastanın viskozitesi kâğıt üretimi için çok yüksektir bu yüzden α -amilaz kullanılarak polimerin kısmen parçalanması sağlanır (Mezeal, Mezil ve Shnewer, 2019). Soğuk aktif α -amilaz, nişastanın viskozitesini azalttığı için kâğıdın uygun bir şekilde kaplanmasında etkilidir bu sayede kâğıt endüstrisinde çok kullanılmaktadır (Afzaljavan ve diğerleri, 2012).

1.4. Enzim İmmobilizasyonu ve Yöntemleri

Enzimleri katı yüzeylere bağlamak için immobilizasyon teknikleri geliştirilmiş, bu yöntem enzimlerin bazı avantajlar sağlamıştır. Enzim immobilizasyonu için çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemler yedi ana kategori altında incelenebilir.

1.4.1. Adsorpsiyon İmmobilizasyonu

Enzim immobilizasyonu, enzimin katı destek materyaline adsorbe olması ile gerçekleşir. Adsorpsiyon mekanizmaları zayıf bağlara (Van der Waals kuvvetleri, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler) dayanır. Enzim çözelti içinde çözünür ve katı destek, uygun koşullarda belirli bir süre inkübe edilir. Adsorbe olmayan enzim molekülleri daha sonra bir tampon solüsyonu ile yıkama ile yüzeyden uzaklaştırılır. Adsorpsiyon ile immobilizasyon; fiziksel adsorpsiyon, elektrostatik bağlanma veya hidrofobik adsorpsiyon yöntemleri ile yapılabilir (Brena, González-Pombo ve Batista-Viera, 2013; Homaei, Sariri, Vianello ve Stevanato, 2013; Nguyen ve Kim, 2017; Sheldon, 2007; Thangaraj ve Solomon, 2019).

Avantajları

Adsorpsiyon ile immobilizasyon, reaktan içermeyen, düşük maliyetli, genellikle destek matrisinin herhangi bir fonksiyonelleştirilmesini basit ve ekonomik bir süreçtir.

Dezavantajları

Enzimlerin destekle zayıf fiziksel bağlarla gevşek bir şekilde bağlandığından, sıcaklık, pH veya iyon kuvvetindeki değişikliklerin enzim desorpsiyonuna/çıkarmasına neden olabilir. Aynı sebepten ötürü, enzim sızıntısı gerçekleşebilir ve bu durum depolama stabilitesini zayıftır. Bunun dışında, destek materyali yüzeyine diğer proteinlerin veya maddelerin spesifik olmayan adsorpsiyonu ihtimal dahilindedir (Jesionowski, Zdzienicka ve Krajevska, 2014; Lyu, Gonzalez, Horton ve Li, 2021).

1.4.2. Kovalent Bağlama Immobilizasyonu

Enzimdeki fonksiyonel gruplar ile destek materyali arasında kovalent bağlar kurularak stabil kompleksler oluşturulur. Enzimde bulunan, destekle kovalent bir bağ oluşturulabilecek olan fonksiyonel grup, genellikle enzimatik aktivite için gerekli olmayan bir gruptur. Bu genellikle lizin (ϵ -amino grubu) yan zincirleri aracılığıyla bağlanmayı içerir, sistin (tiyol grubu) ile aspartik ve glutamik asitler (karboksil grubu). Kovalent bağlanmada kullanılacak enzim fonksiyonel grupları arasında amino grubu, karboksil grubu, fenolik grup, sülfhidril grup, tiyol grubu, imidazol grubu, indol grubu ve hidroksil grubu bulunmaktadır. Enzimin katı destek üzerine bağlanma prosedürü genellikle iki aşamadan geçer: (1) glutaraldehit veya karbodiimid gibi bağlayıcı moleküller kullanılarak yüzeyin aktive edilmesi ve (2) enzim kovalent şekilde aktive edilmiş destek üzerine bağlanır. Bağlayıcı moleküller, yüzey ile enzim arasında kovalent bağ aracılığıyla köprü görevi gören çok fonksiyonlu reaktanlardır (glutaraldehit veya karbodiimid). İlk grup, immobilizasyon yüzeyine uyum sağlar ve bir SAM oluştururken, ikinci grup önceden aktive edilmiş destekle bağlanarak enzimle kovalent bir bağ oluşturur. Farklı bağlayıcılar, farklı yüzeylerde (inorganik malzeme, doğal veya sentetik polimer, membranlar) ve immobilizasyon protokollerinde (transdüser yüzeyine doğrudan veya transdüser sabitlenmiş ince bir membrana) kullanılır (Brena ve diğerleri, 2013; Homaei ve diğerleri, 2013; Nguyen ve Kim, 2017; Thangaraj ve Solomon, 2019).

Avantajları

Kovalent immobilizasyon, enzimler ile destek matrisi arasında güçlü bağlar sağlar ve bu sayede destekten enzim sızıntısının diğer yöntemlerden daha az olması beklenebilir. Ayrıca, SAM katmanının yüksek bir homojenitesi ve immobilize edilmiş enzim miktarının kontrolü avantajları arasındadır.

Dezavantajları

Kovalent bağlanmada, birçok enzimin fonksiyonel gruplara sahip olması için kimyasal modifikasyonlardan geçmesi gerektiğinden, enzim denatürasyonu ve aktivite azalması veya kaybı riski yüksektir (Lyu ve diğerleri, 2021).

1.4.3. Hapsetme İmmobilizasyonu

Hapsetme immobilizasyonunda enzim doğrudan destek yüzeyine bağlı değildir, ancak polimerik bir ağına hapsolmuştur. Bu durum, substratların ve ürünlerin geçişine izin verir ancak enzim difüzyonu sınırlandırılmıştır. Hapsetme immobilizasyon süreci iki adımdan oluşur: (1) enzimi bir monomer çözeltisine karıştırma ve (2) monomer çözeltisinin bir kimyasal reaksiyon veya değişen deney koşullarıyla polimerleşmesi. Enzim fiziksel olarak bir polimer kafesi içine hapsoldüğünden, polimerle kimyasal etkileşime girmez. Hapsetme immobilizasyonda kullanılan yöntemler, elektropolimerizasyon, fotopolimerizasyon, ızgara veya lif tipi için sol-jel işlemi ve mikrokapsülleme gibi hapsolma türüne bağlı olarak çeşitlilik gösterir (Brena ve diğerleri, 2013; Homaei ve diğerleri, 2013; Nguyen ve Kim, 2017; Thangaraj ve Solomon, 2019).

Avantajları

Bu yöntem, enzim stabilitesini artırabilir ve enzim sızmasını ve denatürasyonu azaltabilir. Enzim için mikro-çevreyi optimize edilebilir; hapsetme malzemesini optimal pH, polarite veya amfipatik özelliklere sahip olacak şekilde değiştirme imkânı sunar.

Dezavantajları

Kalın bir polimerin üretimi; substratın, polimere derinlemesine difüzyonunu sınırlayan kütle transfer direncidir oluşturabilir. Bu durum polimerin merkezindeki enzimlere substrat ulaşmaması ve reaksiyon hızının azalmasına neden olabilir. Ayrıca, destek

matrisinin gözenek boyutları çok büyükse, hapsolmuş enzimlerin sızmasına neden olacaktır. Yöntemin düşük enzim yükleme kapasitesi vardır (Lyu ve diğerleri, 2021).

1.4.4. Çapraz Bağlama İmmobilizasyonu

Çapraz bağlama ile enzim immobilizasyonu, enzim molekülleri arasında kovalent çapraz bağlantılar oluşturan, geri dönüşümsüz bir yöntemdir. Bu süreç, enzim moleküllerini üç boyutlu çapraz bağlı agregatlar halinde bağlamak için çok fonksiyonlu bir başlatıcıya ihtiyaç duyar. İmmobilize edilmiş enzim, reaksiyon karışımına eklenir ancak herhangi bir desteğe bağlı bulunmaz. Çapraz bağlama immobilizasyonunda iki yaklaşım vardır: çapraz bağlama enzim agregatı (CLEA) ve çapraz bağlama enzim kristali (CLEC) kullanımı. Her iki yöntem de enzimleri bağlamak için glutaraldehit gibi bir çapraz bağlayıcı ajanın kullanımını gerektirir.

CLEC yönteminde, glutaraldehit, kristallenme sonrasında enzim kristallerini çapraz bağlamak için eklenir. CLEC ile immobilize edilen enzimler genellikle mekanik özelliklerde önemli iyileştirmeler gösterirler ve bu nedenle stabil ve daha yüksek verimliliğe sahiptirler.

CLEA, CLEC işleminin iyileştirilmiş bir versiyonudur ve kristal oluşturmalarını gerektirmediği için sulu çözeltilerde çalışabilir. CLEA yönteminde; tuzların, organik çözücülerin veya non-iyonik polimerlerin eklenmesi, enzim agregalarının oluşmasına neden olur (Cao, 2005; Garcia-Galan, Berenguer-Murcia, Fernandez-Lafuente ve Rodrigues, 2011; Homaei ve diğerleri, 2013; Nguyen ve Kim, 2017; Thangaraj ve Solomon, 2019).

Avantajları

Çapraz bağlama immobilizasyonu, basit bir yöntemdir. Enzimler güçlü bir kimyasal bağlanma gösterirler, bu nedenle enzim sızıntısı minimumdur. Enzim için mikro-çevreyi uygun stabilize edici ajanları kullanarak ayarlama olanağıdır, bu da stabiliteyi artırır.

Dezavantajları

Glutaraldehit kullanımı ciddi enzim modifikasyonlarına ve enzimin muhtemel konformasyonel değişikliklerine ve aktivite kaybına neden olabilir. Bu nedenle, enzimlerin konformasyonel değişimlerini en aza indirmek için immobilizasyon süreci

sırasında jelatin, bovine serum albümin (BSA) gibi inert proteinler eklenebilir (Lyu ve diğerleri, 2021).

1.4.5. Afinite İmmobilizasyonu

Afinite immobilizasyonu, "aktive edilmiş" bir destek ile enzim yüzeyinde bulunan belirli bir grup arasında farklı biyo-afinite bağları oluşturma prensibine dayanır. Bu amaçla, enzim aktivitesini veya katlanmasını etkilemeyen bir afinite kuyruğunu protein dizisinin belirli bir pozisyonuna yerleştirerek elde edilir. Daha sonra bu modifiye edilmiş enzimin destek üzerine basit bir bağlanması gerçekleştirilir (Andreescu, Bucur ve Marty, 2006). Bu bağlanma, nispeten daha yüksek asosiyasyon sabitlerine sahip olan affinite çiftlerini seçme ve/veya sıfır sızdırmayı destekleyen işletim koşulları seçilerek elde edilebilir (Mateo ve diğerleri, 2006). Ayrıca biospesifik adsorpsiyonun sayısız uygulaması arasında, immünoadsorpsiyon da bulunmaktadır. Belirli antikorlar, uygun deneysel hayvanlarda, herhangi bir enzime yönelik üretilebilir ve gerekli tarama sonrasında enzimin bir destek üzerinde immobilizasyonu için kullanılabilir (Saleemuddin, 1999).

Avantajları

Biyospesifik affiniteler kullanılarak adsorpsiyon yaklaşımının tüm avantajları korunabilir ve biyospesifiklik ile birleştirilebilir. Bu, desorpsiyonun daha iyi kontrol edilebileceği ve işlem sırasında nonspesifik yer değiştirmenin ortadan kaldırılabilmesi koşulları sağlar. Afinite immobilizasyonu, sadece protein yüzeyinde bir afinite kuyruğu bulunduğunda "bağlanma yeri veya destek üzerindeki belirli grup" bağlantısı nedeniyle tüm biyomoleküller için benzer seçici ve yönlendirilmiş immobilizasyon sağlar. Enzim yapısında indüklenen konformasyonel değişikliklerin minimize edilmesi sağlanabilir ve aynı aktive edilmiş yüzeyin enzimle tekrar yüklenme ve farklı taleplere göre destekleri tekrar kullanma olanağı sağlayabilir. Ayrıca immünoafinite yöntemi ile enzim karışımlarından saflaştırılarak immobilizasyon sağlanabilmektedir.

Dezavantajları

Geleneksel adsorpsiyona kıyasla tek bir dezavantaj, adsorbanın fiyatı olmuştur. Afinite etiketleri, histidin (His), sistin (Cys) veya mannose bağlayıcı protein gibi etiketler, afinite bağlanmada rol oynayabilir ve birçok enzim bu kalıntıları amino asit dizilerinde içerse de, sayıları çok sınırlıdır ayrıca bunlardan çok azı protein yüzeyinde yer alır ve destekle

bağlanmaya erişilebilir (Andreescu ve diğerleri, 2006; Mattiasson, 1988; Saleemuddin, 1999).

1.4.6. İyonik Bağlama İmmobilizasyonu

Enzimlerin geri dönüşümlü immobilizasyonu için en popüler, en basit ve en eski protokollerden biri, enzimlerin iyon değişim reçinelerine (genellikle anyonik olanlara) adsorpsiyonudur. Bu geri dönüşümlü enzim immobilizasyonu genellikle oldukça hafif olmaktadır bu nedenle çoğu protein, ılımlı ve düşük iyonik kuvvet koşullarında bu tür matrikslerden tamamen salınır.

Bu şekilde yüksek konsantrasyonda iyonlaşabilir substratlar, reaksiyon sırasında pH değişiklikleri gibi durumlar immobilize enzimin destekten istenenin aksine, sızmasını indükleyebilir. Bu da enzimde fark edilir bir inaktivasyona ve üründe kontaminasyona neden olabilir (Mateo, Abian, Fernandez-Lafuente ve Guisan, 2000).

Avantajları

Geri dönüşümlü enzim immobilizasyon yöntemleri, immobilize edilmiş enzim biyokatalizörlerde destek fiyatının ağırlığını azaltma avantajına sahiptir, çünkü destek, enzim inaktivasyonu sonrasında tekrar kullanılabilir: inaktive olmuş enzim serbest bırakılabilir ve taze enzim eklenerek kullanılabilir (Virgen-Ortíz ve diğerleri, 2017).

Dezavantajları

Yüksek iyonik güce sahip substrat çözeltileri veya farklı pH çözeltileri kullanıldığında, enzim taşıyıcıdan sızabilir. Bu, enzimler ile matriks arasındaki zayıf bağlardan kaynaklanır (Mateo ve diğerleri, 2000). Bununla birlikte, iyonik bağlama, kovalent bağlamadan daha zayıftır.

1.4.7. Metal-Organik Çerçeve İmmobilizasyon

Metal organik çerçeveler (metal-organic frameworks, MOF), gözenekli kristalin organik-inorganik hibrit malzemelerdir. Metal iyonları ve çok dişli ligandlar olmak üzere iki bileşen, koordinasyon bağları aracılığıyla farklı kombinasyonlarda bir araya gelerek çokyönlü, üç-boyutlu yapılar oluştururlar. MOF'ların morfolojisi ve işlevselliği istenen uygulamalar için uyarlanabilir (Mehta, Bhardwaj, Bhardwaj, Kim ve Deep, 2016). MOF'lar, çeşitli gözenek yapıları (kafesler, kanallar), gözenek boyutları, porozite (yüzey

alanı, gözenek boyutu dağılımı), hidrofiliklik ve hidrofobiklik içeren fonksiyonel gruplarla birlikte elde edilebilir. Metal-organik çerçeveler aynı zamanda çeşitli biyomoleküller (DNA, ilaçlar, enzimler ve diğer proteinler) için immobilizasyon destekleri olarak kullanılabilmektedirler (Hu, Dai, Liu, Du ve Wang, 2018).

Avantajları

MOF'lar, enzimleri denatürasyondan korumak ve enzimatik performansı artırmak için gözeneklerin/yüzey özelliklerinin kontrol edilmesi yoluyla enzimlere karşı bir stabil mikroçevre oluşturabilirler. Bu durum, MOF'lerin çeşitli uygulama alanlarını önemli ölçüde genişletmektedir. Ayrıca, metal düğümlerinin ve organik bağlayıcıların işlevsel çeşitliliği, sentetik organik ve biyomimetik reaksiyonları katalize etmek ve simultane şelale reaksiyonlarını kolaylaştırmak için kullanılabilir (Wang, Lan ve Ma, 2020).

Dezavantajları

MOF yöntemi ile immobilizasyonda enzimin tam olarak geri kazanılması hâlâ zordur ve MOF'ların stabilitesi yalnızca belirli pratik koşullarda sınanmaktadır. Etkili enzim immobilizasyonu için uygun MOF'lar oldukça sınırlıdır ve enzimin sızma, denatürasyon ve sınırlı transfer verimliliği ile karşılaşmasına neden olur. MOF-enzim kompozitlerinin biyo-uyumluluk ve yenilebilirlik açısından belirsizliği, biyomedikal ve gıda alanındaki güvenliği konusundaki belirsizlik yaratmakta ve uygulamalarını sınırlamaktadır. Maliyetleri ise pahalıdır çünkü MOF malzemeleri ve bu yöntemle immobilizasyon prosedürleri endüstrileşmemiştir (Liang, Wu, Xiong, Zong ve Lou, 2020).

1.5. Fotopolimerizasyon

Fotopolimerizasyon, UV ışığı tarafından indüklenen monomerlerin polimerizasyonunu başlatarak çapraz bağlı polimerlerin oluşumunu sağlayan bir polimerizasyon yöntemidir (Kaur ve Srivastava, 2002). Son 30 yılda, fotokimyasal polimerizasyon endüstriyel uygulamalarda yaygın bir şekilde kullanılmakta olup milyar dolarlık bir endüstrinin temelini oluşturmaktadır.

Fotopolimerizasyonun düşük maliyetlerle oda sıcaklığında gerçekleştirilebilen, hızlı ve enerji verimli bir teknik olması, diğer polimerizasyon tekniklerine kıyasla daha avantajlı olduğunu kanıtlamıştır. Polimerizasyonda reaksiyona giren monomer ve diğer kimyasallar düzenlenerek polimerizasyon sonrasında malzemenin performansına etki

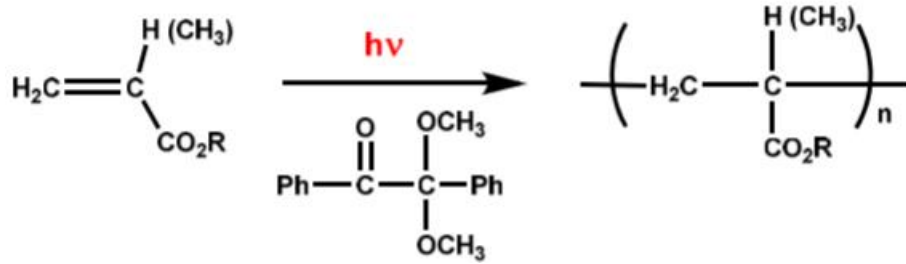
edilir ve malzemenin spesifik özellikleri (renk, sertlik, yanma ve pH direnci, yapışkanlık, iletkenlik vb.) kolayca düzenlenebilmektedir (Chiulan, Heggset, Voicu ve Chinga-Carrasco, 2021). Metakrilatların serbest radikal polimerleşmesi, tiyolen polimerleşmesi ve epoksi ve vinil eterlerin katyonik polimerleşmesi, fotopolimer ağlarının üretilmesinde en yaygın kullanılan yöntemler olmuştur. Serbest radikal polimerleşmesi hızlıdır, izole hatalara oldukça duyarlıdır ve geniş bir işlevsellik yelpazesi ile tolere edilebilir. Ayrıca sulu ortamlarda gerçekleştirilebilir (Lai, Peng, Li, Zhu ve Xiao, 2022).

Fotokimyasal polimerizasyonun kullanıldığı uygulamalar arasında filmler ve kaplamalar, mürekkepler, yapışkanlar, fiber optikler yer almaktadır. Diş dolgularının kürlenmesi ve polimerik foto-optik kontrol malzemeleri gibi modern fotopolimerizasyon uygulamaları da mevcuttur. Bu endüstrilerde, fotokimyasal polimerizasyon sistemlerinin sağladığı yüksek verimlilik ve düşük maliyetlerden büyük ölçüde faydalanılmaktadır (Andrzejewska, 2001).

Bir fotopolimer malzeme fotonları soğurduğunda, primer başlatıcı radikaller oluşturur. Bu serbest radikaller, daha sonra çözelti içindeki monomerler ile reaksiyona girer ve böylece makro-radikaller oluşturur. Makro-radikaller daha sonra monomer ile reaksiyona girerek yayılan polimer zincirlerini oluşturur. Bu reaksiyon sonucu malzeme yoğunluğunda değişim gerçekleşir ve dolayısıyla (ışık) kırılma indisinde bir farklılık meydana gelir (Gleeson, Liu, O'Duill ve Sheridan, 2008).

Akrilat grubu, esterleşme reaksiyonlarıyla çeşitli hidroksil-fonksiyonel gruplu polimerlere ve uygun polimerleştiricilere kolayca bağlanabilir. Bu reaksiyonlar serbest radikal mekanizmasını takip ederek hızla polimerleşme sağlar (Freudenberg, Jänsch, Hinkel ve Bunz, 2018). **Şekil 1.6'**da gösterilen akrilat ve metakrilat kimyası, fotopolimer uygulamaları için oldukça uygun olup, bu yüksek reaktif fonksiyonel gruplar poliester, poliüretan, poliürea, polipolietilen ve polidimetilsiloksan kökenli oligomerlerde fonksiyonel uç ve yan gruplar olarak yer almıştır. Monofonksiyonel vinil monomerlerin serbest radikal fotopolimerizasyonunu gerçekleştirmek mümkün olsa da, bunu yapmak için henüz gerçek bir pratik veya önemli ticari neden belirlenmemiştir. Aslında, fotopolimerizasyon teknolojisinin tüm ticari uygulamaları, çok fonksiyonlu monomerleri veya çok ve monofonksiyonlu monomerlerin bir kombinasyonunu içermektedir. Sonuç

olarak, elde edilen polimerler çözünmez, erimez, çapraz bağlı ağ polimerlerdir (Crivello ve Reichmanis, 2014).



Şekil 1.6 Metakrilat fotopolimerizasyonu (Crivello ve Reichmanis, 2014)

Bir biyomolekülün, polimer desteğe kovalent olarak bağlanması temelde iki aşamalı bir süreçtir: analitin fonksiyonelleştirilmesi ve kovalent immobilizasyon. Bu sayede her iki adım için de optimal koşulların seçilimi yapılabilir. Kovalent immobilizasyonun önemli bir dezavantajı, aktivite kaybına olabilmesidir (Teles ve Fonseca, 2008).

1.6. Çapraz Bağlı Etoksile Akrilat Reçine (Cross-Linked Ethoxylate Acrylate Resin, CLEAR) Polimeri

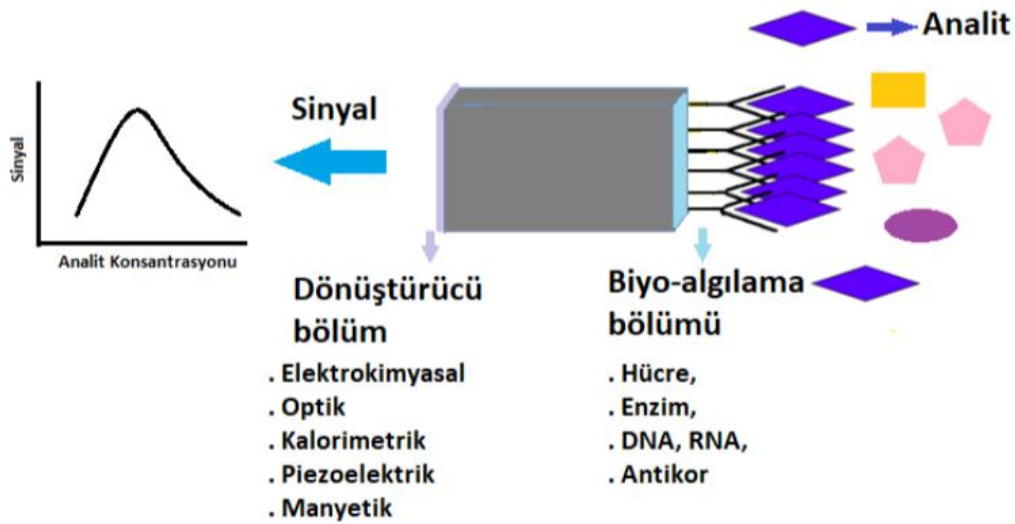
Çok fonksiyonlu monomerler, genellikle çapraz bağlayıcılar olarak bilinir, serbest radikal polimerizasyonunda kullanılır ve tıp, ilaç, boya, kolon paketleme, optik, polimer katkı maddeleri, iyon değişim reçineleri ve lastik gibi uygulamalarda kullanılan polimer ağları üretmek için kullanılır. Çapraz bağlama işlemi, bir ağ elde etmek için polimer zincirlerini bağlamayı içerir, bu da film sertliğinde, çözücülere, kimyasallara ve deterjanlara karşı dirençte artışa neden olur (Srivastava, 2009).

Alandaki alışılagelmiş bilgi, polimer desteklerin stabilite için gerekli minimum düzeyde çapraz bağlanmış sahip olması gerektiğidir. Böylece bunlar içinde katı faz kimyasının gerçekleştiği iyi çözünen jelleri oluşturabilirler. Alternatif olarak, yüksek derecede çapraz bağlantıya sahip gözenekli ancak sert destekler de kullanılabilir. Çapraz bağlı etoksile akrilat reçine (Cross-Linked Ethoxylate Acrylate Resin, CLEAR) polimeri, dallı çapraz bağlayıcı trimetilolpropan etoksilatın (14/3 EO/OH) triakrilat ile diğer monomerlerin radikal kopolimerizasyonu ile hazırlanırlar (Kempe ve Barany, 1996). CLEAR polimeri, su dahil geniş bir çözücü yelpazesinde şişen, biyo-uyumlu destek ihtiyacını karşılamak üzere geliştirilmiştir. Polimer, peptit sentezi için kullanılan koşullarda stabil durumdadır (Cederfur ve Kempe, 2001) ve bu sayede enzim çalışmalarında da uygun bir kimyasal

olarak CLEAR ve türevleri kullanılmaktadır (Edwards, Caston-Pierre, Bopp ve Goynes, 2005).

1.7. Biyosensörler

Biyolojik algılama elemanları (biyoreseptör) olarak enzim/substrat, antikor/antijen ve nükleik asit/kompleman-sekans-çiftleri gibi ana biyolojik malzemeler biyosensör teknolojisinde kullanılmaktadır. Biyolojik tespit elemanlarının seçiciliği, karmaşık karışımların gerçek zamanlı analizi için yüksek derecede özgül cihazların geliştirilmesi olarak tanır. Özellikle, elektrokimyasal biyosensörler, analiz tekniklerinin dayanıklılığı, iyi algılama limitleri, geniş saptama aralığı, iyi stabilite ve tekrarlanabilirlik, düşük örnek hacmi ihtiyacı ve kolay küçük üretilebilirlik gibi elektrokimyasal tekniklerin doğal avantajlarından faydalanır (Pérez-Fernández ve de la Escosura-Muñiz, 2022).



Şekil 1.7 Biyosensör yapısı (Muti İstek ve Bulca, 2021)

Enzim tabanlı elektrokimyasal biyosensörlerin çalışma prensibi, ölçülen elektriksel sinyaldeki değişikliği tespit etmek ve bu değişimi bir panele aktarmaktır. Bu sinyal, bir enzimatik reaksiyon aracılığıyla elektroaktif madde üretiminin veya tüketiminin sonucudur. Bu tür biyosensörler, kullanımı uzmanlık gerektiren laboratuvar tekniklerine bağımlılığı ortadan kaldırmakla kalmaz, aynı zamanda daha düşük maliyetli bir ölçüm yöntemi sunar. Bu nedenle, birçok alanda farklı analitler için kullanılmaktadırlar (Akdağ, Işık ve Göktaş, 2020).

Biyosensörler, hedef analit ile seçici olarak reaksiyona girerler ve incelenen analitin konsantrasyonuyla doğru orantılı bir elektrik sinyali üretirler. Elektrokimyasal biyosensörler, iki ana kategoriye ayrılmaktadırlar; biyokatalitik cihazlar ve biyo-afinite sensörleri. Biyokatalitik cihazlar, hedef analiti tanıyan ve elektroaktif maddeler üreten enzimler, bütün hücreler veya doku kesitleri içerir. Biyo-afinite sensörleri ise, analit ile bir antikor, nükleik asit veya reseptör gibi bir biyolojik bileşen arasında seçici bağlanma etkileşimine dayanır (Ronkainen, Halsall ve Heineman, 2010).

1.7.1. Elektrokimyasal Biyosensör Tasarımında Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar

Biyosensör tasarımlarında ve hazırlanmasında, dikkat edilmesi gereken belli faktörler mevcuttur. Bunlar;

- i. Analite uygun biyoreseptörün seçilmesi,
- ii. Biyoreseptörün dönüştürücüye (transducer) immobilize edilmesinde kullanılacak yönteminin iyi değerlendirilmesi ve uygulanması
- iii. Biyoreseptörün analiti tanınmasıyla oluşan fiziksel veya kimyasal sinyali, elektronik sinyale çeviren dönüştürücünün tercihi ve tasarımı,
- iv. Ölçüm aralığına, duyarlılığa ve ölçümlerdeki girişimlere dikkat edilmesi,
- v. Cihazın, kullanımı kolay ve çevresel faktörlerden etkilenmesini en aza indireyecek bir şekilde tasarlanması (Koçer, 2017).

1.7.2. Elektrokimyasal Biyosensör Seçiminde Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar

- i. Duyarlılık:** Biyosensörün analit konsantrasyonundaki birim değişim başına sensörün verdiği yanıt olarak tanımlanır. Duyarlılık, kalibrasyon eğrisinin doğrusal aralığından hesaplanır. Doğrusal aralığın eğimi, biyosensörün duyarlılığını gösterir.
- ii. Seçicilik:** Sensörün belirli bir hedef analite, özel olarak yanıt verme özelliğidir. Analiti algılayacak biyoreseptör yüzeyinin, seçicilik sağlamak için geliştirilmemesi durumunda çıkış sinyali belirsizlik taşıyabilir ve bu da zayıf bir biyogölgeleme performansına yol açabilir.
- iii. Doğrusal Aralık:** Biyosensörün doğrusal aralığının belirlenmesi, biyosensörün hangi analit konsantrasyonları arasında kullanılabileceğinin belirlenmesinde

önemlidir. Doğrusal aralık, bazen dinamik aralık veya doğrusallık olarak da adlandırılabilir.

- iv. Yanıt Süresi:** Gerçek zamanlı analizde yanıt süresi, bir analitin yanıtının %95'ine ulaşması için gereken zamanı ifade eder. Yanıt süresi elektrokimyasal biyosensörlerde, analit konsantrasyonu ve doğrusal aralıktan etkilense dahi 10 dakikayı aşmamalıdır.
- v. Tekrarlanabilirlik:** Tekrarlanabilirlik, sensörün elde ettiği sonuçların doğruluğudur. Tekrarlayan ölçümlerde biyosensörün aynı çıktıyı vermesi oldukça önemlidir.
- vi. Algılama Limiti:** Algılama limiti (limit of detection, LOD), bir örnekte ölçülebilen en düşük analit yoğunluğunu ifade eder. Düşük algılama limiti, biyosensörlerin önemli bir avantajıdır.
- vii. Kullanım Ömrü:** Kullanım ömrü, biyosensörün kullanılabilir olduğu süreyi belirtir. Her biyosensörün kullanılmaya başlandığı zaman ve kaç ölçümde kullanıldığına bağlı olarak bir kullanım ömrü mevcuttur.
- viii. Stabilité:** Stabilité, belirli bir süre boyunca taban çizgisinde veya hassasiyetindeki değişikliği tanımlar (Akgül, 2021).

1.7.3. Elektrokimyasal Hücre Tasarımı

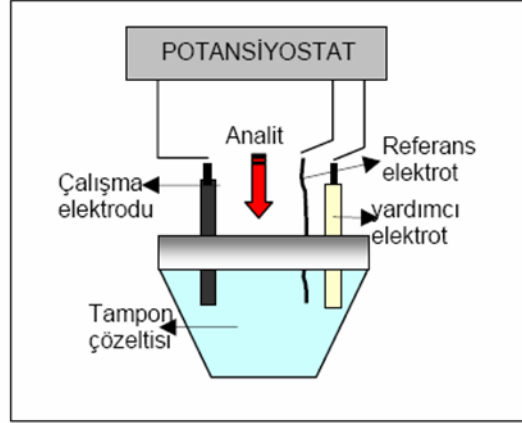
Bir elektrokimyasal hücre; indirgenebilen ya da yükseltgenebilen elektroaktif bir türü, bu türün içerisinde çözüneceği uygun bir çözünücü, destek elektroliti, üzerinde elektron transferinin gerçekleştiği elektrotları ve bu elektrotların voltaj/akım değerlerini uygulayacak potansiyostat bağlantısını içerir.

Elektrokimyasal hücreler, iki veya üç elektrotlu hücreler olmak üzere iki çeşittir. Üç elektrotlu sistemler aşağıdaki nedenlerden ötürü daha çok tercih edilmektedir.

- Elektroaktif maddelerin indirgenme ve yükseltgenme potansiyellerinin belirlenebilmesi,
- Elektrot potansiyelinin zamanla değişmemesi,
- Potansiyel kontrollü elektroliz yapılması.

Üç elektrodun kullanıldığı deney düzenekleri karşıt, çalışma ve referans elektrottan oluşur ve bu elektrotlar reaksiyon ortamına daldırılır (**Şekil 1.8**). Çalışma elektrodu ile karşıt

elektrot arasına, belli tarama hızlarında değiştirilen elektriksel potansiyel uygulanır. Bu potansiyel değişimi sonucunda çalışma elektrodu üzerinden geçen akım cevabı belirli referans elektrotlar kullanılarak belirlenir (Eryiğit, 2017).



Şekil 1.8 Elektrokimyasal hücre örneği.

i. Çalışma Elektrodu

Potansiyeli ölçüm esnasında doğrusal olarak değiştirilir, indikatör elektrot veya çalışma elektrodu olarak isimlendirilir. Genellikle, çalışma elektrotlarında polarizasyonu arttırmak için yüzey alanının küçük olması tercih edilir (Tepeli, 2015).

Voltametrde, çalışma elektrodunun avantaj sağlayan nitelikleri:

- i. Oldukça iletken ve sinyal cevabı süresi (etki-tepki) kısa olması,
- ii. Çalışılan potansiyel aralığında sadece analitin verdiği elektron transferini göstermesi, çalışma elektrodu olarak seçilen malzemenin herhangi bir reaksiyon vermemesi (inert),
- iii. Analitin verdiği elektron transferinin görülebileceği, potansiyel aralığı (pencere) geniş olması,
- iv. Elektrot modifikasyonu için kolay işlenebilir yüzeye sahip olmasıdır.

Çalışma elektrodlarının pek çok çeşidi (civa, platin, altın, camsı karbon, ITO vb.) mevcuttur. Yapılacak analize en uygun elektrot tercih edilir.

ii. Referans Elektrot

Referans elektrodun potansiyeli sistem üzerindeki tüm değişimlerden minimum derecede etkilenir ve pil hücresindeki diğer elektrotlara kıyasla bir karşılaştırma görevi görür.

Elektrot potansiyeli net olarak bilinen bir yarı hücredir. En yaygın kullanılan referans elektrotları Ag/AgCl ve Hg/Hg₂Cl₂'dür (doymun kalomel). İdeal bir referans elektrotun potansiyeli tersinir olmalı, zamanla değişmeyip küçük akım değişimleriyle potansiyeli fark göstermemeli ve sıcaklık değişimlerinden etkilenmemelidir (Tepeli, 2015). Tersinir karakterli ve Nernst eşitliğine uymalıdır.

iii. Karşıt (Yardımcı) Elektrot

Üçüncü elektrotun işlevi; uyarıcı elektriksel potansiyelin, potansiyostat kaynağından çıkıp çözeltiden geçmesi sayesinde çalışma elektroduna aktarılmasını sağlar. Yardımcı elektrot sadece elektron sunar sisteme ve hücreden akımın geçmesini sağlar. Çoğunlukla Pt gibi iletkenler tercih edilir (Güngör, 2020).

1.7.4. Elektroanalitik Yöntemler

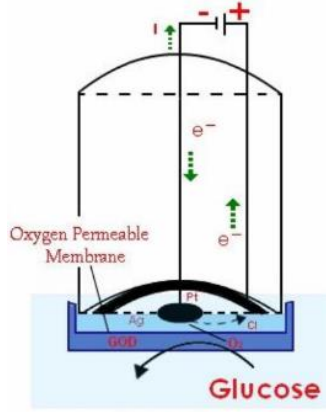
Elektrokimyasal yöntemler, kimyasal maddelerin reaksiyonları ile elektriksel özellikler arasındaki ilişkiyi kullanarak bir maddenin nicel veya nitel analizini gerçekleştirmesini sağlar. Bunun için çözelti veya analitlerin; akım, potansiyel, yük gibi elektriksel özellikleri kullanılır. Analit miktarının tayin edildiği kromatografik, spektrofotometrik gibi diğer yöntemlere göre, daha uygun maliyetli ve düşük konsantrasyonlarda bile sonuç verebilmeleri tercih edilmelerini sağlamaktadır (Özkan, 2022).

1.8. Elektrokimyasal Biyosensör Tipleri

Tipik bir voltametrik uyarı; elektrokimyasal olarak tayin edilecek analitin verdiği akım-potansiyel sinyalinin ölçülmesine dayanır. Hücredeki akımın, uygulanan potansiyel ile gerçekleşen kimyevi dönüşüm sayesinde oluşması ve akımın okunması prensibine dayalı farklı metotlar geliştirilmiştir.

1.8.1. Amperometrik Biyosensörler

Amperometrik biyosensörler, çalışma elektrodunda biyokimyasal reaksiyon ürünlerinin doğrudan yükseltgenmesi ya da indirgenmesi sayesinde oluşan akım değişimlerini ölçen analitik cihazlardır. O₂ ve H₂O₂ pek çok enzimatik reaksiyonun ko-substratı ve ürünü durumundadır. Amperometrik biyosensörler biyomedikal, çevresel ve endüstri gibi alanlarda kullanılmaktadır (Can, 2023).



Şekil 1.9 Tipik bir amperometrik biyosensör örneği

1.8.2. Potansiyometrik Biyosensörler

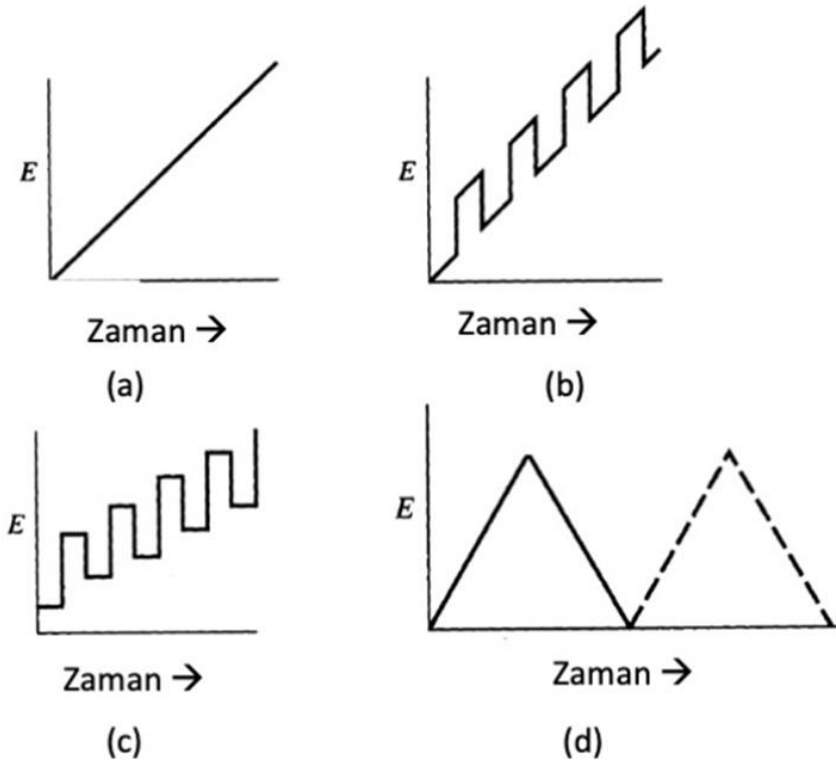
Potansiyometrik biyosensörler, bir çözelti içine daldırılmış iki elektrot arasındaki potansiyel farkını ölçer. Potansiyometrik biyosensörler temel tabakasını iyon seçici elektrotlar veya gaz duyarlı elektrotların üzerine bir veya daha fazla enzimin immobilizasyonu ile yapılmaktadır. Potansiyometrik enzim sensörler, iyon seçici elektrotlar ve gaz seçici elektrot temellidirler. Bunlar enzim sensörleri olup amonyak-amonyum, iyot, siyanür, pH ve karbondioksit duyarlı sensörlerdir (Sarıboğa, 2008).

1.8.3. Kondüktometrik Biyosensörler

Kondüktometrik biyosensörler, hemen hemen her enzimatik reaksiyonun elektroaktif substrat tüketimi veya ürün üretimi yapması prensibine dayanır ve bu sayede, test edilen örneğin iyonik bileşiminin genel bir değişimine neden olur. Kondüktometrik biyosensörler, elektrot yüzeyine immobilize olan biyoreseptörün iletkenliğini ölçebilen iki elektrotlu bir cihazdır. Reaksiyon ortamında tüketilen veya üretilen iyonlar, ortamda bulunan enzim immobilize çalışan elektroduyla ve karşıt elektrot arasındaki iyonik bir fark oluşturur. Bu fark kondüktometrik biyosensör tarafından algılanır (Soy, 2011).

1.9. Elektrokimyasal Ölçüm Teknikleri

Elektrokimyasal biyosensörlerde çeşitli ölçüm teknikleri kullanılmaktadır. Bunlar arasında doğrusal tarama uyarı sinyali, diferansiyel puls uyarı sinyali, kare dalga uyarı sinyali ve üçgen dalga uyarı sinyali yer almaktadır.



Şekil 1.10 En yaygın kullanılan dört voltametri yöntemi: (a) Doğrusal Tarama Uyarı Sinyali, (b) Diferansiyel Puls Uyarı Sinyali, (c) Kare Dalga Uyarı Sinyali, (d) Üçgen Dalga Uyarı Sinyali

1.9.1. Dönüşümlü Voltametri (Cyclic Voltametry, CV)

Dönüşümlü voltametri; karıştırılma işlemi olmaksızın, çözeltiye batırılmış bir elektrotun potansiyeli döngüsel olarak değiştirmek suretiyle (**Şekil 1.10 a**), elektroliz hücresinden geçen akımın zamana karşı ölçülmesine dayanır. Dönüşümlü voltametrde potansiyel zamanla doğrusal olarak değiştirilir ve farklı tarama hızlarında bu değişim tekrarlanabilir. Önemli olan elektron transfer hızına eşlik edebilecek hızda, taramalar yapılmasıdır. Dönüşümlü voltametri (CV) potansiyel taraması bir yönde yapılır ve ters yönde tarama da gerçekleştirilerek uygulama tamamlanır Bir dönüşümlü voltamogram elde etmek için elektrot-çözelti ara yüzeyine uygulanan uyarı sinyalinin zamanla değişimi **Şekil 1.10 d**'de gösterilmiştir (Kara, 2013).

1.9.2. Kare Dalga Voltametrisi (Square-Wave Voltametry, SWV)

Kare dalga voltametrisi geniş bir aralıklığa sahip, çok yönlü diferansiyel bir tekniktir. Kare dalga voltametrisi karışık, birbirine yakın, birden fazla elektron transfer işlemi barındıran ve bu yüzden de girişim yapabilen redoks reaksiyonlarının incelenmesinde kullanışlı bir tekniktir. Kare dalga voltametrisinde, çalışma elektrodu ile referans elektrodu arasındaki potansiyelin artışı kare şeklindeki dalgalar halinde gerçekleşmektedir. İleri ve ters yönlü pulsların sonunda oluşan kare dalga dönüşümü için akım ölçülür.

Bu yöntem düşük derişimlerde ve çok kısa sürede sonuçlar verdiğiinden tercih edilmektedir. Çok hızlı ve hassas bir tekniktir ve 10^{-8} M gibi oldukça seyreltik konsantrasyonlarda çalışma fırsatı sağlamaktadır (Özen, 2018; Tingaz, 2023).

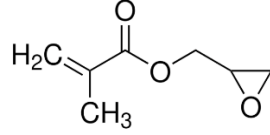


2. MATERYAL ve METOT

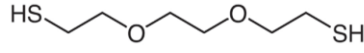
2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler

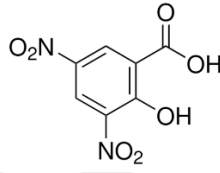
- Glisidil metakrilat (GMA)- Aldrich



- 3,6-dioksa-1,8-oktanditiol- Aldrich,



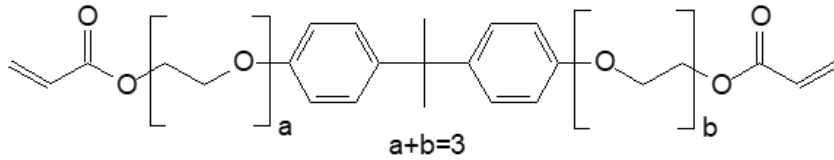
- 3,5-dinitrosalisilik asit (DNSA)- Merck



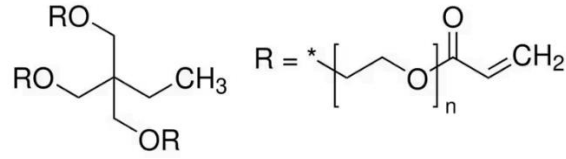
- α -amilaz (domuz pankreasından, Tip VI-B)- Merck



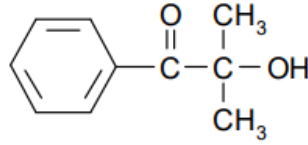
- Etoksile 3 Bisfenol A Diakrilat (SR349)- Sartomer'den hediye olarak elde edilmiştir.



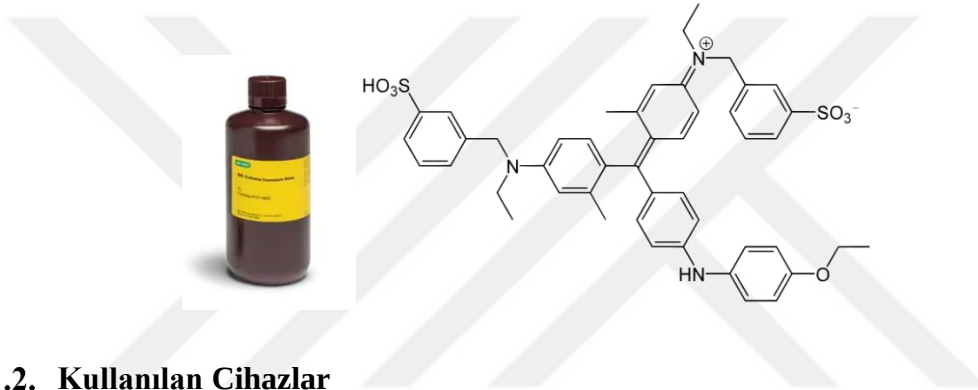
- Etoksile (20) Trimetilolpropan Triakrilat (SR415)- Sartomer'den hediye olarak elde edilmiştir.



- Darocure-1173 fotobaşlatıcı- Ciba Specialty Chemicals'den temin edilmiştir.



- Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad)



2.1.2. Kullanılan Cihazlar

- Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrometre : Perkin Elmer Spektrum 100ATR-FT-IR Spektrometre
- Spektrofotometre : ThermoScientific, Helioszeta UV-VIS (A.B.D.)
- Hassas Terazı : SartoriusAnalytic, A200S ±0,0001(Almanya)
- -80 °C Derin Dondurucu : ThermoElectronCorp., Forma (A.B.D.)
- Buzdolabı : Regal (Türkiye)
- Su Banyosu : Wasserbad WB Serisi (Almanya)
- Vorteks Karıştırıcı : Fisons, Whirlimixer (İngiltere)
- Destile Su Cihazı : Millipore, Rios-DI UV (A.B.D.)
- Manyetik Karıştırıcı : VelpScientifica, ARE (İtalya)
- pH metre : Hanna, HI 9024 (Romanya)
- Orbital Karıştırıcı : IKA-Werke, OS 10 B(Almanya)
- UV Sertleştirici :
- Potansiyotat/Galvanostat: Gamry Referans 600

Tüm ölçümler için aynı yardımcı elektrot ve referans elektrot kullanılmıştır;

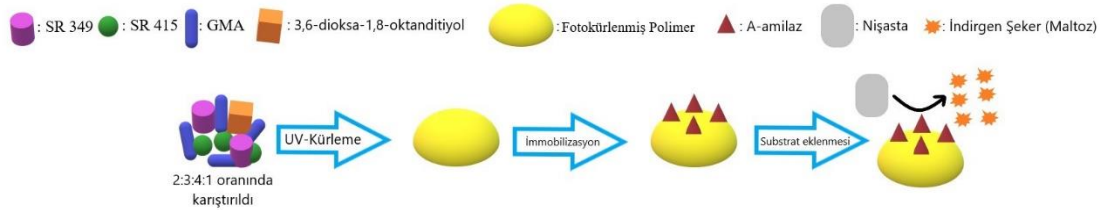
- Yardımcı elektrot: Spiral platin tel
- Referans elektrot: Doymuş kalomel elektrot (DKE)
- Çalışma elektrodu: ITO elektrot

Yapılan spektroeletroanalitik ölçümlerde çözelti ortamındaki O_2 'yi uzaklaştırmak için çözelti içinden gaz geçirme aparatı ile N_2 gazı geçirilmiştir. ITO, hazırlanan sentez maddenin çözeltisi bir püskürtme düzeneği vasıtasıyla kaplanmıştır.

2.2. Metot

2.2.1. Polimerin sentezi

CLEAR-epoksi temelli fotokürlenebilir polimer destek, SR349, SR415, GMA ve 3,6-dioksa-1,8-oktaneditiol'ü sırasıyla, 2:3:4:1 ağırlık oranında karıştırarak hazırlandı. Bu monomerlerin seçilmesinde düşük toksisite değerleri etkili oldu (Akremi, Beji ve Baklouti, 2015; Macherey ve diğerleri, 2021; Moilanen, Dahms ve Hoberman, 2013). Darocure-1173, sıvı tipi fotobaşlatıcı olarak kullanıldı ve miktarı %3 (ağırlık/ağırlık) olarak sabitlendi. Hazırlanan formülasyon daha sonra bir teflon kalıba aktarıldı. UV lamba altında 300 saniye süreyle ışıma yapıldıktan sonra 1 mm kalınlığında bir polimer destek elde edildi. **Şekil 2.1**, enzim immobilizasyonu için fotopolimerizable polimer desteğin hazırlanışını göstermektedir.



Şekil 2.1 Polimerik desteğin sentezi ve α -amilaz immobilizasyonu.

2.2.2. Polimerik Desteğin Karakterizasyonu

Enzim immobilizasyonu öncesi ve sonrasında hazırlanan polimerik desteğin fonksiyonel gruplarının analizleri, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) ile yapıldı.

Perkin Elmer Spektrum 100 ATR-FT-IR Spektrometre cihazıyla spektrumlar, 400-4000 cm^{-1} bandında ölçüldü.

2.2.3. A-Amilaz'ın İmmobilizasyonu

9 mg α -amilaz ve 10 mM fosfat tamponu (pH 6.9) içeren enzimatik çözeltiye, CLEAR-epoksi temelli fotokürlenmiş polimer destek üstü kapanacak şekilde eklendi. Çözelti, 25°C'de orbital karıştırıcı su banyosunda 24 saat boyunca inkübe edildi. Enzim immobilize edilmiş polimer fosfat tamponu (pH 6.9) içinden çıkarıldı. Fiziksel bağlı enzim, polimerin üç kez 10 mM fosfat tamponu (pH 6.9) ile yıkanması ile çıkarıldı. İmmobilizasyon başlangıcı ve sonunda, enzimatik çözeltiden alınan örnekler, polimere kovalent bağlanan enzim miktarını ölçmek için saklandı. Enzim-immobilize polimer, açık havada kurutuldu.

İmmobilize olan enzim miktarı, immobilizasyon öncesi ve sonrasında çözeltiden alınan üçlü örneklerin protein miktarlarının Bradford yöntemiyle analizi ve sonuçlarının aynı yöntemle hazırlanmış protein standart grafiği kullanılması ile belirlendi.

2.2.4. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini

İmmobilize enzim miktarı Bradford yöntemi ile yapıldı (Spencer ve Davie, 2003).

- i. Ovalbumin stok çözeltisinden (2mg/mL) seyreltilerek standartlar hazırlandı,
- ii. Örnekten 100 μL alındı.
- iii. Standart ve örneklerin toplam hacmi distile su ile 800 μL 'ye ayarlandı
- iv. Kör olarak 800 μL distile su kullanıldı.
- v. Standart, kör ve örnek çözeltilerine 200 μL Bradford reaktifi eklendi,
- vi. 595 nm'de, 10 dakika sonra köre karşı absorbans ölçümleri yapıldı.

2.2.5. Maltoz Standart Grafiğinin Hazırlanması

1mL, 10 mM fosfat tamponu (pH 6.9) içinde farklı konsantrasyonlarda maltoz çözeltileri hazırlandı. Maltozların konsantrasyonuna karşılık gelen absorbans değerlerinin bulunması için maltoz çözeltilerinin bulunduğu deney tüplerine 1'er mL DNSA reaktifi eklendi ve kaynar su banyosunda 5 dakika inkübe edilerek reaksiyon durduruldu. Ardından tüplerin oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Maltoz miktarı, 540nm'de

spektrofotometrik olarak belirlendi. Farklı konsantrasyonlardaki maltoz çözeltileri ve spektrofotometrede bu konsantrasyonlar için ölçülen absorbans değerleri, bir standart eğrisi hazırlamak için kullanıldı. Her uygulama üçlü tekrarlar halinde gerçekleştirildi.

2.2.6. Enzim Aktivitesi Tayini

Bu çalışmada, immobilize edilmiş α -amilazın aktivitesi, nişastadan açığa çıkan indirgen şekerlerin (maltoz) tespiti için 3,5-dinitrosalisilik asit (DNSA) kullanılarak belirlenmiştir (Paul, Gupta, Beliya, Tiwari ve Jadhav, 2021; Visvanathan ve diğerleri, 2020).

Deney tüpüne, miktarı bilinen α -amilaz immobilize polimer konuldu. Polimerlere 0.5 mL 10 mM fosfat tamponu (pH 6.9) eklendi. Ardından 0.5 mL saf suda çözünmüş nişasta (ağırlıkça %1) çözeltisi eklendi ve sistem, orbital karıştırıcılı bir su banyosunda tam 10 dakika, 30°C'de inkübe edildi. Reaksiyon, 1 mL DNSA reaktifi eklenmesinden sonra kaynar su banyosunda 5 dakika inkübe edilerek durduruldu. Ardından tüplerin oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Açığa çıkan indirgen şekerin (maltoz) miktarı, spektrofotometrik olarak 540 nm'de belirlendi. Her ölçüm üç kez tekrarlanmıştır.

Bir enzim aktivitesi birimi (U); deney koşulları altında, dakikada 1 μ mol maltozu açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Spesifik Aktivite (U/mg) = açığa çıkan maltoz (μ mol) / α -amilaz miktarı (mg) $\times$ dakika

2.2.7. pH'a Bağlı Olarak İmmobilize Enzimin Aktivite Değişikliği

pH'a bağlı immobilize ve serbest enzimlerin aktivite değişikliği, pH 3-9 arası (0.5 aralıklarla) farklı pH değerlerinde fosfat tamponlarında incelendi. Aktivite hesaplamaları, yukarıda belirtilen formül kullanılarak hesaplandı. %100 en yüksek aktivite değeri kabul edildiğinde ve diğer sonuçlar bu referans değere göre kıyaslanarak % aktivite hesaplamaları yapıldı. Bu değerlendirmeler sonucunda % bağıl aktiviteye karşı pH grafiği oluşturuldu.

İmmobilize enzimin pH'a bağlı aktivite değişiminde zamanın rolünün incelenmesi için yukarıdaki adımlar 21 günlük immobilize enzim için tekrarlandı.

2.2.8. Sıcaklığa Bağlı Olarak İmmobilize Enzimin Aktivite Değişimi

Sıcaklığın etkisinin, immobilize ve serbest enzim aktivitesi üzerindeki değişimleri gözlemek amacıyla farklı sıcaklıklarda (30°C-80°C) aktivite tayini yapıldı. %100 en yüksek aktivite değeri kabul edildiğinde ve diğer sonuçlar bu referans değere göre kıyaslanarak % aktivite hesaplamaları yapıldı. Bu değerlendirmelerin sonucunda % Bağlı Aktiviteye karşı sıcaklık grafiği oluşturuldu.

2.2.9. Enzim Kinetiğinin İncelenmesi

İmmobilize enzimin V_{max} ve K_m değerleri, farklı substrat konsantrasyonları (0.45-1 mg/ml) kullanılarak reaksiyonunun başlangıç hızlarından, belirlenmiştir.

2.2.10. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

Her döngü için, immobilize enzime 0.5 mL 10 mM fosfat tamponlu (pH 6.5), %1 ağırlıkça nişasta içeren 0.5 mL eklenmiş ve her bir döngü için 30°C'de sabit çalkalama altında 10 dakika boyunca inkübe edildi. Reaksiyonun sonunda immobilize enzim alındı ve distile su ile yıkandı. Sonraki kullanım, enzimin yukarıda belirtilen şekilde tekrar kullanımı ile gerçekleştirildi.

Deney, ılımlı (30°C) ve ekstrem (60°C) koşulların tekrar kullanılabilirlik üzerine etkisini incelemek için ekstrem koşullarda tekrarlandı.

2.2.11. İmmobilize Enzimler Üzerine Depolama Kararlılıklarının Etkisi

Başlangıç aktivitelerinin belirlenmesinin ardından, immobilize ve serbest enzim 4°C'de kapaklı şişelerde bekletildi ve bu enzimlerin aktiviteleri 2 ay süresince belirli sürelerde ölçüldü.

2.2.12. Biyosensör Tasarımı

CLEAR-epoksi temelli fotopolimer destek, SR349, SR415, GMA ve 3,6-dioksa-1,8-oktaneditiol'ü sırasıyla, 2:3:4:1 ağırlık oranında karıştırarak hazırlandı. Darocure-1173, sıvı tipi fotobaşlatıcı olarak kullanıldı ve miktarı %3 (ağırlık/ağırlık) olarak sabitlendi. Hazırlanan formülasyon daha sonra indiyum kalay oksit (ITO) elektrot üzerine aktarıldı.

UV lamba altında 300 saniye süreyle ışıma yapıldıktan sonra ITO üzerinde 1 mm kalınlığında bir polimer (CLEAR-ITO) elde edildi.

Elde edilen CLEAR-ITO daha sonra, 9 mg α -amilaz içeren 10 mM fosfat tamponu (pH 6.9) ile 25°C'de orbital karıştırıcılı su banyosunda 24 saat boyunca inkübe edildi. Fiziksel bağlı enzim, α -amilaz-CLEAR-İTO üç kez 10 mM fosfat tamponu (pH 6.9) ile yıkanması ile çıkarıldı.

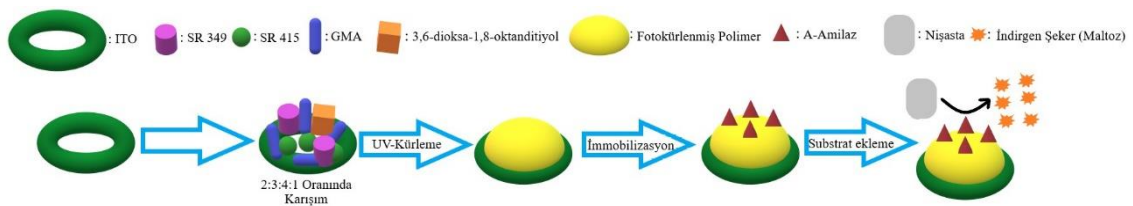
2.2.13. Biyosensör Ölçümleri

Aşağıda **Şekil 2.2**'de tasarımı gösterilen modifiye elektrot sisteminin sensör özelliği tayini için ITO çalışma elektrodu üzerine ince filmleri elde edilmiştir. Bu filmlerin biyosensör olarak kullanım potansiyelleri; kare dalga voltametri (SWV) tekniği ile elektrokimyasal olarak karakterize edilmiştir.

Söz konusu ölçümler için Potansiyostat/Galvanostat kullanılarak 25 °C sıcaklıkta üç elektrotlu bir sistem kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

ITO, CLEAR-ITO ve α -amilaz-CLEAR-ITO yöntemiyle sırayla ölçülmüştür. Ölçüm ortamı immobilize edilen α -amilaz enzimi için yapılan deneylerde optimum çalışma ortamı; 10 mM fosfat tamponu, pH 6.5 olarak ayarlanmıştır.

Ancak α -amilaz-CLEAR-ITO ince filmlerin; fosfat tamponu ve pH 6.5 ortamında kararsız oluşu sebebi ile istenilen senyör sinyali elde edilememiştir.



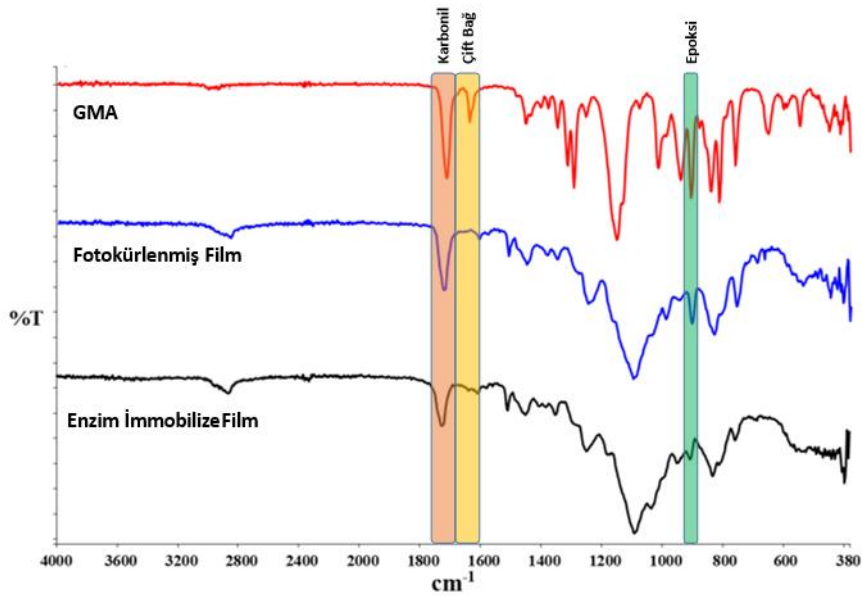
Şekil 2.2 Biyosensör üretimi ve ölçümlerin alınması



3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. CLEAR Polimerinin Karakterizasyonu

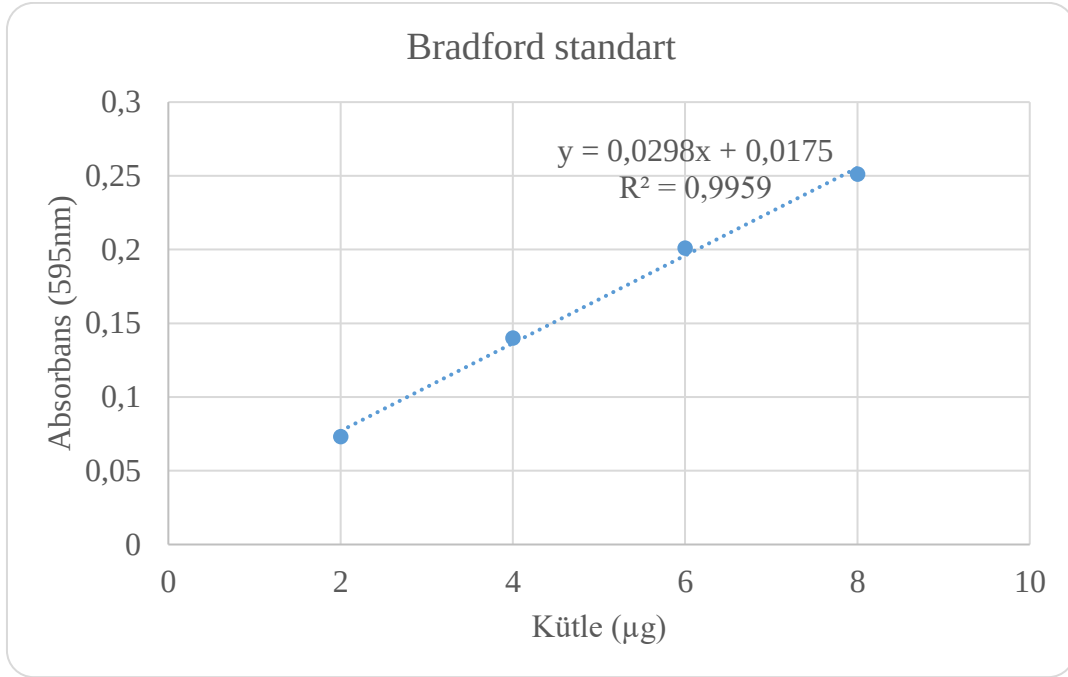
Şekil 3.1’de kullanılan monomerlerden GMA’nın ile fotokürlenmiş polimerin enzim immobilizasyonu öncesi ve sonrası ATR-FT-IR spektrumları verilmiştir. AGE’nin epoksi halkasından dolayı GMA’da 911 cm^{-1} ’de pik görülmüştür. 1645 cm^{-1} ’de allil piklerinin FT-IR spektrumunda olmaması başarılı bir şekilde filmlerin sentezlendiğine işaret etmektedir. 1732 ve 1680 cm^{-1} ’deki pikler monomerlerin karbonil gruplarını göstermektedir.



Şekil 3.1 GMA’nın ve fotokürlenmiş polimerin enzim immobilizasyonu öncesi ve sonrası ATR-FT-IR spektrumları.

3.2. Polimerik Desteğe İmmobilize Olan Enzim Miktarının Hesaplanması

Bradford yöntemi kullanılarak immobilize enzim miktarı, protein standart grafiği yardımıyla hesaplandı. Şekil 3.2’de gösterilen oluşturulan standart protein grafiği verildi.



Şekil 3.2 Bradford yöntemiyle hazırlanmış protein standardı grafiği.

 mmobilizasyon başlangıçtaki enzim miktarı ( g), bağlanmayan enzim miktarı ( g), 1 gram polimerik destek üzerine bağlanan enzim miktarı ( g/1g destek) ve bağlanma yüzdesi (%) Tablo 1’de gösterilmiştir.

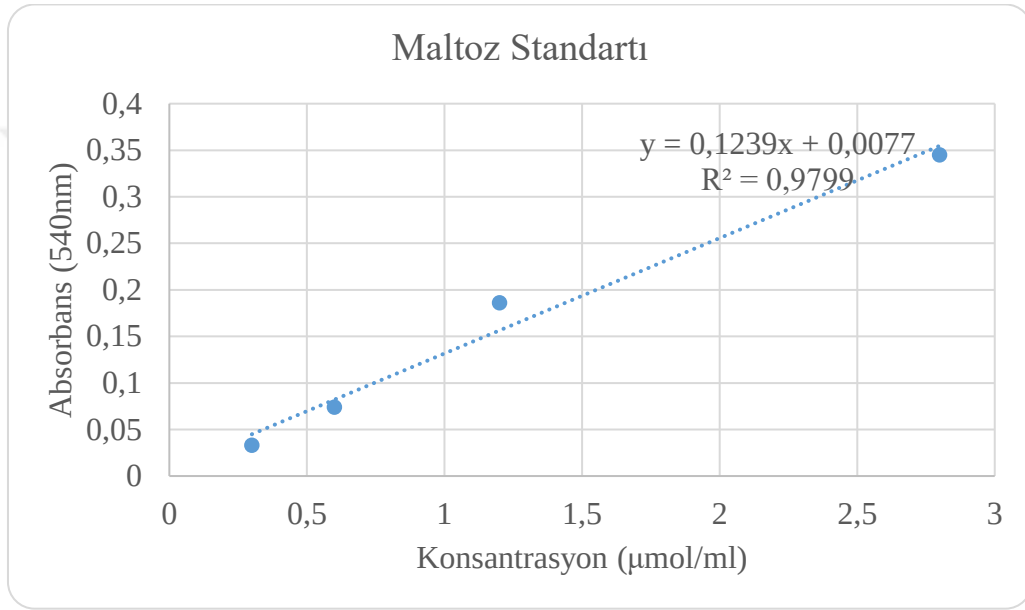
Başlangıçtaki Enzim Miktarı (�g)	Bağlanmayan Enzim Miktarı (�g)	Bağlanan Enzim Miktarı (�g)/ 1g Polimerik destek	Bağlanma yüzdesi (%)
633,22	462,08	107,64	27,03

Tablo 1  mmobilizasyon çözeltisinde başlangıçtaki, sondaki (polimerik desteğe bağlanmayan), polimerik desteğin bir gramına bağlanan enzim miktarları (mg) ve bağlanma yüzdesi.

Enzim immobilizasyonu çalışmalarında polimerik destek, kullanılan enzim çeşidi ve immobilizasyon yöntemi çeşidine göre enzim immobilizasyonu başarısı değişebilmektedir. Guo, Tang, Yu, Xue ve Qian (2016) yaptıkları çalışmada manyetik Fe₃O₄ nanopartiküllerine kovalent yöntemle immobilize ettikleri domuz pankreatik  -amilazında %43.9 immobilizasyon verimi hesaplamışlardır. T r n , Kahraman, Akdemir, Kayaman-Apohan ve Güngör (2009) 1g destek ba ına 34.4 ± 2.6 mg domuz

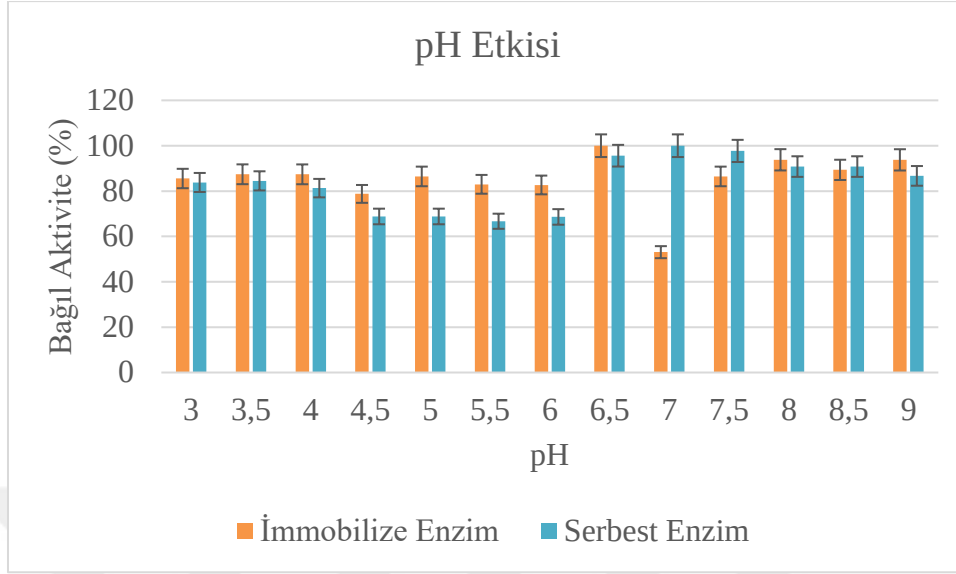
pankreatik α -amilaz immobilize ettiklerini bildirmişlerdir. Kahraman, Bayramoglu, Kayahan-Apohan ve Gungor (2007), 1g fonksiyonelleştirilmiş cam boncuk başına 25.2 ± 3.1 mg domuz pankreatik α -amilazı kovalent immobilize etmişlerdir. Bayramoğlu, Yilmaz ve Arica (2004), poli(2-hidroksietilmetakrilat-ko-glisidilmetakrilat) üzerine immobilize ettikleri termostabil α -amilaz için immobilizasyon oranını $51 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ olarak hesaplamışlardır.

3.3. Maltoz Standart Grafiği



Şekil 3.3 Maltoz standart grafiği.

3.4. pH'a Bağlı Olarak İmmobilize ve Serbest Enzimin Aktivite Değişimi



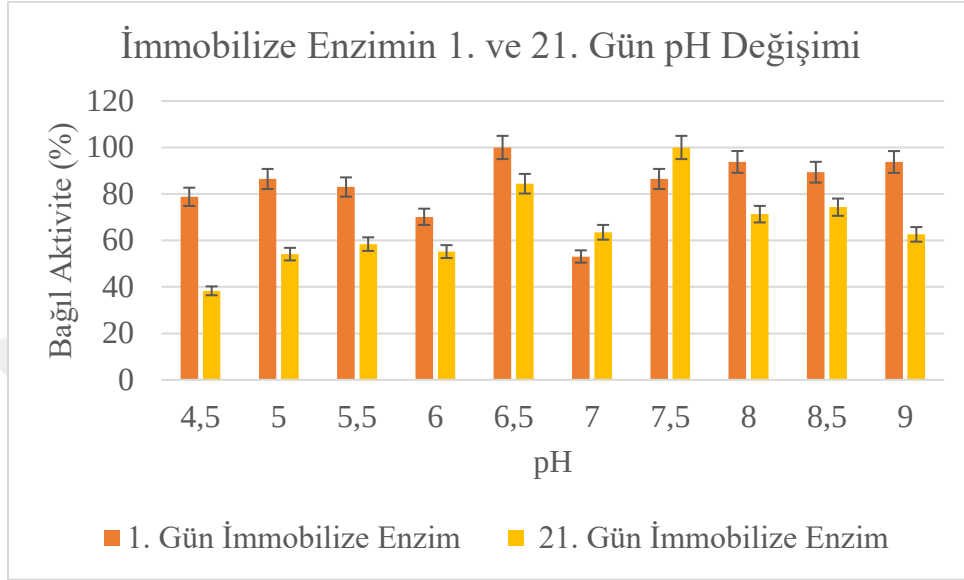
Şekil 3.4 İmmobilize ve Serbest Enzimin pH'a Bağlı Olarak Aktivite Değişimi

pH'a bağlı olarak serbest ve immobilize α -amilazların aktivitesi incelenmiş ve pH 3-9 aralığındaki değişimi araştırılmıştır. Sonuçlar **Şekil 3.4**'te sunulmuştur. Serbest α -amilazda maksimum aktivite pH 7'de, immobilize enzimde ise pH 6.5'ta gözlenmiştir. Bu kayma, enzim immobilizasyonu ile polimerik matriksin yapısına ve yüküne bağlıdır. Bununla beraber, immobilize enzimin aktivitesinde pH 7'de azalma gözlenmiş ve bu durumun enzimin aktif merkezinin mikroçevresinde oluşan pH değişiminden kaynaklanabileceği tahmin edilmektedir. İnceleme sonucunda ayrıca immobilize enzimin, pH 4.5-6 aralığında bağlı aktivitesini daha iyi koruduğu anlaşılmıştır.

Şekil 3.4'te pH 3-4 arasında görülen aktivite artışı, α -amilaz'a bağlı olmayıp nişastanın asidik ortamda glikozidik bağlarının hidroliz olmasından dolayıdır (Elmarzugi ve diğerleri, 2014; Jujjavarapu ve Dhagat, 2019).

İmmobilizasyon sonucunda α -amilaz'ın hangi pH derecesinde optimum aktivite göstereceği immobilizasyon tekniğine ve immobilize edilen desteğin kimyasal yapısına bağlıdır. Bu nedenle Varavinit, Chaokasem ve Shobsngob (2002) dialdehit selüloz üzerine kovalent immobilize ettikleri termostabil α -amilaz enziminin optimum pH'ının pH 7-9 aralığında çok fazla değişmediğini bildirmişlerdir. Ashly, Joseph ve Mohanan (2011), polianilin türevlerine malttan elde edilen α -amilaz enziminin adsorpsiyon immobilizasyonunda kullanılan polimere göre optimum pH'ının 4.5 ve 5.5; kovalent

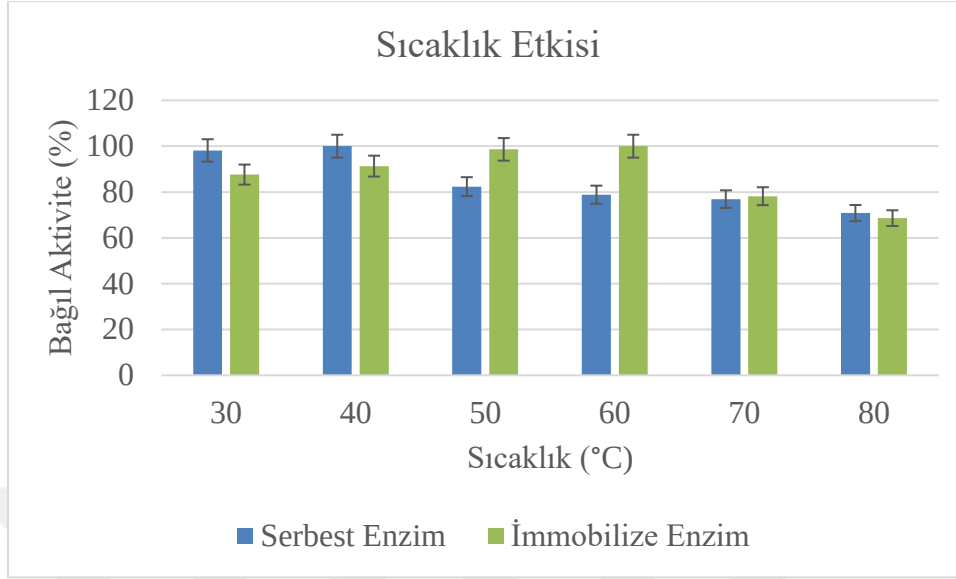
immobilizasyonda ise pH 5.5 olduğunu bulmuşlardır. Kurumumuzda yapılan önceki bir çalışmada ise Çakmakçı, Çiğil, Danış, Demir ve Kahraman (2014), amina edilmiş poliimid membrana immobilize ettikleri domuz pankreatik α -amilaza ait optimum pH'ı 4 olarak bulmuşlardır.



Şekil 3.5 İmmobilize Enzimin 1. ve 21. Gün pH Değişimi

İmmobilize enzim üzerine pH'ın etkisinin zamandan etkilenişi de incelenmiştir. İmmobilize enzimin 1. ve 21. günlerdeki pH değişimi, pH 4.5-9 aralığında test edilmiş ve sonuçlar **Şekil 3.5**'te sunulmuştur. İmmobilize enzimin, 1.günde optimum pH'ı 6.5 iken 21. günde 7.5'a kaymıştır. Bu değişim enzimin kovalent bağlı olduğu polimerik ortamda zamanla gerçekleşen değişimden dolayı olabilir.

3.5. Sıcaklığa Bağlı Olarak İmmobilize ve Serbest Enzimin Aktivite Değişimi



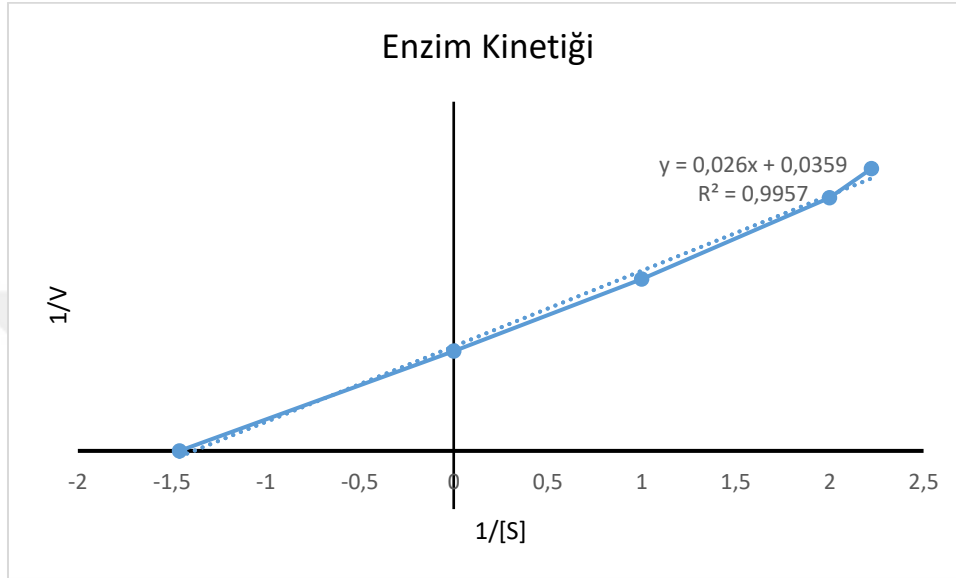
Şekil 3.6 İmmobilize ve serbest enzimin sıcaklığa bağlı olarak aktivite değişimi

Doğal bir enzimin termal stabilitesini artıramama, uygulamaları için en önemli sınırlamalardan biridir. Serbest ve immobilize α -amilazların aktivitesi çeşitli sıcaklıklarda (30-80°C) optimal pH'ta (6.5) ölçülmüştür. **Şekil 3.6**'daki sonuçlar, serbest α -amilazın maksimum katalitik aktivitesinin 40°C'de, immobilize α -amilazın ise 60°C'de elde edildiğini göstermektedir. Bununla beraber, sıcaklık arttıkça immobilize α -amilazın daha iyi termal stabilite sergilediğini anlaşılmıştır. Bu bulgular ışığında immobilize enzimin pH 6.5'ta, 60°C'de optimal aktivite gösterdiği saptanmıştır. Serbest enzim ise pH 7'de, 40°C'de optimum aktivite sergilemektedir. Genel olarak immobilize α -amilaz, serbest haline göre daha iyi bir termal stabilite sergilemiştir.

El-Banna, Abd-Aziz, Abou-Dobara ve Ibrahim (2008) yaptıkları çalışmada *Bacillus licheniformis*'ten elde edilen α -amilazın farklı immobilizasyon materyalleri ve yöntemleri kullanmışlardır. α -amilazın kullanılan materyale ve yöntemle bağlı olarak farklı optimum sıcaklık değerleri gösterdiğini bildirmişlerdir. Bahsi geçen çalışmada enzimin sephadex'e kovalent immobilizasyonda optimum sıcaklık 70°C; dowex'e iyonik immobilizasyonda, kitine adsorpsiyon ile immobilizasyonda ve kalsiyum-aljinat boncuklarına hapsetme yöntemiyle immobilizasyonda 80°C optimum sıcaklık kaydedilmiştir. Pandya, Jasra, Newalkar ve Bhatt (2005) mezoporlu silika üzerine *Aspergillus oryzae*'dan elde edilen α -amilazı kovalent yöntemle immobilize etmiş ve

optimum sıcaklık ölçümlerinde 30°C bulduklarını bildirmişlerdir. Khan, Husain ve Azam (2012) ise manyetik Fe₂O₃ üzerine immobilize ettikleri domuz pankreatik α -amilazın 50°C de optimum aktiviteye sahip olduğunu gözlemişlerdir.

3.6. Enzim Kinetiğinin İncelenmesi



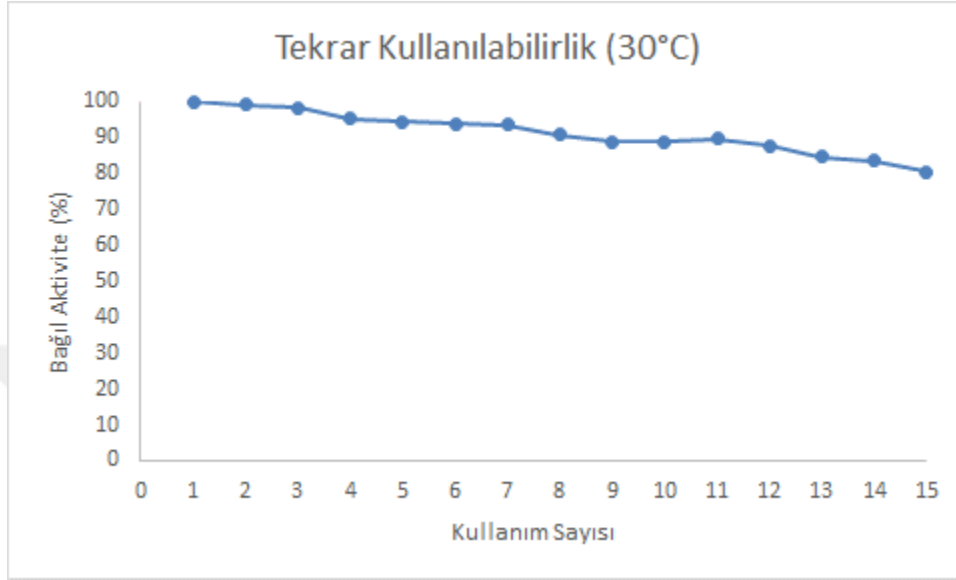
Şekil 3.7 Enzim Kinetiği – Lineweaver-Burk Grafiği

İmmobilize edilmiş α -amilazın kinetik parametreleri, Michaelis sabiti (K_m) ve maksimum aktivite (V_{max}), çözünür nişasta substratı kullanılarak pH 6.5 ve 60°C'de tayin edilmiştir. K_m değeri immobilize α -amilaz için 0,735 mg.ml⁻¹ olarak bulunmuştur. K_m değeri, enzimlerin substratlarına olan afiniteleri ile ilişkilidir. Düşük K_m değeri, enzimlerin substratlarına yüksek afinite gösterdikleri anlamına gelmektedir (Berg ve diğerleri, 2002). İmmobilize edilmiş enzimler için V_{max} değeri 27,624 μ mol.ml⁻¹.dk⁻¹ (9.455 mg.ml⁻¹.min⁻¹) olarak hesaplanmıştır.

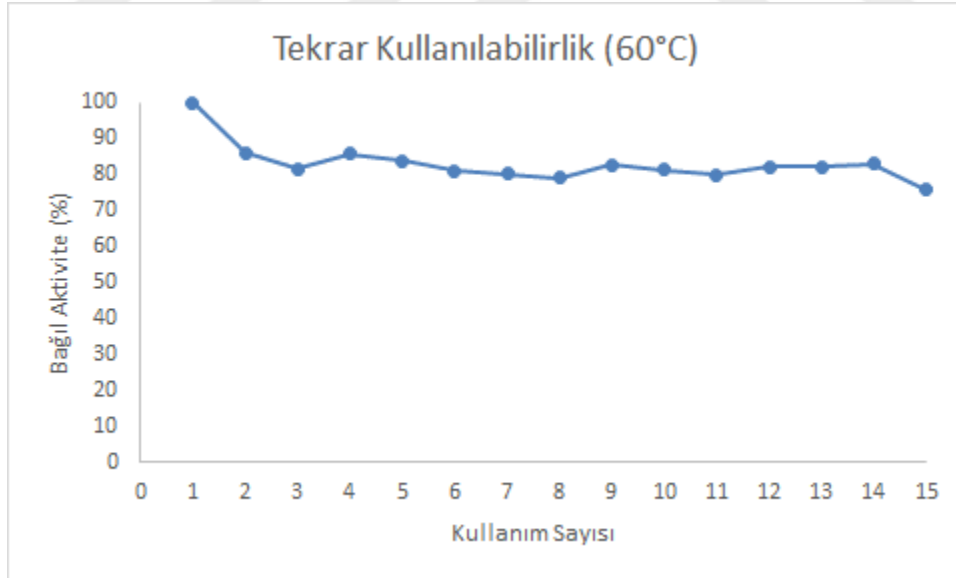
Tee ve Kaletunç (2009), yapıları çalışmada aljinat boncuklarına termostabil α -amilaz immobilize etmiş ve enzimin ilk kullanımında kinetik değerlerini $K_m=0,98$ mg/mL $V_{max}=23,3$ μ mol/mg.dk olarak hesaplamışlardır. Dey, Bhupinder ve Banerjee (2003), kalsiyum-aljinata immobilize ettikleri *Bacillus circulans* GRS 313'ten elde edilen α -amilazın kinetik değerlerini $K_m=26,5$ mg/mL, $V_{max}=40.48$ μ mol/mg.min olarak bildirmişlerdir. El-Shishtawy, Aldahri ve Almulaiky (2020), elektropsine immobilize

ettikleri *Bacillus subtilis*'ten elde edilen α -amilazın $K_m=0.393$ mg/mL, $V_{max}=0.254$ μ mol/min değerleri gösterdiğini iletmişlerdir.

3.7. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi



şekil 3.8 İmmobilize enzimin ılımlı koşullarda tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi



şekil 3.9 İmmobilize enzimin ekstrem koşullarda tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi

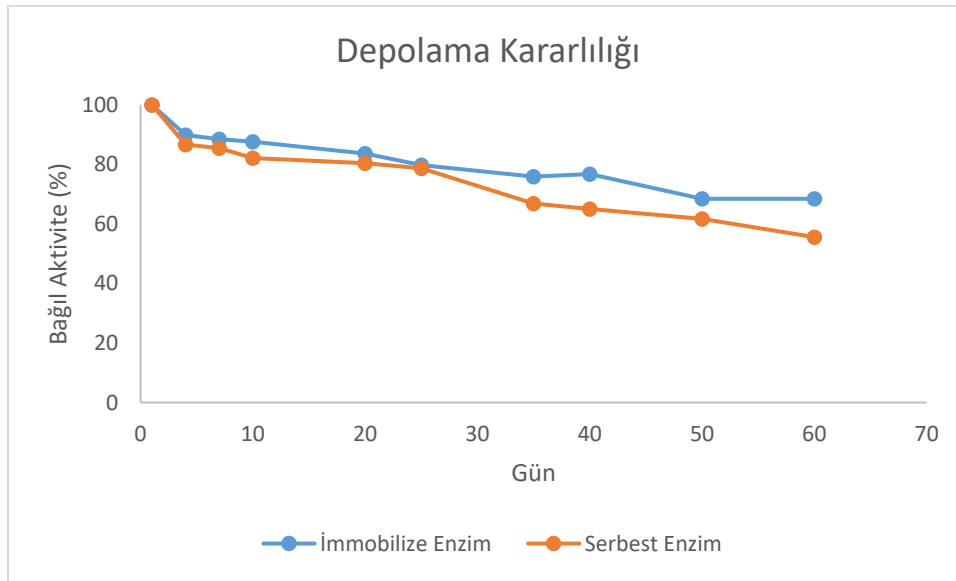
İmmobilize enzim ardışık 15 deneme boyunca kullanıldı ve bağıl aktivitesi hesaplandı. Deney, ılımlı (30°C, şekil 3.8) ve ekstrem (60°C, şekil 3.9) koşulların tekrar kullanılabilirlik üzerine etkisini incelemek için ekstrem koşullarda tekrarlandı.

Ilımlı koşullarda, aynı immobilize enzim örneği kullanılarak yapılan 15 ardışık denemenin sonuçları **Şekil 3.8**'de verilmiştir. Ilımlı koşullarda immobilize enzimin bağlı aktivitesi ilk 8 kullanım sonunda %90.6, 15 kullanım sonunda ise %80.36 bulunmuştur.

Farklı bir immobilize enzim örneği ile ekstrem koşullarda 15 tekrar kullanım denemesi sonuçları **Şekil 3.9**'da verilmiştir. İmmobilize enzimin ekstrem koşullarda bağlı aktivitesi ilk 3 kullanım sonucunda %81.5 bulunurken 15 kullanım sonucunda %75.66 olduğu gözlenmiştir.

Akhond, Pashangh, Karbalaie-Heidari ve Absalan (2016) yaptıkları araştırmada amino-fonksiyonlaştırılmış manyetik nanopartikül üzerine kovalent olarak immobilize ettikleri domuz α -amilazının 9. kullanımda %68 bağlı aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Ertan, Yagar ve Balkan (2007) ise kalsiyum-arjinat desteğine hapsetme yöntemiyle immobilize ettikleri *Aspergillus sclerotiorum* tarafından üretilmiş α -amilazda 7. kez kullanımda, %65 aktivite gözlemlemişlerdir. Tincu (Iurciuc) ve diğerleri (2023) gellan-bazlı hidrojel partiküllerine iyonik-çapraz bağlama immobilizasyonu ile bağladıkları domuz pankreatik α -amilazının 15. kullanımında %28 aktivite gösterdiğini iletmişlerdir. Nazarova ve diğerleri (2022), seramik membrana immobilize ettikleri *Bacillus subtilis* α -amilazının 8.kullanımda yaklaşık %20 aktivite gösterdiğini kaydetmişlerdir.

3.8. Serbest ve İmmobilize Enzim Üzerine Depolama Kararlılıklarının Etkisi



Şekil 3.10 İmmobilize ve serbest enzimin bağlı depolama kararlılığı grafiği

Başlangıç aktiviteleri belirlendikten sonra serbest ve immobilize enzim 4°C’de kapaklı şişelerde bekletildi. 2 ay belirli aralıklarla serbest ve immobilize enzimin aktivitesi ölçüldü.

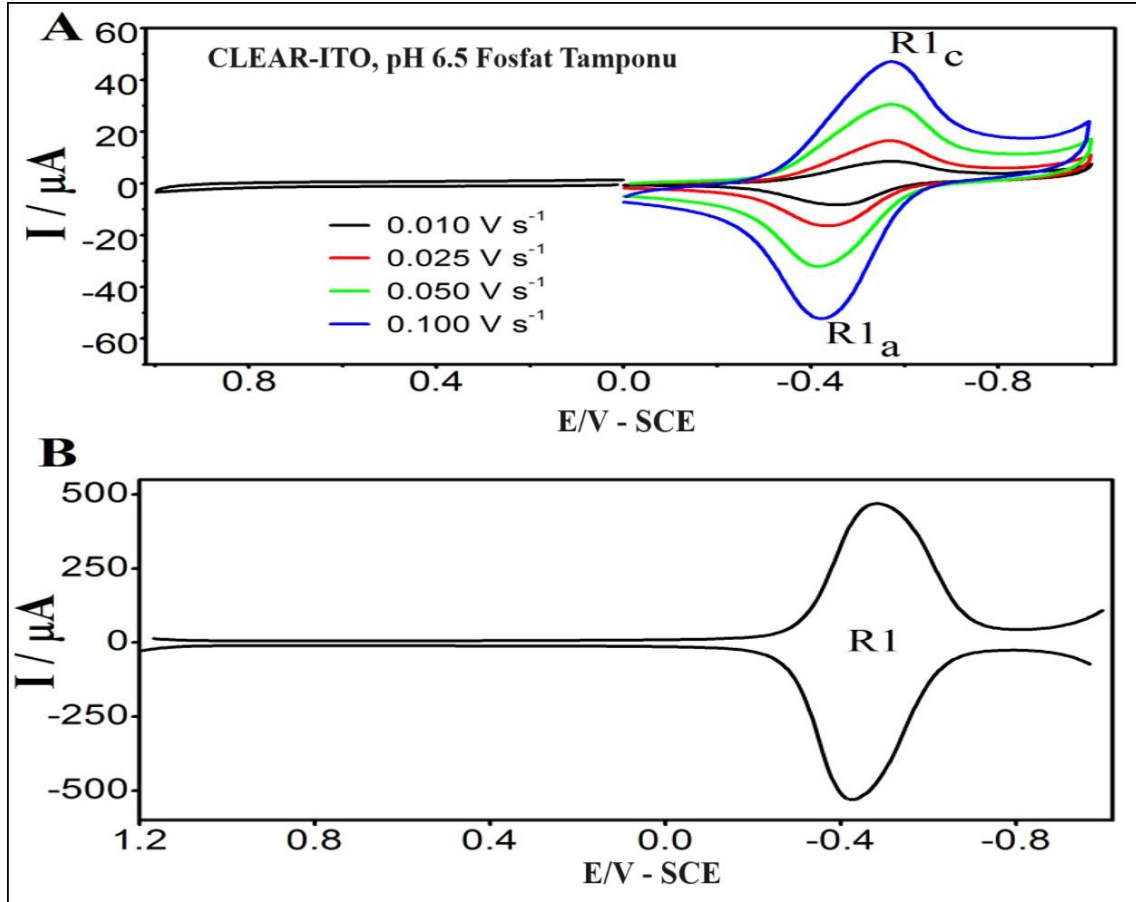
2 ay sonunda serbest enzimin aktivitesi %55.57 iken immobilize enzimin aktivitesi %68.43 olarak bulunmuştur.

Mortazavi ve Aghaei (2020) yaptıkları çalışmada α -amilazı tek başına immobilize ettikleri sodyum-sepiolitlerde 30.günün sonunda %66.7 aktivite tespit etmişlerdir. Aksoy, Tunturk ve Hasirci (1998) karbodiimit ile aktive edilmiş poli(metilmetakrilat-akrilik asit) mikrokürelerine immobilize domuz pankreatik α -amilazın, kalsiyum iyonu varlığında %90.3; yokluğunda %24.5 aktivite gösterdiğini iletmişlerdir. Aynı çalışmada tionil klorür ile aktive edilmiş poli(metilmetakrilat-akrilik asit) mikrokürelerine immobilize domuz pankreatik α -amilazın ise kalsiyum iyonu varlığında %83.7; yokluğunda %52.5 aktivite ye sahip olduğunu da saptamışlardır.

3.9. Biyosensör Ölçümleri

CLEAR-epoksi temelli fotopolimer destek malzeme, indiyum kalay oksit (ITO) çalışma elektrotu üzerine aktarıldı ve CLEAR-ITO modifiye ince film elektrodu elde edildi. Sensör özelliği tayininde temel oluşturan; elektriksel akım-potansiyel cevabı için, ITO çalışma elektrodu üzerinde ince filmleri elde edilmiştir. Bu filmler; CV ve SWV voltametrik ölçümleri ile elektrokimyasal olarak karakterize edildi ve CLEAR-ITO modifiye filmlerin, biyosensör olarak kullanım potansiyelleri olduğu anlaşılmıştır.

Elde edilen voltamogramlar üç elektrotlu bir sistem kullanılarak gerçekleştirilmiştir (**Şekil 3.11**). Bu ölçümlerde; ITO, CLEAR-ITO ve α -amilaz-CLEAR-ITO yöntemiyle sırayla ölçülmüştür. Ölçüm ortamı immobilize edilen α -amilaz enzimi için yapılan deneylerde optimum çalışma ortamı; 10 mM fosfat tamponu, pH 6.5 olarak ayarlanmıştır



Şekil 3.11 CLEAR-ITO elektrodunun, 10 mM fosfat tamponu ve pH 6.5 çözelti ortamında, A- farklı tarama hızlarında kaydedilen dönüşümlü voltametri ölçümlerini (CV), B- ise kare dalga voltametrisi ile kaydedilen ölçümleri

Ancak α -amilaz-CLEAR-ITO enzim immobilizasyonu ile ölçüm sağlanamamıştır. Biyosensör üretimi çalışmalarımız ise gelecek projelerde devam edecektir.

4. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, gıda endüstrisinde kullanılmak üzere α -amilaz enzimi CLEAR fotokürlenabilir filmlere kovalent olarak immobilize edilmiş ve enzim aktivitesi çalışmaları gerçekleştirilerek en uygun aktivite koşulları belirlenmiştir. Destek materyaline bağlanma yüzdesi %27.03 bulunmuş ve 1 gram polimerik destek başına 107,64 μ g enzim immobilize edilmiştir.

Serbest ve immobilize α -amilaz üzerine pH etkisi incelenmiş, serbest α -amilaz için maksimum aktivite pH 7'de gözlenirken, polimerik filme immobilize edilen α -amilaz için maksimum aktivite pH 6.5'te belirlenmiştir. İnceleme sonucunda, immobilize α -amilazın pH 4.5-6 aralığında daha iyi bağlı aktivite gösterdiği anlaşılmıştır. Optimum pH değerinin immobilize enzim için desteğe bağlı olarak değiştiği birçok çalışmada gösterilmiştir. Desteğin yüzeyindeki yük dağılımları ve enzimin destekle etkileşimi ile bu durumu açıklayabiliriz. Serbest α -amilaz için maksimum aktivite 40°C'de gözlenirken, immobilize α -amilaz için bu değer 60°C'de belirlenmiştir. İmmobilizasyon sonucunda enzimin konformasyonel hareketliliğinin kısıtlanması onu dış etkilere karşı daha kararlı hale getirir. Bu nedenle, immobilize enzim serbest enzime göre daha yüksek sıcaklıklarda daha aktif olabilir.

Seçilen destek materyali veya yöntemin etkinliğinin değerlendirilmesinde, immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği büyük önem taşır. Gıda endüstrisinde kullanılabilirliğini değerlendirmek için yapılan 15 ardışık denemenin sonunda, ılımlı koşullarda bağlı aktivitenin %80.36 olduğu; ekstrem koşullarda ise %75.66 olduğu bulunmuştur. Serbest ve immobilize enzimlerin aktiviteleri 60 gün boyunca belirli zaman aralıklarında ölçülmüştür. Serbest α -amilaz için 60. gün sonunda aktivite %55.57 iken, immobilize α -amilaz için bu değer %68.43 olarak tespit edilmiştir.

Yapılan biyosensör çalışmalarımızda ITO elektrot polimerle kaplanabilmiş ve elektrokimyasal ölçümler kaydedilmiştir. Ancak çapraz bağlı etoksile akrilat reçinesine polimeri bir aktivite göstermesine rağmen enzim immobilizasyonu ile istenilen elektrokimyasal ölçümler sağlanamamıştır. Biyosensör üretimi çalışmalarımız ise gelecek projelerde devam edecektir.

CLEAR-epoksi tabanlı fotopolimerin monomerleri biyolojik olarak uyumluluğu ve düşük toksisite seviyelerine sahip olduğu literatürde belirtilmiştir. Bu özellikler, kullanılan

polimerin gıda endüstrisinde kullanım için uygun olmasını sağlar. Kovalent immobilizasyon yöntemi sayesinde CLEAR-epoksi tabanlı fotopolimere immobilize edilmiş α -amilazın süzüntü ile çıkma olasılığı düşüktür. İmmobilize edilmiş α -amilazın asidik koşullarda (pH 4.5-6.5) arasında iyi aktivite ve serbest enzime nazaran daha iyi termostabilite sergilemiştir. Yapılan denemelerde ılımlı ve ekstrem koşullarda 15.kullanımda bile aktivitesini büyük ölçüde korumaktadır. Bu veriler ışığında, CLEAR-epoksi tabanlı fotopolimere immobilize α -amilazın gıda endüstrisinde kullanıma uygundur.





KAYNAKLAR

- Afzaljavan, F., Mobini-Dehkordi, M. ve Javan, F. A. (2012) Application of Alpha-Amylase in Biotechnology. *Journal of Biology and today's world*, 1(1), 39-50. doi: 10.11648/j.ijnfs.20160504.15
- Ajandouz, E. H. ve Marchis-Mouren, G. J. (1995) Subsite Mapping of Porcine Pancreatic Alpha-Amylase I and II Using 4-nitrophenyl- α -maltooligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 268(2), 267-277. doi: 10.1016/0008-6215(94)00335-D
- Akdag, A., Işık, M. ve Göktaş, H. (2020) Conducting Polymer-Based Electrochemical Biosensor for the Detection Of Acetylthiocholine and Pesticide via Acetylcholinesterase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 68(6). doi: 10.1002/bab.2030
- Akgül, B. (2021) Asetilkolinesterazın İletken Tiyo-En'e Kurlenebilen Filmlerüzerine İmmobilizasyonu Ve AChE Biyosensörünün Geliştirilmesi. Yüksek lisans tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.
- Akhond, M., Pashangeh, Kh., Karbalaie-Heidari, H. R. ve Absalan, G. (2016) Efficient Immobilization of Porcine Pancreatic α -Amylase on Amino-Functionalized Magnetite Nanoparticles: Characterization and Stability Evaluation of the Immobilized Enzyme. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180(5), 954-968. doi: 10.1007/s12010-016-2145-1
- Akreml, A., Beji, M. ve Baklouti, A. (2015) Synthesis of Bis{(S-methyl) Azoles Poly(ethylene oxide)} from 3,6-dioxa-1,8-octanedithiol. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 52(2), 586-591. doi: 10.1002/jhet.2135
- Aksoy, S., Tümtürk, H. ve Hasirci, N. (1998) Stability of A-Amylase Immobilized on Poly(Methyl Methacrylate-Acrylic Acid) Microspheres. *Journal of Biotechnology*, 60(1-2), 37-46. doi: 10.1016/S0168-1656(97)00179-X
- Amine, A., Arduini, F., Moscone, D. ve Palleschi, G. (2016) Recent Advances In Biosensors Based on Enzyme Inhibition. *Biosensors and Bioelectronics*, 76, 180-194. doi: 10.1016/j.bios.2015.07.010

- Amine, A., Mohammadi, H., Bourais, I. ve Palleschi, G. (2006). Enzyme Inhibition-Based Biosensors for Food Safety and Environmental Monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(8), 1405-1423. doi:10.1016/j.bios.2005.07.012
- Andreescu, S., Bucur, B. ve Marty, J.-L. (2006) Affinity Immobilization of Tagged Enzymes, 97-106. doi:10.1007/978-1-59745-053-9_9
- Andrzejewska, E. (2001). Photopolymerization Kinetics of Multifunctional Monomers. *Progress in Polymer Science*, 26(4), 605-665. doi:10.1016/S0079-6700(01)00004-1
- Ashly, P. C., Joseph, M. J. ve Mohanan, P. V. (2011) Activity of Diastase A-Amylase Immobilized on Polyanilines (PANIs). *Food Chemistry*, 127(4), 1808-1813. doi:10.1016/j.foodchem.2011.02.068
- Bachan Upadhyay, L. S. ve Verma, N. (2013) Enzyme Inhibition Based Biosensors: A Review. *Analytical Letters*, 46(2), 225-241. doi:10.1080/00032719.2012.713069
- Bayramoğlu, G., Yilmaz, M. ve Arica, M. Y. (2004) Immobilization of a Thermostable A-Amylase Onto Reactive Membranes: Kinetics Characterization and Application to Continuous Starch Hydrolysis. *Food Chemistry*, 84(4), 591-599. doi:10.1016/S0308-8146(03)00283-8
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. ve Stryer, L. (2002) *Biochemistry* (5th bs.). Freeman, W.H.
- Bisswanger, H. (2014) Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1(1-6), 41-55. doi:10.1016/j.pisc.2014.02.005
- Boy, E. (2011) Recombinant *Pyrococcus Furiosus* Extracellular Alpha-Amylase Expression in *Pichia Pastoris*. Middle East Technical University, The Graduate School Of Natural and Applied Sciences, Ankara, Türkiye, 24.
- Brena, B., González-Pombo, P. ve Batista-Viera, F. (2013). Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. *Methods in Molecular Biology* (C. 1051, 15-31). doi:10.1007/978-1-62703-550-7_2

- Broderick, J. B. (2001) Coenzymes and Cofactors. Encyclopedia of Life Sciences, 1-11. doi:10.1038/npg.els.0000631
- Can, E. (2023) Ksantin Tayini İçin Karbon Nanomateryal ve Medyator Temelli Amperometrik Biyosensör Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 6.
- Cao, L. (2005) Immobilised Enzymes: Science or Art?. Current Opinion in Chemical Biology, 9(2), 217-226. doi:10.1016/j.cbpa.2005.02.014
- Cederfur, J. ve Kempe, M. (2001) Development of Wide-Pore CLEAR Supports for Applications Involving Biological Macromolecules. Polymer Bulletin, 46(5), 381-387. doi:10.1007/s002890170046
- Chi, Z., Chi, Z., Liu, G., Wang, F., Ju, L. ve Zhang, T. (2009) Saccharomycopsis Fibuligera and its Applications in Biotechnology. Biotechnology Advances, 27(4), 423-431. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.03.003
- Chiulan, I., Heggset, E. B., Voicu, Ş. I. ve Chinga-Carrasco, G. (2021) Photopolymerization of Bio-Based Polymers in a Biomedical Engineering Perspective. Biomacromolecules, 22(5), 1795-1814. doi:10.1021/acs.biomac.0c01745
- Crivello, J. V. ve Reichmanis, E. (2014) Photopolymer Materials and Processes for Advanced Technologies. Chemistry of Materials, 26(1), 533-548. doi:10.1021/cm402262g
- Çakmakçı, E., Çiğil, A. B., Danış, Ö., Demir, S. ve Kahraman, M. V. (2014) Immobilization of Alpha-Amylase on Aminated Polyimide Membrane: Preparation, Characterization, And Properties. Starch/Stärke, 66(3-4), 274-280. doi:10.1002/star.201300160
- Dalby, P. A. (2003) Optimising Enzyme Function by Directed Evolution. Current Opinion in Structural Biology, 13(4), 500-505. doi:10.1016/S0959-440X(03)00101-5
- D'Amico, S., Gerday, C. ve Feller, G. (2000) Structural Similarities and Evolutionary Relationships in Chloride-Dependent A-Amylases. Gene, 253(1), 95-105. doi:10.1016/S0378-1119(00)00229-8

- Darnis, S., Juge, N., Guo, X.-J., Marchis-Mouren, G., Puigserver, A. ve Chaix, J.-C. (1999) Molecular Cloning and Primary Structure Analysis of Porcine Pancreatic A-Amylase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1430(2), 281-289. doi:10.1016/S0167-4838(99)00011-4
- Desseaux, V., Seigner, C., Pierron, Y., Grisoni, M.-L. ve Marchis-Mouren, G. (1988) Porcine Pancreatic A-Amylase: A Model for Structure—Function Studies of Homodepolymerases. *Biochimie*, 70(9), 1163-1170. doi:10.1016/0300-9084(88)90181-2
- Dey, G., Bhupinder, S. ve Banerjee, R. (2003) Immobilization of Alpha-Amylase Produced by *Bacillus circulans* GRS 313. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46(2), 167-176. doi:10.1590/S1516-89132003000200005
- Edwards, J. V., Caston-Pierre, S., Bopp, A. F. ve Goynes, W. (2005) Detection of Human Neutrophil Elastase With Peptide-Bound Cross-Linked Ethoxylate Acrylate Resin Analogs. *The Journal of Peptide Research*, 66(4), 160-168. doi:10.1111/j.1399-3011.2005.00284.x
- El-Banna, T. E., Abd-Aziz, A. A., Abou-Dobara, M. I. ve Ibrahim, R. I. (2008). Optimization and Immobilization of A-Amylase from *Bacillus Licheniformis*. *Catrina: The International Journal of Environmental Sciences*, 3(1), 45-53.
- Elmarzughi, N. A., Enshasy, H. A. El, Abdulhamid, M., Hasham, R., Aziz, A., Elsayed, E. A., ... Salama, M. (2014) A Amylase Economic and Application Value. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 3(3), 4890-4906.
- El-Shishtawy, R. M., Aldhahri, M. ve Almulaiky, Y. Q. (2020) Dual Immobilization of A-Amylase and Horseradish Peroxidase via Electrospinning: A Proof of Concept Study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 1353-1360. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.278
- Ertan, F., Yagar, H. ve Balkan, B. (2007) Optimization of α -Amylase Immobilization in Calcium Alginate Beads. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 37(3), 195-204. doi:10.1080/10826060701386679

- Eryiğit, M. (2017). Poli(3,4-Etilendioksitiyofen)/Elektrokimyasal İndirgenmiş Grafen Oksit (PEDOT/ERGO), Prussian Blue/Elektrokimyasal İndirgenmiş Grafen Oksit (Pb/ERGO) ve PEDOT/Pb/ERGO Elektrotların Elektrokimyasal Sentezi ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 48-49.
- Farooq, M. A., Ali, S., Hassan, A., Tahir, H. M., Mumtaz, S. ve Mumtaz, S. (2021) Biosynthesis and Industrial Applications of A-Amylase: A Review. Archives of Microbiology, 203(4), 1281-1292. doi:10.1007/s00203-020-02128-y
- Frankenberger, W. T. ve Johanson, J. B. (1982) Effect of pH on Enzyme Stability in Soils. Soil Biology and Biochemistry, 14(5), 433-437. doi:10.1016/0038-0717(82)90101-8
- Freudenberg, J., Jansch, D., Hinkel, F. ve Bunz, U. H. F. (2018) Immobilization Strategies for Organic Semiconducting Conjugated Polymers. Chemical Reviews, 118(11), 5598-5689. doi:10.1021/acs.chemrev.8b00063
- Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, Á., Fernandez-Lafuente, R. ve Rodrigues, R. C. (2011) Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. Advanced Synthesis & Catalysis, 353(16), 2885-2904. doi:10.1002/adsc.201100534
- Gleeson, M. R., Liu, S., O'Duill, S. ve Sheridan, J. T. (2008) Examination of the Photoinitiation Processes in Photopolymer Materials. Journal of Applied Physics, 104(6). doi:10.1063/1.2985905
- Guo, H., Tang, Y., Yu, Y., Xue, L. ve Qian, J. (2016) Covalent Immobilization of A-Amylase on Magnetic Particles as Catalyst for Hydrolysis of High-Amylose Starch. International Journal of Biological Macromolecules, 87, 537-544. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.02.080
- Güngör, M. A. (2020). Elektrokimyasal Hazırlanan Platin Nanoparçacık Modifiye Metal Oksit Elektrotların Hazırlanması ve Karakterizasyonu: Oksijen Ve Formaldehitin Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa, Türkiye, 21-22.

- Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F. ve Stevanato, R. (2013) Enzyme Immobilization: An Update. *Journal of Chemical Biology*, 6(4), 185-205. doi:10.1007/s12154-013-0102-9
- Hu, Y., Dai, L., Liu, D., Du, W. ve Wang, Y. (2018) Progress & Prospect of Metal-Organic Frameworks (MOFs) for Enzyme Immobilization (Enzyme/MOFs). *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, 793-801. doi:10.1016/j.rser.2018.04.103
- Hussein, M. A. H. (2022) The Effects Investigation Of Metal Complexes Of Schiff Bases Of Some Sulfa Drugs On Alpha-Amylases Activity. Çankırı Karatekin University, The Graduate School Of Natural And Applied Sciences, Çankırı, Türkiye, 4-16.
- Ishikawa, K., Matsui, I., Honda, K. ve Nakatani, H. (1990) Substrate-Dependent Shift of Optimum pH in Porcine Pancreatic Alpha-Amylase-Catalyzed Reactions. *Biochemistry*, 29(30), 7119-7123. doi:10.1021/bi00482a025
- Jesionowski, T., Zdarta, J. ve Krajewska, B. (2014) Enzyme Immobilization by Adsorption: A Review. *Adsorption*, 20(5-6), 801-821. doi:10.1007/s10450-014-9623-y
- John, J. (2017) Amylases-Bioprocess and Potential Applications: A Review. *International Journal of Bioinformatics and Biological Science*, 5(2), 41. doi:10.5958/2321-7111.2017.00006.3
- Jujjavarapu, S. E. ve Dhagat, S. (2019) Evolutionary Trends in Industrial Production of α -amylase. *Recent Patents on Biotechnology*, 13(1), 4-18. doi:10.2174/2211550107666180816093436
- Kahraman, M., Bayramoglu, G., Kayahan-Apohan, N. ve Gungor, A. (2007) A-Amylase Immobilization on Functionalized Glass Beads by Covalent Attachment. *Food Chemistry*, 104(4), 1385-1392. doi:10.1016/j.foodchem.2007.01.054
- Kara, H. (2013) Bir Grup Ftalosiyanın Bileşiminin Redoks Davranışlarının Elektrokimyasal ve Spektroelektrokimyasal Yöntemlerle İncelenmesi. Yüksek

- Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 16-17.
- Kaur, M. ve Srivastava, A. K. (2002) Photopolymerization: A Review. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, 42(4), 481-512. doi:10.1081/MC-120015988
- Kempe, M. ve Barany, G. (1996) CLEAR: A Novel Family of Highly Cross-Linked Polymeric Supports for Solid-Phase Peptide Synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 118(30), 7083-7093. doi:10.1021/ja954196s
- Khan, M. J., Husain, Q. ve Azam, A. (2012) Immobilization of Porcine Pancreatic A-Amylase on Magnetic Fe₂O₃ Nanoparticles: Applications to the Hydrolysis of Starch. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17(2), 377-384. doi:10.1007/s12257-011-0105-8
- Kirk, O., Borchert, T. V. ve Fuglsang, C. C. (2002) Industrial Enzyme Applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 345-351. doi:10.1016/S0958-1669(02)00328-2
- Koçer, M. B. (2017) Pestisit Tayini İçin Aptamer Temelli Elektrokimyasal Biyosensörlerin Hazırlanması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 7.
- Korma, S. A. (2016) Chemically Modified Starch and Utilization in Food Stuffs. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 5(4), 264. doi: 10.11648/j.ijnfs.20160504.15
- Koukiekolo, R., Desseaux, V., Moreau, Y., Marchis-Mouren, G. ve Santimone, M. (2001) Mechanism of Porcine Pancreatic A-Amylase. *European Journal of Biochemistry*, 268(3), 841-848. doi:10.1046/j.1432-1327.2001.01950.x
- Koukiekolo, R. ve Moreau, Y. (2002) Mechanism Of Porcine Pancreatic Alpha-Amylase: İnhibition Of Amylose And Maltopentaose Hydrolysis By Various İnhibitors. *Biologia-Bratislava*-, 57(SUP/2), 163-170.
- Lai, H., Peng, X., Li, L., Zhu, D. ve Xiao, P. (2022) Novel Monomers for Photopolymer Networks. *Progress in Polymer Science*, 128, 101529. doi:10.1016/j.progpolymsci.2022.101529

- Larson, S. B., Day, J. S. ve McPherson, A. (2010) X-ray Crystallographic Analyses of Pig Pancreatic α -Amylase with Limit Dextrin, Oligosaccharide, and α -Cyclodextrin. *Biochemistry*, 49(14), 3101-3115. doi:10.1021/bi902183w
- Liang, S., Wu, X.-L., Xiong, J., Zong, M.-H. ve Lou, W.-Y. (2020) Metal-Organic Frameworks as Novel Matrices for Efficient Enzyme Immobilization: An Update Review. *Coordination Chemistry Reviews*, 406, 213149. doi:10.1016/j.ccr.2019.213149
- Lopina, O. D. (2017) Enzyme Inhibitors and Activators. *Enzyme Inhibitors and Activators*, InTech. London. doi:10.5772/67248
- Lyu, X., Gonzalez, R., Horton, A. ve Li, T. (2021) Immobilization of Enzymes by Polymeric Materials. *Catalysts*, 11(10), 1211. doi:10.3390/catal11101211
- Macherey, M., Schuhmacher-Wolz, U., Belz, H., Delbanco, E. H., Mohr, K., Gude, T. ve Kaiser, E. (2021) Curing of UV prints – Assessment of Possible Toxicological Hazard for Consumers. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 124, 104965. doi:10.1016/j.yrtph.2021.104965
- Machius, M., Wiegand, G. ve Huber, R. (1995) Crystal Structure of Calcium-Depleted *Bacillus licheniformis* α -amylase at 2.2 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, 246(4), 545-559. doi:10.1006/jmbi.1994.0106
- Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R. ve Guisan, J. M. (2000) Reversible Enzyme Immobilization Via a Very Strong and Nondistorting Ionic Adsorption on Support-Polyethylenimine Composites. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(1), 98-105. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(20000405)68:1<98::AID-BIT12>3.0.CO;2-T
- Mateo, C., Pessela, B. C. C., Fuentes, M., Torres, R., Betancor, L., Hidalgo, A., ... Guisan, J. M. (2006) Stabilization of Multimeric Enzymes Via Immobilization and Further Cross-Linking With Aldehyde-Dextran, 129-141. doi:10.1007/978-1-59745-053-9_12
- Mattiasson, B. (1988) Affinity Immobilization. *Techniques and Aspects of Enzymes and Cells*, 647-656. doi:10.1016/0076-6879(88)37062-X

- McDonald, A. G. ve Tipton, K. F. (2014) Fifty-Five Years of Enzyme Classification: Advances and Difficulties. The FEBS Journal, 281(2), 583-592. doi:10.1111/febs.12530
- Mehta, J., Bhardwaj, N., Bhardwaj, S. K., Kim, K.-H. ve Deep, A. (2016) Recent Advances in Enzyme Immobilization Techniques: Metal-Organic Frameworks as Novel Substrates. Coordination Chemistry Reviews, 322, 30-40. doi:10.1016/j.ccr.2016.05.007
- Mezeal, I. A., Mezil, S. A. ve Shnewer, G. J. (2019) Presentation Uses of Amylase in Manufacturing (review). International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance, 10(03), 85-89. doi:10.25258/ijpqa.10.3.28
- Moilanen, L. H., Dahms, J. K. ve Hoberman, A. M. (2013) Reproductive Toxicity Evaluation of The Dental Resin Monomer Bisphenol A Glycidyl Methacrylate (CAS 1565-94-2) in Mice. International Journal of Toxicology, 32(6), 415-425. doi:10.1177/1091581813511995
- Mortazavi, S. ve Aghaei, H. (2020). Make Proper Surfaces for Immobilization of Enzymes: Immobilization of Lipase and A-Amylase on Modified Na-Sepiolite. International Journal of Biological Macromolecules, 164, 1-12. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.103
- Muti İstek, M. ve Bulca, S. (2021). Gıda Kontaminantlarının Analizine Yönelik Elektrokimyasal Biyosensör Uygulamaları. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(Ek (Suppl.) 1), 532-544. doi:10.29048/makufebed.984543
- Nazarova, E. A., Yushkova, E. D., Ivanets, A. I., Prozorovich, V. G., Krivoshapkin, P. V. ve Krivoshapkina, E. F. (2022) α -Amylase Immobilization on Ceramic Membranes for Starch Hydrolysis. Starch/Stärke, 74(1-2). doi:10.1002/star.202100017
- Nguyen, H. H. ve Kim, M. (2017) An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. Applied Science and Convergence Technology, 26(6), 157-163. doi:10.5757/ASCT.2017.26.6.157

- Nielsen, J. E. ve Borchert, T. V. (2000) Protein Engineering of Bacterial α -Amylases. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(2), 253-274. doi:10.1016/S0167-4838(00)00240-5
- Ochs, R. S. (2000) Understanding Enzyme Inhibition. *Journal of Chemical Education*, 77(11), 1453. doi:10.1021/ed077p1453
- Özen, Ü. E. (2018). Metallifitalosiyanin Temelli İletken Redoks Aktif Polimerlerin Geliştirilmesi ve Elektrokimyasal Pestisit Sensörü Olarak Kullanımları. Yüksek Lisans Tezi. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 33-34.
- Özkan, E. (2022). Somatostatin ve Bazı Analoglarının Miktar Tayini İçin Elektroanalitik Yöntemler Geliştirilmesi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 36.
- Pandya, P. H., Jasra, R. V., Newalkar, B. L. ve Bhatt, P. N. (2005) Studies On The Activity And Stability of Immobilized α -Amylase in Ordered Mesoporous Silicas. *Microporous and Mesoporous Materials*, 77(1), 67-77. doi:10.1016/j.micromeso.2004.08.018
- Paul, J. S., Gupta, N., Beliya, E., Tiwari, S. ve Jadhav, S. K. (2021) Aspects and Recent Trends in Microbial α -Amylase: a Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(8), 2649-2698. doi:10.1007/s12010-021-03546-4
- Pérez-Fernández, B. ve de la Escosura-Muñiz, A. (2022) Electrochemical Biosensors Based on Nanomaterials for Aflatoxins Detection: A Review (2015–2021). *Analytica Chimica Acta*, 339658. doi:10.1016/j.aca.2022.339658
- Qian, M., Haser, R. ve Payan, F. (1993) Structure and Molecular Model Refinement of Pig Pancreatic α -Amylase at 2.1 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, 231(3), 785-799. doi:10.1006/jmbi.1993.1326
- Rana, N., Walia, A. ve Gaur, A. (2013) α -Amylases from Microbial Sources and Its Potential Applications in Various Industries. *National Academy Science Letters*, 36(1), 9-17. doi:10.1007/s40009-012-0104-0

- Rane, A. S., Joshi, R. S. ve Giri, A. P. (2020) Molecular Determinant For Specificity: Differential Interaction of A-Amylases with Their Proteinaceous Inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1864(12), 129703. doi:10.1016/j.bbagen.2020.129703
- Ronkainen, N. J., Halsall, H. B. ve Heineman, W. R. (2010) Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 39(5), 1747. doi:10.1039/b714449k
- Saboury, A. A. (2009) Enzyme Inhibition and Activation: A General Theory. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 6(2), 219-229. doi:10.1007/BF03245829
- Saboury, A. A. ve Karbassi, F. (2000) Thermodynamic Studies on The Interaction of Calcium Ions With Alpha-Amylase. *Thermochimica Acta*, 362(1-2), 121-129. doi:10.1016/S0040-6031(00)00579-7
- Saini, R., Singh Saini, H., Dahiya, A. ve Harnek Singh Saini, C. (2017) Amylases: Characteristics and Industrial Applications. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(4), 1865-1871.
- Saleemuddin, M. (1999) Bioaffinity Based Immobilization of Enzymes, 203-226. doi:10.1007/3-540-49811-7_6
- Santamaría, R. I., Del Río, G., Saab, G., Rodríguez, M. E., Soberón, X. ve López-Munguía, A. (1999) Alcoholysis Reactions From Starch With A-Amylases. *FEBS Letters*, 452(3), 346-350. doi:10.1016/S0014-5793(99)00667-5
- Sarıboğa, B. (2008). Fenilketonüri (PKU) Teşhisinde Potansiyometrik Biyosensörler Geliştirilmesi. Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, Türkiye, 58.
- Sheldon, R. A. (2007) Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349(8-9), 1289-1307. doi:10.1002/adsc.200700082
- Sousa, S. F., Ramos, M. J., Lim, C. ve Fernandes, P. A. (2015) Relationship Between Enzyme/Substrate Properties and Enzyme Efficiency in Hydrolases. *ACS Catalysis*, 5(10), 5877-5887. doi:10.1021/acscatal.5b00923

- Souza, P. M. de ve Magalhães, P. de O. e. (2010) Application Of Microbial A-Amylase In Industry - A Review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 850-861. doi:10.1590/S1517-83822010000400004
- Soy, E. (2011) Immobilization Of Proteins On Zeolite And Zeo-Type Materials For Biosensor Applications Based On Conductometric Biosensors And Ion Sensitive Field Effect Transistors. Yüksek Lisans Tezi. Middle East Technical University, Ankara, Türkiye, 38-39.
- Spencer, V. A. ve Davie, J. R. (2003) Isolation of Proteins Cross-linked to DNA by Cisplatin. *Protein Protocols Handbook*, 747-752. New Jersey: Humana Press. doi:10.1385/1-59259-169-8:747
- Srivastava, S. (2009) Co-polymerization of Acrylates. *Designed Monomers and Polymers*, 12(1), 1-18. doi:10.1163/156855508X391103
- Suriya, J., Bharathiraja, S., Krishnan, M., Manivasagan, P. ve Kim, S.-K. (2016) Marine Microbial Amylases. *Advances in Food and Nutrition Research*, C. 79, 161-177. Academic Press Inc. doi:10.1016/bs.afnr.2016.07.001
- Şener, A. (2019) Enzimler. A. Yarat, T. Tunalı Akbay ve E. I. Alturfan (Ed.), *Biyokimya Temel ve Özel Konular içinde* (1. bs., C. 1, 285-316). Akademisyen Kitabevi A.Ş., Ankara, Türkiye.
- Tao, Z., Dong, B., Teng, Z. ve Zhao, Y. (2020) The Classification of Enzymes by Deep Learning. *IEEE Access*, 8, 89802-89811. doi:10.1109/ACCESS.2020.2992468
- Tee, B. L. ve Kaletunç, G. (2009) Immobilization of a Thermostable A-Amylase by Covalent Binding to an Alginate Matrix Increases High Temperature Usability. *Biotechnology Progress*, 25(2), 436-445. doi:10.1002/btpr.117
- Teles, F. R. R. ve Fonseca, L. P. (2008). Applications of Polymers for Biomolecule Immobilization in Electrochemical Biosensors. *Materials Science and Engineering: C*, 28(8), 1530-1543. doi:10.1016/j.msec.2008.04.010
- Tepeli, Y. (2015) Kanser Hücresi Belirlenmesine Yönelik Elektrokimyasal Yöntemlerin ve Elektrokimyasal Platformların Geliştirilmesi. Yüksek Lisans

- Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla, Türkiye, 19.
- Thangaraj, B. ve Solomon, P. R. (2019) Immobilization of Lipases – A Review. Part I: Enzyme Immobilization. *ChemBioEng Reviews*, 6(5), 157-166. doi:10.1002/cben.201900016
- Tincu (Iurciuc), C. E., Bouhadiba, B., Atanase, L. I., Stan, C. S., Popa, M. ve Ochiuz, L. (2023) An Accessible Method to Improve the Stability and Reusability of Porcine Pancreatic α -Amylase via Immobilization in Gellan-Based Hydrogel Particles Obtained by Ionic Cross-Linking with Mg^{2+} Ions. *Molecules*, 28(12), 4695. doi:10.3390/molecules28124695
- Tingaz, B. N. (2023, Ağustos). Bor Katkılı Elmas Elektrot İle Vindesin'in Elektroanalitik Özelliklerinin İncelenmesi Ve Miktar Tayini. Yüksek Lisans Tezi, Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Batman, Türkiye, 20-21.
- Türünç, O., Kahraman, M. V., Akdemir, Z. S., Kayaman-Apohan, N. ve Güngör, A. (2009) Immobilization Of α -Amylase Onto Cyclic Carbonate Bearing Hybrid Material. *Food Chemistry*, 112(4), 992-997. doi:10.1016/j.foodchem.2008.07.024
- Varavinit, S., Chaokasem, N. ve Shobsngob, S. (2002) Immobilization Of A Thermostable α -Amylase. *ScienceAsia*, 28(3), 247. doi:10.2306/scienceasia1513-1874.2002.28.247
- Virgen-Ortíz, J. J., dos Santos, J. C. S., Berenguer-Murcia, Á., Barbosa, O., Rodrigues, R. C. ve Fernandez-Lafuente, R. (2017) Polyethylenimine: A Very Useful Ionic Polymer in The Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(36), 7461-7490. doi:10.1039/C7TB01639E
- Visvanathan, R., Qader, M., Jayathilake, C., Jayawardana, B. C., Liyanage, R. ve Sivakanesan, R. (2020) Critical Review on Conventional Spectroscopic α -Amylase Activity Detection Methods: Merits, Demerits, And Future Prospects.

Journal of the Science of Food and Agriculture, 100(7), 2836-2847.
doi:10.1002/jsfa.10315

Wang, X., Lan, P. C. ve Ma, S. (2020) Metal–Organic Frameworks for Enzyme Immobilization: Beyond Host Matrix Materials. ACS Central Science, 6(9), 1497-1506. doi:10.1021/acscentsci.0c00687

Wiegand, G., Epp, O. ve Huber, R. (1995) The Crystal Structure of Porcine Pancreatic α -Amylase in Complex with the Microbial Inhibitor Tendamistat. J. Mol. Biol (C. 247).



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Garen Karaburun

Yabancı Dili: İngilizce, Ermenice

Öğrenim Durumu

Derece	Bölüm/Program	Üniversite/Lise	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Biyokimya	Marmara Üniversitesi	Devam Ediyor
Lisans	Kimya Öğretmenliği	Marmara Üniversitesi	2020
Lisans	Biyoloji Öğretmenliği	Marmara Üniversitesi	2018
Lise	Fen-Matematik	Özel Getronagan Ermeni Anadolu Lisesi	2014

Sunum

Poster Sunumu; Karaburun, G, Orman, E.B., Çakmakçı, E., Ogan, A. “Immobilization of α -Amylase on CLEAR-Epoxy-Based Photocurable Polymer for Industrial Use” 6. Uluslararası Avrasya Biyolojik ve Kimyasal Bilimler Konferansı, Ankara, Türkiye, Ekim 11-13, 2023.