

**Biyosensörlere Farklı Bir Bakış
Açısı : Enzim Aktivitesi
Tayinlerine Yönelik Sistemler**

Belfin IŞIK

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Mustafa
Kemal SEZGİNTÜRK
2014**

T.C.

NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BİYOSENSÖRLERE FARKLI BİR BAKIŞ AÇISI ENZİM AKTİVİTESİ
TAYİNLERİNE YÖNELİK SİSTEMLER**

Belfin IŞIK

KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

TEKİRDAĞ-2014

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK danışmanlığında, Belfin IŞIK tarafından hazırlanan”
Biyosensörlere Farklı Bir Bakış Açısı Enzim Aktivitesi Tayinlerine Yönelik Sistemler” isimli
bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy
birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK *İmza :*

Üye : Yrd. Doç. Dr. Funda ÖZTÜRK *İmza :*

Üye : Doç. Dr. Cenk ARAL *İmza :*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİYOSENSÖRLERE FARKLI BİR BAKIŞ AÇISI : ENZİM AKTİVİTESİ TAYİNLERİNE YÖNELİK SİSTEMLER

Belfin IŞIK

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

Tripsin çoğu omurgalının sindirim sisteminde bulunan proteinleri parçalayıcı özelliğe sahip bir sindirim enzimidir. Pankreastan in aktif bir proenzim olan tripsinojen şeklinde üretilir ve ince bağırsağa ulaştığında enteropeptidaz tarafından aktif hale getirilir. Bu yüksek lisans çalışmasında tripsin aktivite tayini için amperometrik biyosensör geliştirildi. Geliştirilen biyosensörün çalışma prensibi, tripsinin GOD biyoaktif tabakasını hidrolizleyerek sinyal düşüşünün izlenmesine dayanmaktadır. GOD ve jelatin, camsı karbon elektrot yüzeyine tutturularak ve glutaraldehit ile çapraz bağlama yapılarak immobilize edildi. Oluşturulan biyosensörün optimizasyonu amacıyla jelatin miktarı, enzim inkübasyon süresi, optimum sıcaklık, GOD derişimi, çalışma potansiyeli ve NaHCO₃ tamponu pH '1 gibi parametreler için deneysel çalışmalar yapıldı. Biyosensörün karakterizasyon çalışmalarında ise tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, kalibrasyon grafikleri, amperometrik ve EIS yöntemleri kullanılarak gerçek örnek ile de çalışıldı.

Anahtar kelimeler: Enzim aktivitesi, tripsin, GCE, biyosensör

2014, 59sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

A DIFFERENT PERSPECTIVE OF BIOSENSORS: SYSTEMS FOR DETERMINATION OF ENZYME ACTIVITY

Belfin IŞIK

Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

Trypsin is a digestive enzyme most of found in digestive system of vertebrates. Pancreatic trypsinogen, which is produced as an inactive proenzyme and reaches the small intestine can be activated by enteropeptidase. In this thesis an amperometric biosensor was developed for the determination of tyripsin activity. Principle of this new biosensor system is based on the hydrolysis of GOD's bioactive layer by trypsin and consequently decrease in the amperometric signal. Glucose oxidase and gelatin mixture was layered onto the surface of the glassy carbon electrodes. Glucose oxidase was crosslinked by glutaraldehyde that was used as a crosslinking agent. On the purpose of optimize biosensor, some parameters such as optimum temperature, concentration of gelatin, incubation time of elastase, concentration of glucose oxidase, optimum working potential, and pH for NaHCO₃ buffer have been studied. Immobilization steps were monitored by EIS and chronoamperometry. Repeatability, reproducibility and related statistical parameters were also investigated. Finally the biosensor presented in this thesis was applied to the real serum samples.

Keywords: Enzyme activity, trypsin, GCE, biosensor

2014, 59Pages

İÇİNDEKİLER

| | <u>sayfa</u> |
|---|--------------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | ii |
| İÇİNDEKİLER | ii |
| KISALTMALAR DİZİNİ | viii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2.KURAMSAL TEMELLER | 2 |
| 2.1.Biyosensör | 2 |
| 2.1.1. Biyosensör Türleri..... | 3 |
| 2.1.2 Enzim İmmobilizasyonu | 4 |
| 2.2 Enzimler | 9 |
| 2.2.1 Glukoz Oksidaz Etki Mekanizması..... | 10 |
| 2.2.2 Proteazlar, fizyolojik özellikleri ve sınıflandırılmaları | 12 |
| 3.MATERYAL ve METOD | 20 |
| 3.1.Materyal..... | 20 |
| 3.2 Elektrokimyasal Ölçümler | 20 |
| 3.3 Ölçüm Prosedürleri | 20 |
| 3.4. Glukoz oksidaz biyosensörünün hazırlanması ve ölçüm aşamaları..... | 22 |
| 3.5. Glikoz oksidaz biyosensörünün optimizasyon çalışmaları..... | 23 |
| 3.5.1. Jelatin miktarının belirlenmesi..... | 24 |
| 3.5.2. Tripsin enziminin inkübasyon süresinin belirlenmesi..... | 24 |
| 3.5.3. Glukoz oksidaz aktivitesinin belirlenmesi..... | 25 |
| 3.5.4. En uygun çalışma potansiyelin belirlenmesi | 25 |
| 3.5.5. Tripsin enziminin aktivitesine yönelik uygun tampon pH'sının belirlenmesi..... | 26 |
| 3.5.6. Tripsin enziminin aktivitesine yönelik uygun sıcaklığın belirlenmesi..... | 26 |
| 3.6. Glukoz oksidaz biyosensörünün karakterizasyon çalışmaları | 27 |
| 3.6.1 Biyosensörün lineer ölçüm aralıkları | 27 |
| 3.6.2. Tekrarlanabilirlik..... | 27 |
| 3.6.3. Tekrar üretilebilirlik | 27 |
| 3.6.4. Elektrokimyasal impedans karakterizasyonu..... | 27 |
| 3.6.5. Gerçek örnek denemesi | 27 |
| 4.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA | 28 |

| | |
|--|-----------|
| 4.1. Glukoz oksidaz biyosensörünün optimizasyon çalışmalarına ilişkin bulgular | 28 |
| 4.1.1 Jelatin miktarının belirlenmesi..... | 28 |
| 4.1.2 Tripsin enziminin inkübasyon süresinin belirlenmesi..... | 29 |
| 4.1.3 Glukoz oksidaz aktivitesinin belirlenmesi..... | 31 |
| 4.1.4 Uygun çalışma potansiyelin belirlenmesi..... | 32 |
| 4.1.5 Enzim aktivitesi için uygun tampon pH'ının belirlenmesi..... | 33 |
| 4.1.6. Enzim aktivitesi için uygun sıcaklık belirlenmesi | 34 |
| 4.2. Glukoz oksidaz biyosensörünün karakterizasyon çalışmaları | 37 |
| 4.2.1 GCE-GOD biyosensörünün lineer kalibrasyon grafiği | 37 |
| 4.2.2. GCE-GOD biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları | 37 |
| 4.2.3. GCE-GOD biyosensörünün tekrar üretilebilirliği..... | 38 |
| 4.2.4. İmpedans denemeleri..... | 39 |
| 4.2.5 Gerçek örnek..... | 40 |
| 5.SONUÇ | 42 |
| 6.KAYNAKLAR | 44 |
| ÖZGEÇMİŞ | 47 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

sayfa

| | |
|--|----|
| Şekil 2.1 : Biyosensör elemanları | 2 |
| Şekil 2.2 : Enzimlerin birbirine ve katı desteğe çapraz bağlanması | 6 |
| Şekil 2.3 : Glutaraldehit ile enzimlerin amino gruplarının çapraz bağlanması | 6 |
| Şekil 2.4 : Glutaraldehitin formülü | 7 |
| Şekil 2.5 : Jelatinin yapısı | 8 |
| Şekil 2.6 : β -D-glukozun GOD enzimiyle oksidasyonu..... | 11 |
| Şekil 2.7 : Doğal elektron alıcısı tarafından FADH ₂ oksidasyonunun mekanizması | 11 |
| Şekil 2.8 : Proteazların genel mekanizması..... | 12 |
| Şekil 2.9 : Katalizledikleri reaksiyona göre proteazların sınıflandırılması..... | 14 |
| Şekil 2.10: Dört endoproteaz türüne ait mekanizmaların genel özeti..... | 16 |
| Şekil 3.1 :Kronoamperometrik ölçüm hazırlanan tripsin çözeltisinden (a)5 μ l tripsin (b)10 μ l tripsin (c)15 μ l tripsin (d)20 μ l tripsin (e)25 μ l tripsin eklenerek alınmıştır | 14 |
| Şekil 4.1:GOD biyosensörünün jelatin miktarının optimizasyonu (GOD aktivitesi ve glutaraldehit yüzdesi sırasıyla 18U ve %1 olarak sabit tutulmuştur. Çalışma koşulları 50mM pH 5,5 sitrat tamponu T=24 °C)..... | 28 |
| Şekil 4.2 : GOD biyosensörünün tripsin enziminin inkübasyon süresinin optimizasyonu (GOD aktivitesi ve glutaraldehit yüzdesi ve jelatin miktarı sırasıyla 18U, %1 ve 7,5mg olarak sabit tutulmuştur. Çalışma koşulları 50mM pH 5,5 sitrat tamponu T=24 °C) | 30 |
| Şekil 4.3 :GOD biyosensörünün GOD konsantrasyonunun optimizasyonu (Glutaraldehit yüzdesi ve jelatin miktarı sırasıyla %1 ve 7,5mg olarak sabit tutulmuştur. Çalışma koşulları 50mM pH 5,5 sitrat tamponu T=24 °C)..... | 31 |
| Şekil 4.4 :GOD biyosensörünün enzim tamponu pH optimizasyonu (GOD aktivitesi ve glutaraldehit yüzdesi ve jelatin miktarı sırasıyla 18U, %1 ve 7,5mg olarak sabit tutulmuştur. Çalışma koşulları 50mM pH 5,5 sitrat tamponu T=24 °C)..... | 32 |
| Şekil 4.5 : GOD biyosensörünün potansiyel optimizasyonu (GOD aktivitesi ve glutaraldehit yüzdesi ve jelatin miktarı sırasıyla 18U, %1 ve 7,5mg olarak sabit tutulmuştur. Çalışma koşulları 50mM pH 5,5 sitrat tamponu T=24 °C) | 33 |
| Şekil 4.6 :GOD biyosensörünün sıcaklık optimizasyonu (GOD aktivitesi ve glutaraldehit yüzdesi ve jelatin miktarı sırasıyla 18U, %1 ve 7,5mg olarak sabit tutulmuştur. Çalışma koşulları 50mM pH 5,5 sitrat tamponu T=24 °C) | 35 |

| | |
|--|----|
| Şekil 4.7 : Biyosensörün optimum sıcaklığı..... | 36 |
| Şekil 4.8 : GOD Biyosensörünün kalibrasyon grafiği | 37 |
| Şekil 4.9 : Tekrar üretilebilirlik için hazırlanmış olan 10 biyosensörün grafiği | 38 |
| Şekil4.10 : EIS ölçümü hazırlanmış olan tripsin çözeltisinden (a)5µl tripsin (b)10µl tripsin (c)15µl tripsin (d)20 µl tripsin (e)25 µl tripsin eklenerek alınmıştır | 39 |
| Şekil 4.11 : İki aynı biyosensörde impedans denemelerinin grafiği..... | 40 |
| Şekil 4.12 : Gerçek örneklerle yapılan denemelerin grafiği..... | 41 |

TABLULAR DİZİNİ

| | <u>sayfa</u> |
|--|--------------|
| Tablo 3. 1 GOD biyosensörünün hazırlanması ve ölçüm aşamaları..... | 22 |
| Tablo 4. 1 Jelatin miktarı optimizasyonunun R^2 değerleri ve denklem sistemi..... | 29 |
| Tablo 4. 2 Tripsin inkübasyon süresinin R^2 değerleri ve denlem sistemi | 30 |
| Tablo 4. 3 GOD konsantrasyon optimizasyonunun R^2 değerleri ve denklem sistemi..... | 31 |
| Tablo 4. 4 Çalışma potansiyeli optimizasyonunun R^2 değerleri ve denklem sistemi | 33 |
| Tablo 4. 5 NaHCO_3 pH optimizasyonu R^2 değerleri ve denklem sistemi..... | 34 |
| Tablo 4. 6 Tripsin aktivitesine ortam sıcaklığının etkisi..... | 35 |
| Tablo 4. 7 Tripsinin üç farklı konsantrasyonu için hesaplanan ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayı değerleri..... | 38 |
| Tablo 4. 8 Tekrar üretilebilirlik çalışmasının R^2 değerleri ve denklem sistemi | 39 |
| Tablo 4. 9 İmpedans denemelerinin R^2 değerleri ve denklem sistemi..... | 40 |
| Tablo 4. 10 Gerçek örnek denemelerinin R^2 değerleri ve denklem sistemi..... | 41 |

KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|---------------|---|
| CV | : Döngüsel voltametri |
| EIS | : Elektrokimyasal impedans spektroskopisi |
| GA | : Glutaraldehit |
| GCE | : Camsı karbon elektrot |
| GOD | : Glukoz oksidaz |
| μM | : Mikromolar |
| M | : Molar |
| mg | : Miligram |
| mM | : Milimolar |
| mmol | : Milimol |
| mV | : Milivolt |
| Pt | : Platin |
| S | : Substrat |
| U | : Enzim ünitesi |
| V | : Volt |

TEŐEKKÜR

Yüksek lisans çalıőmalarım ve tez hazırlama sırasında bilgi ve tecrübeleriyle bana her konuda yardımcı olan danışman hocam Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK'e,

Varlıkları ile yaşama sevincim olan, maddi manevi her türlü desteği hiçbir zaman benden esirgemeyen sevgili aileme ve Ruhi Can ÖZENÇ'e

Laboratuar çalıőmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen, her türlü moral ve motivasyon sağlayan çalışma arkadaşlarım Çiğdem SAYIKLI ŐİMŐEK, Munteha Nur SONUÇ ve Őükran Gülden YEŐİLLER'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

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

Bilim ve teknolojiadaki hızlı gelişmeler biyosensör kavram ve tanımlarında da önemli genişlemelere yol açmıştır. Canlı yaşamının önemli unsurlarından olan görme, işitme, koklama, tat alma, dokunma gibi algılama mekanizmaları doğal ve en mükemmel biyosensörük sistemler olarak düşünüldükleri için biyosensör çalışmalarına güzel örnekler oluşturmaktadırlar. Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyebilen sensörler hazırlanabilirken, sisteme biyomateryalin de katılmasıyla diğer birçok maddenin tayini mümkün hale gelmiştir **(Telefoncu 1999)**.

Bundan dolayı yaşamın kendisi, birleşmiş enzimatik reaksiyonlar serisi, bazı hastalıklar ise normal metabolik modeldeki düzenin bozulması olarak ele alınmaktadır **(Burtis ve Ashwood 2007)**.

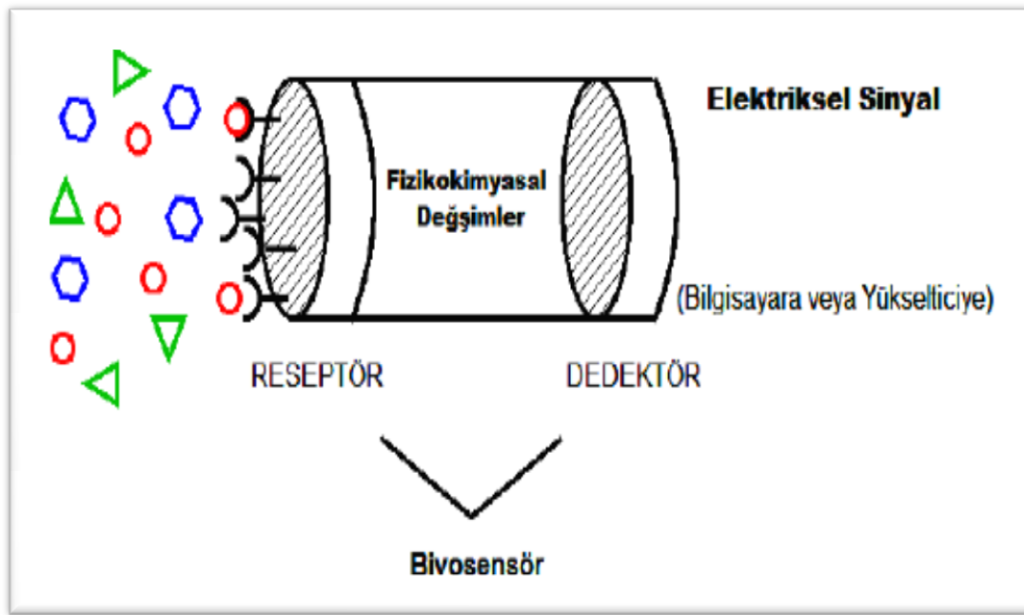
Proteazlar, (proteolitik enzimler olarak da bilinir) peptit bağlarını hidrolizleyerek proteinlerin parçalanmasını katalizleyen enzim grubudur. İnsan ve fare genomlarının bioinformatik analizleri kullanılarak en az 500-600 proteaz (genomların yaklaşık %2'si) tanımlanmıştır ve bunların çoğu ortologdur. Proteazlar, proteinleri parçalayarak hücre döngüsü, hücre çoğalması, hücre ölümü, DNA replikasyonu, doku yenilenmesi, hemostasis (koagülasyon), yara iyileşmesi ve immün yanıt gibi bir çok fizyolojik sürecin kontrolünde anahtar rol oynamaktadırlar **(Turk 2006)**.

Bu yüksek lisans çalışmasının amacı; enzim aktivite tayinine yönelik kolay, ucuz, pratik uygulamaya olanak sağlayan, güvenilir ve hassas amperometrik esaslı biyosensörlerin oluşturulması, enzim temelli biyosensörlerin karakterizasyonu, optimizasyonu ve uygulanabilirliğinin incelenmesidir.

2.KURAMSAL TEMELLER

2.1.Biyosensör

Bir biyosensörün amacı, bir veya bir grup analitin miktarı ile orantılı olarak sürekli sayısal elektrik sinyali üretmektir (Şekil 2.1).Tayin edilmek istenen analite karşı spesifik, hızlı bilgi veren, kullanımı basit olduğu için kalifiye operatör gerektirmeyen, taşınabilir, kolayca üretilen ve numunenin minimum düzeyde önişlemini gerektiren cihazlar oldukları için tanı teknolojilerinde yeni bir akımın öncüleridirler.



Şekil 2.1. Biyosensör elemanları

Biyosensör kavramı ilk olarak 1962 yılında Clark ve Lyons'un enzim içeren membranlar ile üre ve glukozun pH veya oksijen elektrotları ile algılanabilecek ürünlere dönüştürülebileceği fikrinden ortaya çıkmıştır (Cahn 1993).

Geliştirilen biyosensörler arasında vücut sıvılarında bulunan sağlık açısından takibi önemli kreatinin, glukoz, kolesterol, bilirubin, galaktoz, laktat gibi kimyasalları izlemeye yönelik olanlar olduğu gibi asetaminofen, teofilin, klorpromazin ve salisilat gibi ilaçları tespit edebilenler de vardır (Wang 1999).

İdeal bir biyosensör aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır:

1.Biyokatalizör analizin amacına yönelik olarak çok hassas ve spesifik olmalı, normal saklama koşullarında kararlı olmalı ve belirli analiz sayısı boyunca kararlılığını korumalıdır.

2.Reaksiyon karıştırma, pH ve sıcaklık gibi bazı parametrelerden bağımsız olmalıdır. Numunelerin önışlem gereksimi en az seviyede olmalıdır.

3.Biyosensör cevabı tekrarlanabilir, hatasız ve hassas olmalıdır.

4.Klinik analizlerde kullanım olasılığına karşı biyosensörün probu küçük ve biyo uyumlu olmalıdır. Ayrıca toksik ya da antijenik etki göstermemelidir. Eğer fermentörlerde kullanılacaksa steril edilebilir olmalıdır.

5.Tamamlanmış biyosensör ucuz, küçük, portatif ve yarı-nitelikli operatörler tarafından kullanılabilir olmalıdır.

2.1.1. Biyosensör Türleri

Biyolojik olarak aktif ajanda analit ile reaksiyon sonucu meydana gelen fizikokimyasal değişimlerin uygun bir çevirici (transducer) yardımıyla elektriksel sinyale çevrilmesi gereklidir. Bunun için reaksiyon entalpisi (kalorimetri), kütle değişimi (piezoelektrik kristal) veya katman kalınlığı (refraktometri) gibi spesifik olmayan genel parametreleri belirleyen çeviriciler kullanılabilir. Diğer bir yandan H^+ , OH^- , CO_2 , NH_3 ya da H_2O_2 gibi türlerin tespiti için potansiyometrik ve amperometrik elektrotlar, fotometrik ya da flüorimetrik çeviriciler ile spesifik tayin gerçekleştirilebilmektedir. Aşağıda farklı fiziksel özelliklerin tayini için geliştirilmiş çeviriciler kullanılarak tasarlanan biyosensörlerden belirtilmiştir (**Scheller ve Florian 1992**).

- I. Amperometrik Biyosensörler
- II. Potansiyometrik Biyosensörler
- III. Kondüktometrik Biyosensörler
- IV. Optoelektronik Biyosensörler
- V. Kalorimetrik Biyosensörler
- VI. Piezoelektronik Biyosensörler

Bu yüksek lisans tezi çalışmalarında amperometrik biyosensör kullanılarak araştırma yapılmıştır. Amperometrik biyosensörler, analit veya reaktantın, genellikle sabit potansiyel altında yükseltgenmesi ya da indirgenmesi sonucu oluşan akımı ölçerler. Amperometrik sensörlerin fonksiyonel bir biçimde çalışmasında en önemli faktör çoğunlukla oksidaz ya da dehidrojenaz tabanlı katalitik biyomolekül ile elektrot yüzeyi arasındaki elektron transferidir. Elektron transferinde en çok kullanılan mekanizmalar arasında medyatörlü elektron transferi vardır ve elektrot yüzey modifikasyonlarında iletken polimerler önemli rol oynamaktadır.

Elektrokimyasal yöntemlerle yüzeyde oluşturulan iletken polimer filmlerin elektron transfer mekanizması üzerindeki etkisi henüz tam olarak anlaşılamamış ve açıklanamamış olmasına rağmen enzim immobilizasyonu için kullanılan bazı iletken polimer filmler sensör cevabındaki duyarlılığı belirli türler için önemli ölçüde arttırmaktadır (**Gerard ve ark. 2002**).

2.1.2 Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler aktivasyon enerjisini düşürerek kendileri reaksiyon ürünlerine dahil olmadan biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran biyolojik olarak aktif ve oldukça spesifik katalizörlerdir. Katlanmış amino asit zincirlerin meydana getirdiği tersiyer ve kuaterner (oligomerik enzim) yapılar enzimde katalitik veya aktif bölge olarak adlandırılan reaksiyon merkezini oluştururlar. Ancak bu katlanmış yapı amino asit zincirlerini bir arada tutan kovalent bağların aksine genellikle kovalent olmayan etkileşimler ile bir arada tutulmaktadır. Bu etkileşimler iyonik köprüler, hidrojen bağları, hidrofilik ve hidrofobik etkileşimlerden oluşmaktadır.

Yüksek sıcaklık, yüksek veya düşük pH, organik solventlerin varlığı hatta uygun kataliz koşulları gibi durumlarda dahi enzimlerin katalitik aktivitesini sürdürebilmesi için gerekli olan moleküler yapının parçalanması olasıdır. Bu nedenle bunu engellemek ve biyolojik katalizörün ömrünü uzatmak amacıyla enzimin destek yüzeyler üzerine veya matriks içerisine immobilizasyonu önemli bir yöntemdir.

İşlevsel bir biyosensör tasarımında enzimin reaksiyon katmanına uygun biçimde immobilizasyonu çok önemlidir. Enzim katmanının analitik performansı immobilize enzimin işlevselliğini devam ettirmek ve analit moleküllere erişilebilirliği sağlamak üzere enzimi matriks içinde alıkoymak için seçilen immobilizasyon yöntemine bağlıdır.

Enzimin hareket kabiliyeti (mobility) kimyasal veya fiziksel araçlarla kısıtlandığı zaman enzim “immobilize” olarak adlandırılır. İmmobilize enzimin özellikleri destek materyalin aşağıda belirtilen özelliklerinden etkilenebilir (**Norouzian 2003**).

- geniş yüzey alanı
- parçacık büyüklüğü
- geçirgenlik
- hidrofiliklik/hidrofobiklik
- çözünmezlik
- kimyasal/mekanik kararlılık

yüksek bükülmezlik

rejenere olabilme

Başarılı biyosensörlerin geliştirilmesinde çok çeşitli immobilizasyon yöntemleri kullanılmıştır. Bu farklı yaklaşımlar başlıca dört ana immobilizasyon tekniği altında kategorize edilebilmektedir: tutuklama, adsorpsiyon, kovalent bağlama ve çapraz bağlama. Son yıllarda basit immobilizasyon yöntemlerinde karşılaşılan problemlerin aşılmasında kombine immobilizasyon yöntemlerinin kullanılması başarı sağlamıştır.

2.1.2.1 Enzim İmmobilizasyonu Yöntemleri

Enzimlerin immobilizasyon işleminden sonra istenilen aktiviteyi ve karakteristikleri gösterebilmeleri için enzime uygun bir taşıyıcının ve immobilizasyon yönteminin seçilmesi gereklidir. Enzimlerin immobilizasyon yöntemleri aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır.

- I. Hapsetme yöntemi
- II. Adsorpsiyon
- III. Kovalent bağlama
- IV. Çapraz bağlama

Bu yüksek lisans tez çalışmasında çapraz bağlama yöntemi kullanılmıştır. Birçok durumda çapraz-bağlama prosedürü enzimin immobilizasyon matrisine tutturulmasına yardım etmede kullanılmaktadır. Bu yöntem enzimin moleküllerinin molekül içi ya da moleküller arası birbirine veya taşıyıcı matristeki fonksiyonel gruplara çapraz bağlanması ile büyük enzim molekülü matrisleri oluşması ile gerçekleştirilmektedir. Şekil 2.2’de enzimlerin çapraz bağlama ağ örgüsündeki düzenlemesi görülmektedir. Çapraz bağlama ajanlarından bazıları aşağıda verilmiştir.

Glutaraldehit

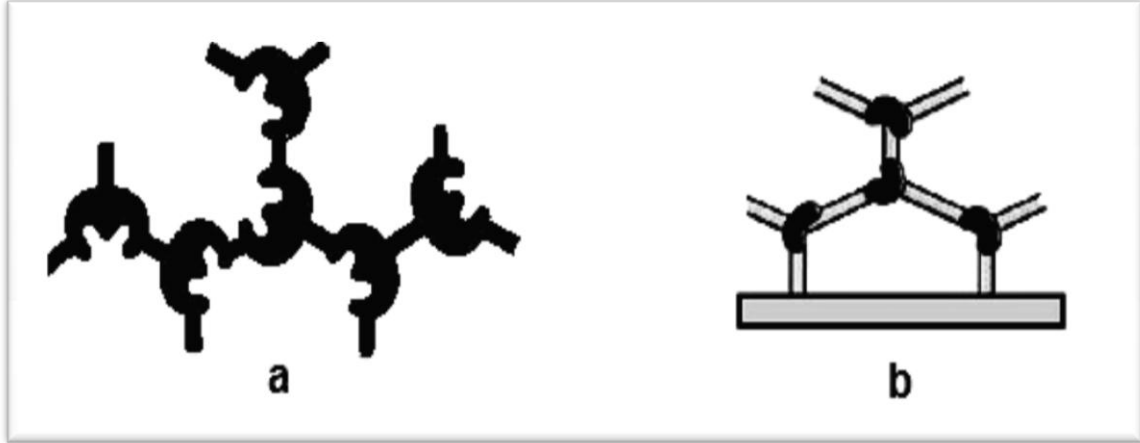
Hekzandiamin

Hekzametilen diizosiyanat

Fenol-2,4-disülfonik asit

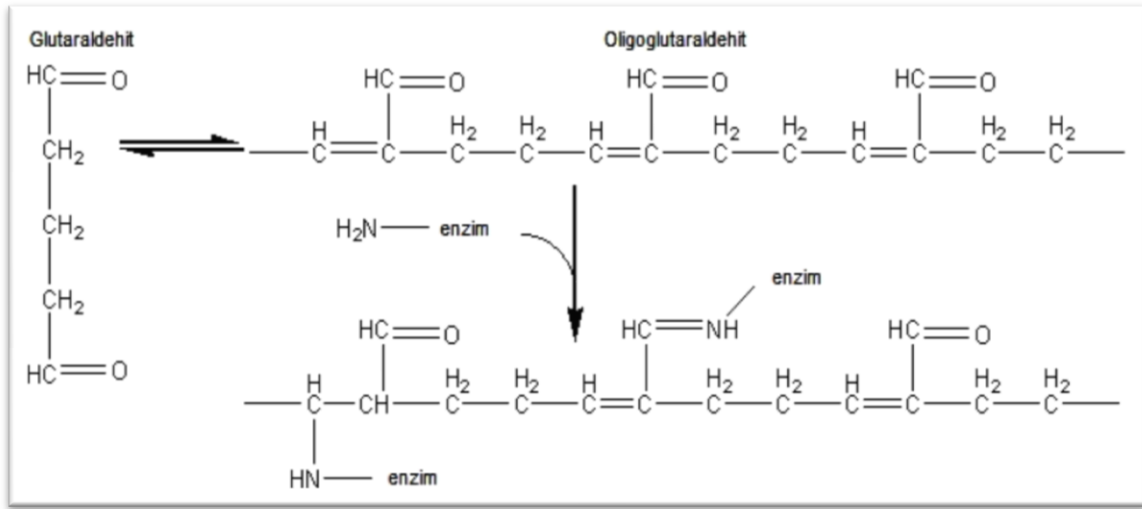
1,5-Difloro-2,4-dinitrobenzen

Bisdiazobenzidin-2,2'-disülfonik asit



Şekil 2.2. Enzimlerin birbirine ve katı desteğe çapraz bağlanması

Bu reaktiflerden glutaraldehit (GA) taşıyıcının organik hidroksil gruplarıyla ve enzimdeki lisin aminoasit molekülünün açıkta kalan fonksiyonel grubuyla reaksiyona girebilmektedir. Şekil 2.3'te glutaraldehitin vermiş olduğu reaksiyon görülmektedir.



Şekil 2.3. Glutaraldehit ile enzimlerin amino gruplarının çapraz bağlanması

Çapraz bağlayıcı fiziksel immobilizasyonla karşılaştırıldığında enzimin katı desteğe daha çok bağlanmasını sağlayan fonksiyonel gruplar arz ve böylece ihmal edilebilir enzim sızıntısına neden olmaktadır.

Bundan başka moleküller arası çapraz bağlama boyutsal olarak katlanmış protein moleküllerinin stres durumunda açılmasını önleyerek stabilize etmektedir. İlave enzim molekülleri hâlihazırda yüzeye kovalent bağlanmış enzim katmanı üzerine kümeleştirilerek

enzim yüklemesi arttırılabilmektedir. Ancak çapraz bağlama enzimin aktif merkezinde konformasyonel değişimlere yol açabildiğinden aktivite kaybına yol açabilmektedir.

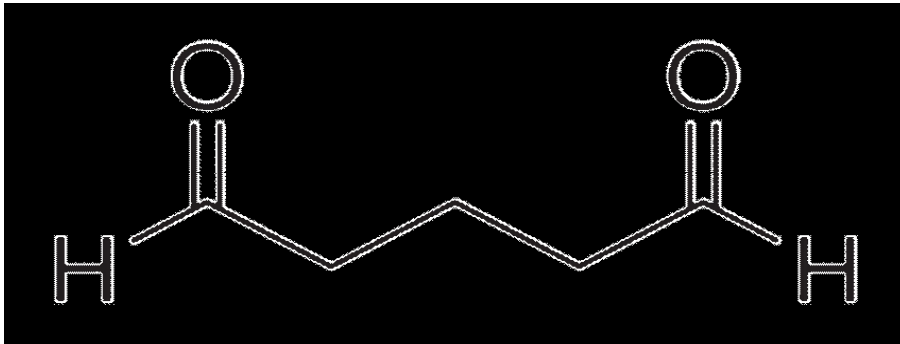
Oluşan sıkı çapraz bağlanmış ağ örgüsü ayrıca enzim kinetiklerini ve substrat difüzyonunu etkilemektedir. Matriks içerisinde reaksiyon ürünleri oluşması sonucu enzimin yerel ortamında zarar verici değişimler ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle biyomolekül immobilizasyonunda aktivite ve uygun difüzyon için optimizasyon gereklidir (**Ling 2008**).

2.1.2.2 Glutaraldehit

Virüs ve bakterilere karşı tıpta sıkça kullanılan renksiz, sıvı bir dezenfektan ve sterilizasyon kimyasalıdır. Aynı zamanda elektron mikroskoplarında doku belirleyici olarak da kullanılmaktadır (**HSDB. 1996, Thomas ve Russell 1974**). Glutaraldehit özellikle enzimlerin kovalent immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılan homo bifonksiyonel bir kimyasaldır.

Homo bifonksiyonel maddeler, proteindeki lizin kalıntısının amino grupları gibi primer aminlerle seçici olarak etkileşime girerler. Suda ve benzen, alkol gibi susuz ortamlarda kararlı ve çözünebilir olması nedeniyle kullanımları çok yaygındır (**Kapoor 1996**).

Glutaraldehit, içerdiği iki aktif aldehit grubu ile biyosensör geliştirilmesinde kullanılan enzim, mikroorganizma ve doku kesitleri gibi biyolojik bileşenlerin, kitosan, kolajen, jelatin ve karragenan gibi biyolojik matriks moleküllerinin polimerleri üzerindeki $-NH_2$ gibi gruplarla H_2O çıkararak birleşir ve iki polimer zincirini birbirine çapraz bağlar. Bu esasa dayalı immobilizasyon yöntemi oldukça sık kullanılmaktadır. Yöntem kolay uygulanabilir olup genellikle sistemin termal, işlem ve depo kararlılıklarını da arttırmaktadır. Şekil 2.4'te glutaraldehitin formülü görülmektedir.



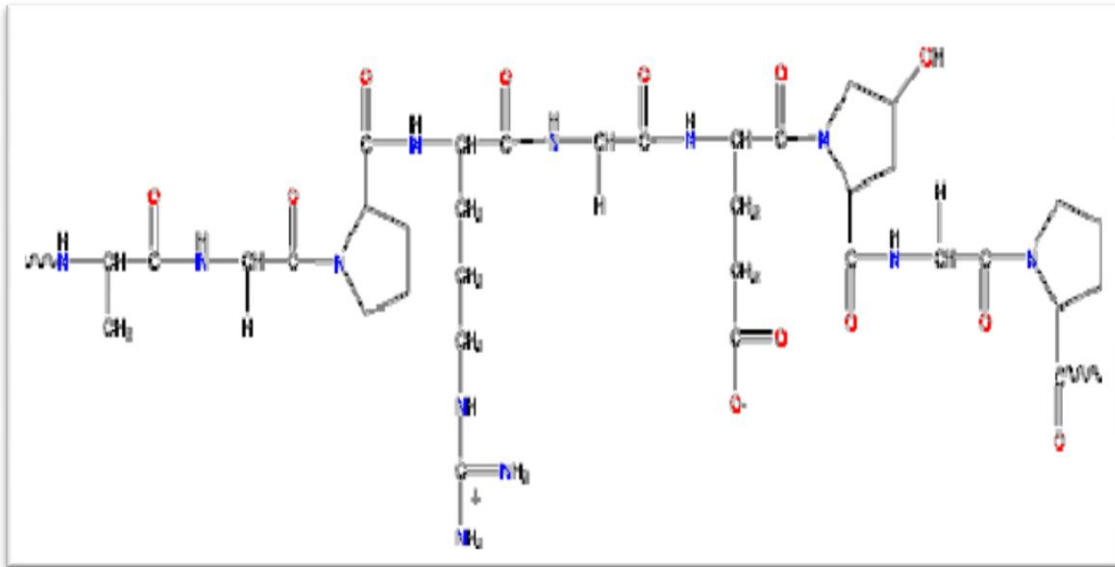
Şekil 2.4. Glutaraldehitin formülü

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

2.1.2.3 Jelatin

Jelatin, sığır, domuz, koyun gibi hayvanların kemik, deri ve tendonlarındaki kollajenin hidroliziyle elde edilen bir proteindir. Jelatinin karakteristik özelliği, prolin, glisin ve hidroksiprolin aminoasitlerini yapısında çok bulundurmasıdır. Yapısı genel olarak tekrarlanan glisin-X-Y triplet yapısını içerir ve genellikle X prolin, Y ise hidroksiprolindir. Bu aminoasitler, jelatinin üçlü bir heliks yapı oluşturmasında ve jelleşme özelliği kazanmasında etkilidirler. Jelatin oda sıcaklığında katıdır, tamponda çözülüp ısıtıldıktan sonra oda sıcaklığına getirildiğinde jel kıvamını alır. Bu özelliğinden dolayı iyi ve kolay kullanılabilir bir immobilizasyon malzemesidir (**Rose ve ark. 1987**).

Jelatin eğer biyomalzeme olarak kullanılmak isteniyorsa çapraz bağlı olmak zorundadır. Son zamanlarda jelatin filminin çapraz bağları fiziksel olarak termal ısı ve ultraviyole ışınlar yardımıyla oluşturulmakta, kimyasal olarak ise formaldehit, glutaraldehit, suda çözünen karbodiimid, diepoksi bileşenleri ve diizosiyanatlar gibi çapraz bağlayıcı ajanlar kullanılarak elde edilmektedir. Biyosensör çalışmalarında ise termal ve mekanik kararlılığının artırılması amacıyla immobilizasyonda genellikle çapraz bağlayıcı glutaraldehit ile birlikte kullanılır (**Sezgintürk ve ark. 2005, Odacı ve ark. 2004, Espesito ve ark. 1995**). Şekil 2.5'te jelatinin yapısı görülmektedir.



Şekil 2.5. Jelatinin yapısı (<http://www.lsbu.ac.uk/water/hygel.html>)

2.2 Enzimler

Proteinler, tüm hücrelerde ve hücrelerin tüm bölümlerinde en çok bulunan biyolojik makro moleküllerdir. Proteinler genetik bilginin tanımlandığı moleküler araçlardır. Çok farklı çeşitte bulunabilecekleri gibi büyüklükleri de ufak peptitlerden milyonlarca moleküler ağırlıktaki büyük polimerlere kadar değişebilmektedir. Ayrıca proteinler, biyolojik işlev manasında da aşırı çeşitlilik gösterirler (Nelson ve ark. 2005).

Enzimler kimyasal reaksiyonları katalizleyen biyolojik polimerlerdir. Enzimler olmasaydı bildiğimiz şekliyle yaşam olanaksız olacaktı. Yürüyen bütün fizyolojik olayların hızlarını düzenleyen biyokatalizörler olarak enzimler, sağlıkta ve hastalıkta merkezi bir yer işgal eder. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç, bilinen enzimlerin çoğu protein yapısındadır (Murray ve ark. 1998).

Biyokimya tarihinin genelinde enzim araştırmalarına rastlamak mümkün. Biyolojik kataliz ilk olarak 1700'lerin sonunda midenin salgılarıyla etin sindirimi üzerine yapılan çalışmalarda keşfedilmiş ve daha sonra tükürük ve çeşitli bitki özütleriyle nişastanın şekere dönüşümü çalışmalarıyla sürdürülmüştür. 1800'lerin sonunda Louis Pasteur şekerin mayayla alkole fermentesinin “fermentler” tarafından katalizlendiğini ve bu “fermentlerin” canlı maya hücrelerinin yapılarından ayrılmaz olduğunu öne sürmüştür. Ama, Buchner maya özütlerinin şekeri alkole fermentlediğini, bunun da hücreden ayrıldığında işlevine devam eden moleküller tarafından sağlandığını keşfetmiştir. Frederic W.Kühne ise bu molekülleri “enzimler” olarak adlandırmıştır (Nelson ve ark. 2005).

Enzimlerin belirli bileşik gruplarıyla reaksiyon verip, başka bileşiklerde etkili olmamasına enzim spesifikliği denir. Bazı enzimler dar bir spesifikliğe sahipken bazı enzimler bu anlamda daha genişirler. Üreyi, karbondioksit ve amonyağa parçalayan üreaz enzimi dar bir spesifite gösterir, bununla birlikte bir ince bağırsak proteazı olan kimotripsin ise substratına karşı daha az spesifiktir (Montgomery ve Conway 2000).

Grup aktarma ve diğer tepkimeleri katalizleyen bir çok enzim, substratlarına ek olarak koenzim adı ile bilinen ikinci bir organik molekül gerektirir ve bunlar bulunmuyorsa etkinlik göstermez. Koenzimler, metal iyon etkinleştiricileri ve bizzat enzimin kendisinden ayırt edilmeleri için, enzimlerin etkinliği için gereken, sıcağa dirençli, küçük molekül ağırlıklı organik bileşikler olarak tanımlanır. Sindirim enzimleri tarafından kataliz edilen hidrolitik tepkimeler dahil litik tepkimeleri katalizleyen enzimler koenzim gereksinmez (Murray ve ark. 1998). Bir enzim molekülünün katalitik aktivitesi genel olarak yapısının bütünlüğüne bağlıdır. Dolayısıyla yapıdaki herhangi bir bozulma aktivite kaybı ile beraberdir, bu süreç

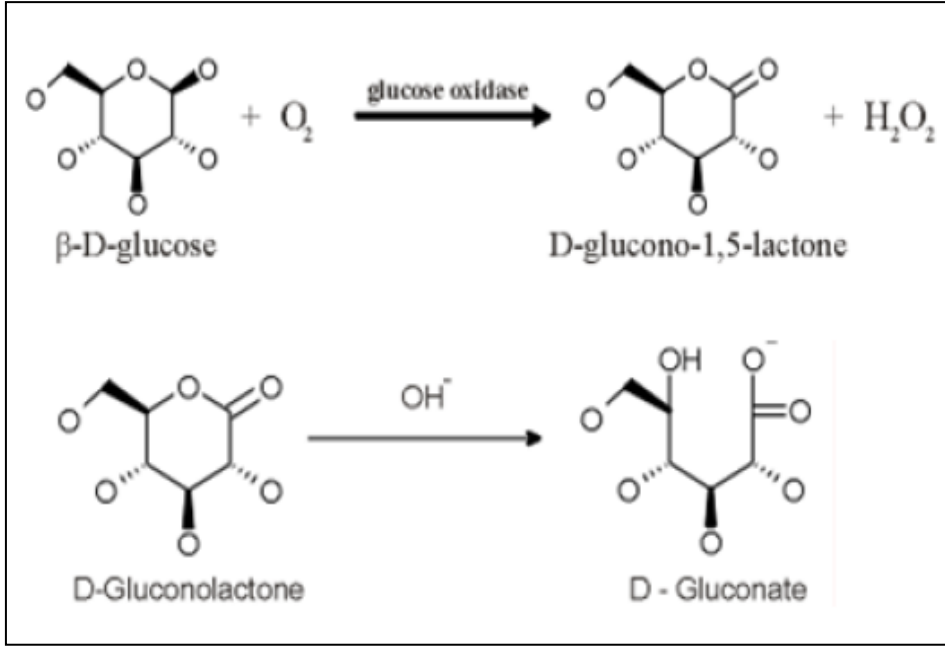
denatürasyon olarak bilinir. Eğer denatürasyon çok ilerlememişse, denatüre edici etkenin uzaklaştırılması ile aktivite geriye döner. Bununla beraber uzamış veya ileri derecedeki denatüre edici koşullar aktivitede geri dönüşümsüz bir kayba sebep olur (**Burtis ve Ashwood 2007**).

Enzimler sıcaklıkla çoğunlukla denatüre olurken, kofaktörler ısıya dayanıklıdır. Katalitik bakımdan etkin olan enzim-kofaktör kompleksine “haloenzim” adı verilir. Kofaktörü kendisinden ayrılan enzim, aktivitesini kaybeder (**Onat ve Emerk 1997**). Genomik dizilimle ilgili araştırmalarla birlikte, çok sayıda enzim tanımlanmıştır. 2004 yılının ortalarından itibaren, 9800 farklı organizmadan 83000’den fazla farklı enzime dair bilgiye ulaşmak mümkün. Bütün enzimler katalizledikleri kimyasal reaksiyonlara göre 6’ya ayrılırlar (**Devlin 2006**).

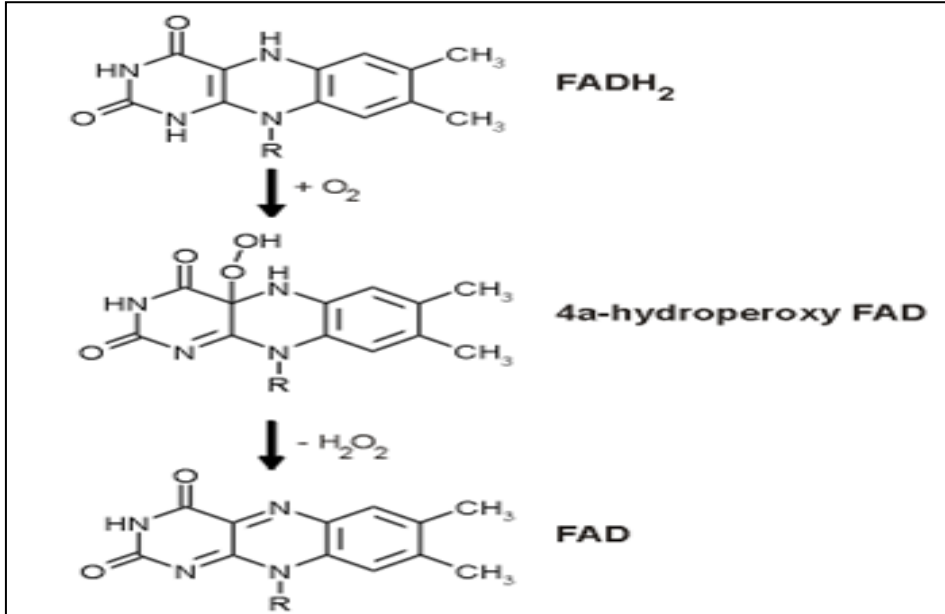
1. Oksidoredüktazlar; elektronların transferini,
2. Transferazlar; Grup-transfer tepkimelerini,
3. Hidrolazlar; hidroliz tepkimelerini,
4. Liyazlar; çift bağlara grupların ilavesi ve grupların yer değişmesiyle çift bağların oluşmasını,
5. İzomerazlar; İzomerik formları oluşturmak üzere moleküller içinde grupların transferini,
6. Ligazlar; ATP'nin ayrılmasıyla eşleşmiş kondensasyon tepkimeleriyle C-C, C-S, C-O, ve C-N bağlarının oluşmasını katalizler (**Nelson ve Cox 2005**).

2.2.1 Glukoz Oksidaz Etki Mekanizması

Glukoz oksidaz, şekil 2.6’da görüldüğü gibi elektron alıcısı olarak moleküler oksijeni kullanarak β -D-glukozun D-glukanolakton ve hidrojen peroksite (H_2O_2) oksidasyonunu katalizler. Öncelikle elektronlar FAD kofaktörüne transfer edilerek $FADH_2$ sentezlenir. Daha sonra $FADH_2$ ye moleküler oksijen bağlanır ver son adımda da H_2O_2 $FADH_2$ den ayrılarak FAD rejenerasyonu gerçekleşir. Glukoz oksidasyonunun başlangıç ürünü D-glukano-1,5-lakton dur. D-glukano-1,5-lakton glukoz oksidazın zayıf bir kompetitif inhibitörüdür. Daha sonra bu molekül glukonik aside hidrolizlenir. Bu hidroliz için hız sabiti pH bağımlıdır (www.chem.ch.huji.ac.il). Şekil 2.6’da β -D-glukozun GOD enzimiyle oksidasyonu görülmektedir.



Şekil 2.6. β -D-glukozun GOD enzimiyle oksidasyonu (www.chem.ch.huji.ac.il)



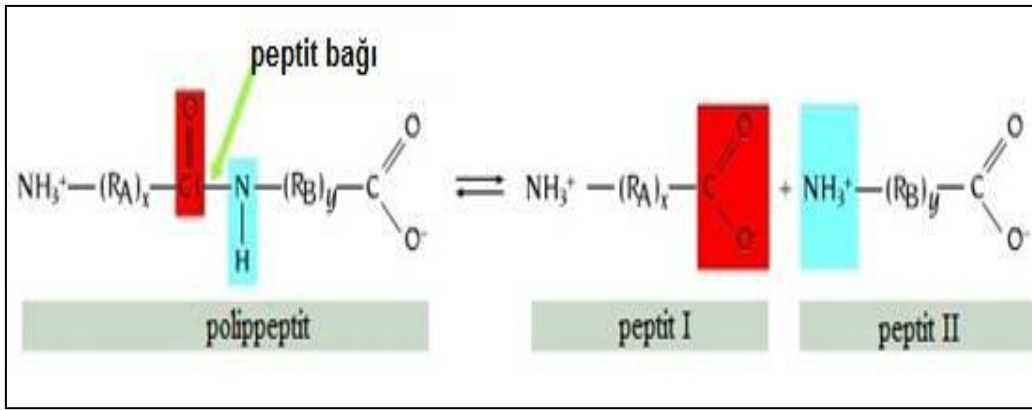
Şekil 2.7. Doğal elektron alıcısı tarafından FADH₂ oksidasyonunun mekanizması. (www.chem.ch.huji.ac.il)

Şekil 2.7.'de doğal elektron alıcısı tarafından FADH₂ oksidasyonunun mekanizması görülmektedir. GOD enziminin Michaelis sabiti literatür değerleri glukoz için 20 mM ve O_2 için 0,25 mM dır. Radyo aktif olarak işaretlenmiş dioksijen (O_2) ve su kullanılarak yapılan denemede, reaksiyon sonucu üretilen hidrojen peroksit içerisindeki oksijenin sudan çok çözülmüş oksijenden ileri gelmiş olduğunu göstermiştir. Enzim 2-deoksi-D-glukoz, D-

mannoz ve D-fruktozu da oksitler ama β -D-glukoz için çok yüksek bir spesifikliğe sahiptir. (www.chem.ch.huji.ac.il)

2.2.2 Proteazlar, fizyolojik özellikleri ve sınıflandırılmaları

Farklı özellikteki ve kombinasyondaki bir çok enzim; proteinlerin amino asitlerine yıkılmasına gerek duyar. Proteazlar (proteinazlar veya peptidazlar) su ile peptit bağlarını yıkıp proteinleri hidrolizleyen ve organik çözücüler varlığında peptit sentezini katalizleyebilen enzim grubudur (Sookkheo ve ark. 2000) (Şekil 2.8). Proteazlar sadece sindirim yolunda değil her hücre içerisinde bulunurlar (Koolman ve Roehm 2005).



Şekil 2.8. Proteazların genel mekanizması

Proteolitik enzimler tüm canlı organizmalarda büyüme ve farklılaşmayı ve hücrel bileşenlerin ihtiyaç duyduğu iç dengeyi (homeostasiyi) sağlar. Organizmada sentezlenen proteinlerin kompozisyonunun, büyüklüğünün, biçiminin ve döngüsünün kontrolünde elzem olan bu enzimler kanın pıhtılaşması, kontrollü hücre ölümü, doku farklılaşması, gen ekspresyonu gibi yaşam için önemli biyolojik süreçlerde de rol oynar (Harem 2005, Rao ve ark. 1998).

Bu fonksiyonlarının direkt bir sonucu olarak proteazlar; DNA replikasyonuna ve transkripsiyonuna, doku morfojenizine ve yeniden şekillenmesine, hücre çoğalması ve farklılaşmasına, ısı şok protein yanıtına, damar genişlemesi (anjyogeneze), sinir dokusu oluşumu (nörojenez), ovülasyona, fertilizasyona, yara iyileşmesine, kök hücre mobilizasyonuna, inflamasyona, bağışıklığa, otofajiye (otoliz) yaşlanmaya, nekroz, ve apoptoz etkir.

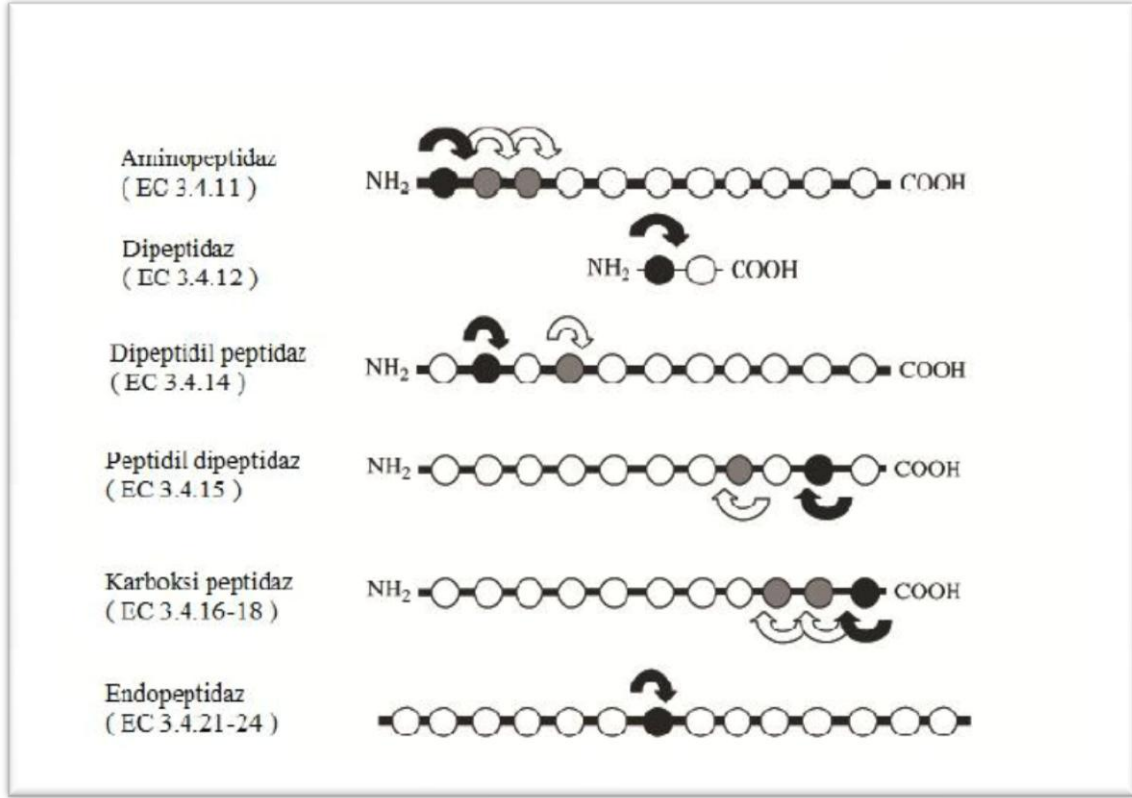
Proteazların hücrel davranışlarda ve organizmanın yaşamla ölüm arasındaki dengesinde bu kadar etkin olması; proteolitik sistemlerdeki bir bozulmanın, kanser,

nörodejenerasyon, inflamatuvar ve kardiyovaskular hastalıkların temelini oluşmasına sebep olabilir. Bu sebepten ötürü, ilaç endüstrisi için proteazlar, teşhis için tasarlanan hedef ilaçların temel noktasıdır. Proteazlar bitkilerde de; olgunlaşma ve yıkım süreçlerinin gelişiminde ve değişen çevresel koşullara uyum gibi noktalarda kilit rol oynar. Aynı şekilde bir çok enfeksiyöz mikroorganizma replikasyon için proteazlara gereksinir veya AIDS gibi insan hayatıyla doğrudan ilişkili hastalıkların proteaz hedefli tedavisinin gelişiminde proteazı zehirlilik (virülan) faktörü olarak kullanır (**Otin ve Bond 2008**).

Proteolitik enzimler, hücre metabolik süreçlerde önemli rol oynamalarının haricinde endüstriyel çevrelerin de oldukça dikkatini çekmektedir. Endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılan enzimlerin dünya genelindeki toplam satışının 1 milyar doların üzerinde olduğu tahmin edilmektedir. Proteazlar ise endüstride en çok kullanılan üç enzimin içerisinde yaklaşık %60lık pazar payıyla başı çekmektedir (**Rao ve ark. 1998**). Proteazlar endüstrinin deterjan, protein, bira, fotoğraf, deri ve süt alanlarında oldukça çok kullanılmaktadır (**Anwar ve Saleemuddin 1998**).

Proteazlar etki bölgelerine göre kabaca ikiye ayrılabilirler; ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar. Ekzopeptidazlar; peptit bağlarını substratın amino (- NH₂) veya karboksil (- COOH) ucuna yakın bir yerden parçalarken endopeptidazlar ise uzak bir noktadan parçalar. Aktif bölgedeki fonksiyonel grubun varlığına ve katalitik mekanizmasına göre proteazlar için 6 farklı gruplandırma daha yapmak mümkündür; aspartik, glutamik, ve metalloproteazlar, sistein, serin, ve treonin proteazlar. Glutamik proteazlar, memelilerde henüz bulunamamıştır (**Otin ve Bond 2008**).

Proteazlar aktivite gösterdikleri pH aralığına göre de, asidik, nötral ve alkali proteazlar olarak sınıflandırılmışlardır. Şekil 2.9.'da katalizledikleri reaksiyona göre proteazların sınıflandırılması görülmektedir (**Rawlings 2007**).



Şekil 2.9. Katalizledikleri reaksiyona göre proteazların sınıflandırılması (**Rawlings ve ark. 2007**).

Farklı yapıdaki proteazlar için amino asit dizilimlerinin kıyaslanmasıyla ileri bir gruplandırma yapılabilir ve bu gruplar 3 boyutlu yapıların benzerliği çerçevesinde bir araya getirilebilir (**Rao ve ark. 1998, Otin ve Bond 2008**)

2.2.2.1 Ekzo peptidazlar

Ekzo peptidazlar, polipeptit zincirinin amino veya karboksil ucundaki peptit bağlarını hidroliz eder. Amino ucunu hidrolizleyen ekzo peptidazlar; amino peptidazlar, karboksil ucunu hidrolizleyen ekzo peptidazlar karboksipeptidazlar olarak adlandırılır.

2.2.2.2 Endo peptidazlar

Endo peptidazlar, peptit bağlarına N veya C ucundan uzakta, iç kısımlarda etkirler. Serbest amino veya karboksil gruplarının varlığı enzim aktivitesine negatif yönde etki eder. Endo peptidazlar, katalitik mekanizmalarına göre serin proteazlar (E.C.3.4.21) sistein proteazlar (E.C.3.4.22) aspartat proteazlar (E.C.3.4.23) ve metallo proteazlar (E.C.3.4.24) olarak sınıflandırılır (**Rao ve ark. 1998**).

Sistein (tiyol) Proteazlar (EC.3.4.23)

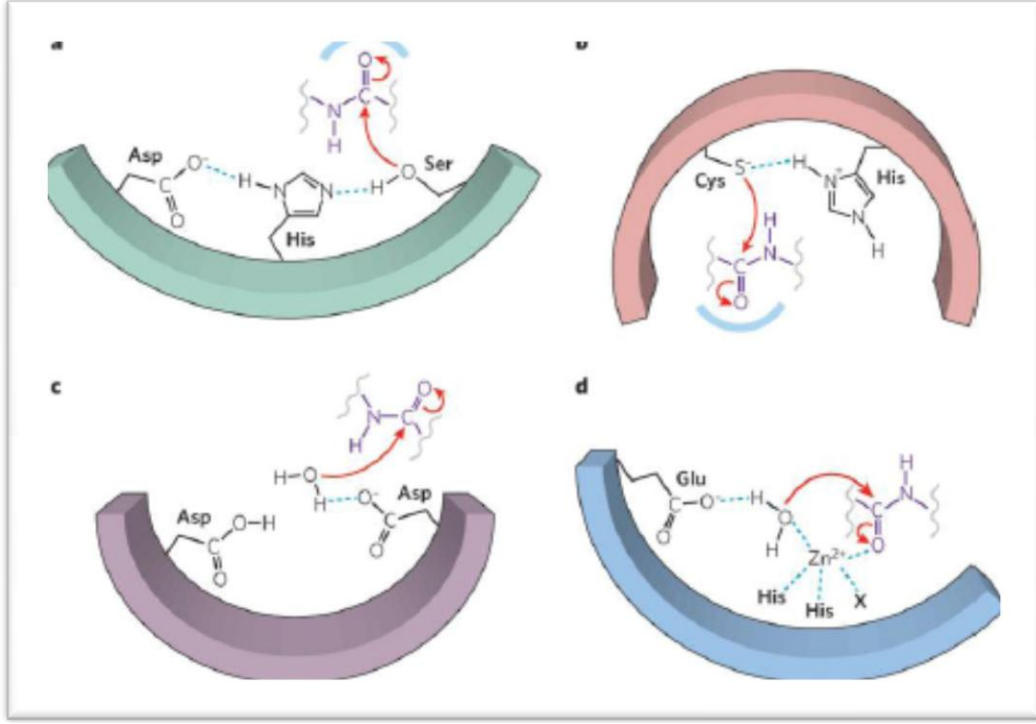
Sistein proteazlar hem ökoryotlarda hem de prokaryotlarda bulunur. Yaklaşık 20 tane sistein proteaz ailesi tanımlanmıştır. Sistein proteazların katalitik aktivitesi sistein ve histidin kalıntıları bulundurmasına bağlıdır. Bu sistein ve histidin yapılarının düzenlenmesi her ailede farklılık göstermektedir. Genellikle sistein proteazlar sadece HCN veya sistein varlığında aktiftirler. Yan zincirlerinin spesifitesine göre 4 ana gruba ayrılırlar;

- (i) papazin benzeri
- (ii) tripsin benzeri olanlar
- (iii) glutamik asite özgü olanlar ve
- (iv) diğerleri.

Papain en çok bilinen sistein proteazdır. Sistein proteazlar genellikle nötral pH'ya sahip olmalarına rağmen, lizozomal proteazlar asidik pH'ta aktiftir. PCMB gibi sülfhidril ajanlara karşı hassastırlar ama DFP ve metal şelatlaştırıcı ajanlardan etkilenmezler (**Rao ve ark. 1998, Powers ve ark. 2002**).

Sistein proteazlar açil-tiyol ara ürününün hidrolizlendiği genel asit-baz oluşumunu gerektiren iki yer değiştirme reaksiyonunun gerçekleştiği hidroliz mekanizması ile karboksilik asit türevlerini hidrolizlerler. Açil tiyol ara ürününün oluşumundan dolayı tiyol proteazlar olarak da adlandırılırlar. Mekanizmaları serin proteazların mekanizmalarına çok benzemektedir. Katalitik prosesin ilk basamağı serbest enzim ile substratın kompleks formda nonkovalent bağlanmasını gerektirir. Bu basamağı enzimin açilasyonu izler ve ilk ürün R⁻-NH₂ oluşur ve ayrılır. Takip eden deaçilasyon basamağında açil-enzim kompleksi su molekülü ile tepkir ve ikinci ürün ayrılır serbest enzimin rejenerasyonu gerçekleşir (**Rao ve ark. 1998**).

Sistein proteazlara daha çok papaya, ananas, incir ve kivi gibi meyvelerde sıkça rastlanır. Meyvenin olgun olmayan halinde proteaz oranı daha fazladır. Sistein proteazlar, fizyolojik manada çok fazla role sahiptir, örneğin bitkilerin büyüme ve gelişiminde, kontrollü hücre ölümünde, çekirdeklerdeki depo proteinin birikimi ve mobilizasyonunda görev alırlar. Ayrıca, metabolik yolların uyarımında, biyotik ve abiyotik strese yanıtla da doğrudan ilgilidirler (**Grudkowska ve Zagdańska 2004**).



Şekil 2.10 Dört endoproteaz türüne ait mekanizmaların genel özeti (a) serin proteaz, b) sistein proteaz, c) aspartil proteaz ve d) metaloproteaz) (**İnternet: “Endoproteases” 2011**)

2.2.2.3 Proteaz enziminin kaynakları

Yaşayan bütün organizmalar proteazlara fizyolojik olarak gerek duydukları için, bu enzim bitkiler hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi kaynaklardan elde edilebilmektedir. Bundan dolayı proteazlar kaynağına göre, bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal olmak üzere üç farklı grupta incelenir.

Bitkisel Kaynaklar

Bitkilerin proteaz kaynağı olarak kullanılmasını, bitkinin yetiştiği iklim koşulları ve kültivasyon toprağının uygunluğu gibi farklı faktörler belirlemektedir. Ayrıca bitki tarafından proteazın üretilmesi zamana bağlı bir süreçtir. Papain, bromelain, keratinaz ve fisin en iyi bilinen bitki kaynaklı proteazlardır. Bitkisel kaynaklı proteazlar özellikle tropikal bitkilerden elde edilmektedir.

Bilinen en güçlü bitkisel proteaz kaynakları; papaya (*Carica papaya*), ananas (*Ananas sativa*), bazı *Ficus* türleri (*F. carica*, *F. glabrata*), enginar (*Cynara cardunculus*) ve soya fasulyesi (*Soya hispida*) dir (**Rao ve ark. 1998**).

Papain, vücudumuzda karbonhidrat ve yağlar gibi diğer bileşikleri de etkileyerek tüm sindirim sistemini olumlu yönde düzenleme yeteneğine de sahiptir. Papaine, mide tarafından

salgılanan ve proteinleri parçalayan enzim olan pepsine benzerliği nedeni ile bitkisel pepsin adı da verilir (<http://en.wikipedia.org/wiki/Tripsin> 2011).

Papain bir sistein proteazdır ve enzimin performansı, yetiştirildiği iklimsel koşullara, bitki kaynağına, saflaştırılması ve ekstraksiyonu için kullanılan metotlara bağlıdır. Enzim pH 5-9 arasında aktiftir ve substrat varlığında 80 ya da 90°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda kararlıdır (**Rao ve ark. 1998, Gurdkowska ve Zagdańska 2004**).

Hayvansal Kaynaklar

Proteazların bir diğeri ve belki de çok öncelerden beri bilinen kaynağı hayvanlardır. En çok bilinen hayvansal kaynaklı proteazlar, pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve renindir.

Tripsin (EC 3.4.21.4), pankreastan salgılanan, ince bağırsakta proteinlerin sindiriminden sorumlu olan ana enzimdir. Tripsin bir serin proteazdır ve peptid bağlarını lizin ve arginin kalıntılarından sonra gelen karboksil gruplarından hidrolizler. Tripsin öncelikle pankreasta inaktif formu olan tripsinojen (zimojen) halinde üretilir sonra ince bağırsağa salgılanır. Orada enteropeptidazlar proteolitik parçalanma yardımıyla tripsinin aktivasyonunu başlatır. Bu aktivasyon mekanizması pankreasın kendi kendini sindirmemesi için elzemdir ve çoğu serin proteazlar için geneldir. Tripsinin optimum pH'sı yaklaşık 8 ve optimum sıcaklığı da yaklaşık 37°C'dir. Böceklerin bağırsaklarındaki enzimler, enzim inhibitörleri tarafından inhibe edilebileceğinden tripsin enzimi zararlı haşaratın biyokontrolünde dikkatleri üzerine toplamaktadır (**Rao ve ark. 1998, wikipedia tripsin 2011**).

Kimotripsin, (EC 3.4.21.1) hayvansal pankreatik ekstraktlarında bulunan sindirim enzimidir. Bir serin proteazdır ve peptid bağlarını fenilalanin, tirozin ve triptofan kalıntılarından sonraki karboksil gruplarından hidrolizler. Pepsin, (EC 3.4.23.1) gıda proteinlerini parçalamak için hemen hemen tüm omurgalıların midelerinde ana hücreler tarafından salgılanan asidik proteazdır.

Keşfedilen ilk hayvansal enzimdir, ayrıca kristalize edilen ilk enzimler arasındadır. Aktif enzim, zimojen formu olan pepsinojenden HCl varlığında salınır. Pepsin bir aspartil proteazdır ve midenin pH'sı 2-4 arasındayken enzim pH 1-2 arasında optimum aktivite gösterir, pH 6'nın üzerinde inaktive olur ve iki hidrofobik amino asit arasındaki peptid bağlarının hidrolizini katalizler (**Rao ve ark. 1998, wikipedia pepsin 2011**).

Mikrobiyal Kaynaklar

Bitkisel ve hayvansal kaynaklı proteazların bazı yetersizlikleri günümüz dünyasının mikrobiyal proteazlara olan ilgisini arttırmıştır. Mikroorganizmaların biyoteknolojik uygulamalar için neredeyse tüm karakteristik özelliklerinin istenen yönde değiştirilebilmesi mümkün olduğu için mikrobiyal kaynaklı proteazlar bitki ve hayvansal kaynaklı proteazlara tercih edilmektedirler **(Rao ve ark. 1998)**.

Mikrobiyal proteazlar enzimolojinin gelişiminden beri kapsamlıca çalışılan en önemli hidrolitik enzim grubudur **(Gupta ve ark. 2002)** ve dünya enzim endüstrisinin % 40'ını oluşturmaktadır. Fungal proteazlar pH 4-11 gibi geniş bir pH aralığında aktivite gösterirler. Bakteriyel kaynaklı enzimler ile karşılaştırıldıklarında daha düşük reaksiyon hızı ve daha düşük bir sıcaklık toleransına sahiptirler **(Anwar ve Saleemuddin 1998)**.

Fungal enzimler katı hal fermentasyon prosesi ile üretilirler. Fungal asit proteazlar pH 4-4,5 arasında optimuma sahiptirler, pH 2.5-6 arasında kararlıdır. Dar pH ve sıcaklık spesifiklerinden dolayı özellikle peynir yapımı endüstrisinde kullanılırlar. Fungal nötral proteazlar ya da metaloproteazlar, pH 7'de aktiftirler ve şelatlayıcı ajanlar tarafından inhibe olurlar. Peptidaz aktiviteleri ve hidrofobik amino asit bağlarının hidrolizindeki spesifik fonksiyonlarından dolayı besin protein hidrolizatlarının acılığının azaltılmasında kullanılırlar. Fungal alkali proteazlar ise gıda proteinlerinin modifikasyonunda kullanılırlar **(Rao ve ark. 1998)**.

Viral proteazlar AIDS ve kanser gibi hastalıklara sebep olan virüs proteinlerinin prosesiyle fonksiyonel olarak ilgili olduklarından çok önemlidirler. 20 yıldan fazladır süren çalışmalar göstermektedir ki bir çok virüs bir veya daha fazla proteaz kodlamaktadır **(Tong 2002)**.

Serin, aspartil, ve sistein peptidazlar çeşitli virüslerde bulunmuştur. Virüs kodlu tüm peptidazlar endopeptidazdır, metalopeptidaz bulunmaz. Yapılan araştırmalarda viral proteazların üç boyutlu yapısı ve sentetik inhibitörler ile etkileşimi odak noktası olmuştur **(Rao ve ark. 1998)**. Bakteri kaynaklı mikrobiyal proteazlar, başlıca nötral ve alkali ticari proteazların çoğu Bacillus cinsi bakteriler tarafından üretilirler. Bakteriyel nötral proteazlar, Ph 5-8 arasında ve düşük sıcaklıklarda aktiftirler ve bağıl olarak düşük termotoleransa sahiptirler. Hidrofobik amino asit çiftlerine yüksek afiniteleriyle karakterize edilirler.

Bazı nötral proteazlar metalloproteazlar grubuna üyedirler ve aktivite gösterebilmek için iki değerlikli metal iyonlarına ihtiyaç duyarlarken serin proteazlar şelat yapıcı ajanlar tarafından etkilenmezler **(Rao ve ark. 1998)**.

Ekstremofiller, volkanların yüksek sıcaklıklarında, kutupların düşük sıcaklıklarında, çok düşük ve çok yüksek pH değerlerinde (pH 0-3 veya pH 10-12) veya çok yüksek tuz konsantrasyonlarında (%5-30) yaşamak için adapte olmuş organizmalardır. Ekstremofiller ekstrem çevre koşullarına göre; termofiller, asidofiller, alkalofiller, psikrofiller, barofiller, halofiller ve diğerleri olarak sınıflandırılır. Sonuç olarak, bu mikroorganizmalar özellikle endüstriyel proseslerin gelişiminde kullanılabilen ekstrem koşullara dayanıklı biyokatalizörler üretirler (**Demirjian ve ark. 2001, Niehaus ve ark. 1999**).

Alkalofilik mikroorganizmalar yüksek alkali koşullara adapte olmuş mikroorganizmalardır ve alkalofiller ve alkalotolerantlar olarak iki ana gruba ayrılırlar. Alkalofiller terimi pH 10 ve üzerinde yaşayabilen optimal büyümesi pH 9 civarında olan ve pH 7 ve altında büyüemeyen organizmalar için kullanılır.

Alkalotolerantlar ise pH 10'nun çok üzerinde büyüebilirler ama optimal büyüme pH'arı nötralite civarındadır. Alkalofilik mikroorganizmaların çoğu alkali proteaz üretir ve endüstrinin çeşitli alanlarında uygulama imkanı bulunur (**Kumar ve Takagi 1999**). Bununla birlikte *Bacillus* türleri yüksek aktivitede çok büyük oranlarda enzim saklama yeteneğine sahiptirler ve çok çeşitli ortamlardan izolasyonları nispeten kolaydır (**Ito ve ark. 1998**).

Bakteriyel alkali proteazlar, geniş substrat spesifisitesi ve alkali pH'daki yüksek aktivitesiyle karakterize edilirler. Optimum sıcaklığı 60°C civarındadır ve pH 10'da optimumuna sahiptirler. Bakteriyel alkali proteazların bu özellikleri onları deterjan endüstrisinde kullanmak için uygun kılar (**Rao ve ark. 1998**).

3.MATERYAL ve METOD

3.1.Materyal

Deneyde kullanılan Tripsin enzimi Sigma-Aldrich (St. Louis, MO USA)'den alınmıştır. Tüm seyreltme işlemleri pH 7'de 50 mM olarak hazırlanan fosfat tampon ile yapıldı. Tripsin enzimi belli konsantrasyonlarda porsiyonlama yaparak -20°C 'de muhafaza edilmiştir. Çalışma elektrodu olarak GCE, referans elektrot olarak KCl ile doygunlaşmış 3M Ag/AgCl elektrot ve yardımcı elektrot olarak ise 10mm uzunluğunda platin tel kullanılmıştır. Tüm elektrotlar İBAS, Warwickshire, UK firmasından getirilmiştir. Ölçümler ise döngüsel voltametri ve kronoamperometri yazılımı olan Ivium Soft ile elektrokimyasal impedans spektroskopisi yazılımı olan Echem Analyst içeren bir bilgisayara bağlı Gamry Potentiostat/Galvanostat, Reference 1000 cihazında alınmıştır.

3.2 Elektrokimyasal Ölçümler

GCE elektrota uygulanan bütün immobilizasyon işlemlerinin karakterizasyonunu ölçmek için döngüsel voltametriden (CV), kronoamperometriden, elektrokimyasal impedans spektroskopisinden (EIS) yararlanılmıştır. CV için potansiyel aralığı -0,5 – 1 V arasında seçilmiş olup (adım büyüklüğü: 20 mV, tarama hızı: 50 mV/s) ölçümler 0.1 M KCl içeren ve ölçüm için redoks probu sunan 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1) çözeltisi içinde gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal impedans ölçümleri ise 10 mV alternatif akımda gerçekleştirilmiştir. Ölçümde kullanılan redoks çifti, döngüsel voltametredeki ile aynıdır. İmpedans spektrumları 10.000 – 0.05 Hz aralığındadır. Kronoamperometri ölçümlerinde potansiyeli 0,5 V (600 saniye) seçilmiş olup ölçümler 50 mM sitrat monohidrat içeren ve ölçüm için redoks probu sunan 25 mM $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisi içerisinde gerçekleştirilmiştir.

3.3 Ölçüm Prosedürleri

Enzim hidrolizi temelli biyosensörün hazırlanması için kullanılan çalışma elektrodu camı karbon elektrottur. Tripsin enziminin konsantrasyonu sabit potansiyelde sistemden geçen akım miktarındaki değişimlerle doğru orantılıdır ve camı karbon çalışma elektrodu ile akım değişimlerini belirlemek mümkündür. Bu sistemin oluşturulması amacıyla camı karbon çalışma elektrodu yüzeyi jelatin + glukoz oksidaz (GOD) karışımıyla kaplandı ve sonra glutaraldehit ile çapraz bağlama gerçekleştirildi.

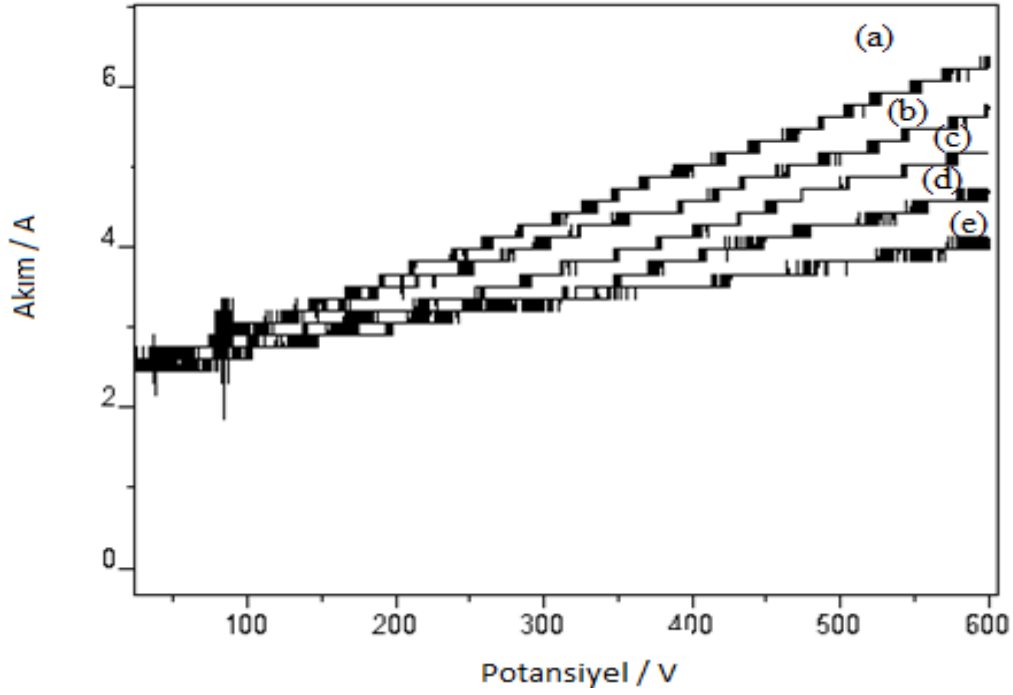
Enzim hidrolizi temelli biyosensörün hazırlanmasında izlenen yol tripsin biyosensörü için metod kısmında ayrıntılı olarak verilmiştir. Belirtilen değerler; çok sayıdaki ön denemeler ve

optimizasyon çalışmaları sonrasında belirlenen en uygun değerlerdir. Hazırlanan sensörler önce destile su ile yıkanmış ve ölçümler arasında çalışma sıcaklığında çalışma tamponu içerisinde bekletilmiştir.

3.4. Glukoz oksidaz biyosensörünün hazırlanması ve ölçüm aşamaları

Tablo 3.1. GOD biyosensörünün hazırlanması ve ölçüm aşamaları

| İşlem sırası | Yöntem |
|--------------|--|
| 1 | Uygun aktiviteye sahip 1mg GOD 100µl pH 7 Pi tamponunda çözüldü 10µl olacak şekilde porsiyonlama yapıldı. |
| 2 | 50µl pH 7,50Mm Pi tamponu daha önce tartılmış olan 7,5mg jelatin üzerine mikro pipetle eklenerek 38°C'lik su banyosunda çözünmesi sağlandı. |
| 3 | 10µl olarak porsiyonlanmış olan glukoz oksidaz enzimi üzerine hazırlanmış jelatin çözeltisinden mikro pipetle 5µl eklenir ve su banyosunda karışması sağlanır. |
| 4 | Hazırlanan karışımdan 10µl alınarak belirli koşullarda temizlenmiş olan GCE üzerine uygulanıp yayıldı. |
| 5 | Hazırlanan biyosensör 30dk +4°C de bekletildi. |
| 6 | 30dk sonunda %1'lik 20µl glutaraldehit (pH:7 50Mm Pi tamponunda) ile 5 dk muamele edildi.5dk sonunda biyosensör ultra saf suya 5 kez daldırıldı. |
| 7 | Ekleme yapılmak üzere glukoz çözeltisi hazırlandı.(0,189g glukoz 1ml sitrat tamponunda çözüldü. Her kronoamperometrik ölçüm aşamasında 60µl ekleme yapıldı.) |
| 8 | Hazırlanan biyosensörün pH 5,5 sitrat tamponunda oda sıcaklığında kronoamperometrik ölçümü alındı.(sitrat tamponu her defasında 5dk argon gazından geçirildi.) |
| 9 | 1mg tripsin 100µl NaHCO ₃ pH 8 tamponunda çözüldü. Bu çözeltiden 10µl alınarak 990µl tampon tekrar ilave edildi ve çözelti stok kabul edildi. |
| 10 | Hazırlanan biyosensör, ilk olarak içerisinde 5µl tripsin çöz+995µl tampon bulunan steril şişelerde magnet yardımıyla 1saat karıştırıcı üzerinde bekletildi.1saat sonunda ultra saf suya daldırılıp pH:5.5sitrat tamponunda karıştırıcı yardımıyla kronoamperometrik ölçümü alındı. |
| 11 | Bundan sonraki tüm adımlar enzim miktarları değiştirilerek aynı şartlarda gerçekleştirildi. Toplamda 5 enzimli 1 enzimsiz olmak üzere 6 ölçüm alındı. Enzim miktarları sırasıyla; 5µl-10µl-15µl-20µl-25µl ve her defasında toplam hacim 1ml olacak şekilde tamponla tamamlandı.(sitrat tamponu her defasında 5dk argon gazından geçirildi.) |



Şekil 3.1.Kronoamperometrik ölçüm hazırlanan tripsin çözeltisinden (a) 5µl tripsin (b) 10µl tripsin (c) 15µl tripsin (d) 20µl tripsin (e) 25µl tripsin eklenerek alınmıştır.

GOD biyosensörünün ölçüm aşamaları tablo 3.1’de gösterilmiştir. Şekil 3.1’de hazırlanan biyosensörün ölçüm aralıkları görülmektedir. Eklenen tripsin miktarına bağlı olarak sinyal miktarı azalmaktadır. Hazırlanan tripsin çözeltisinden sırasıyla 5µl-10µl-15µl-20µl-25µl alınarak ve tamamı 1000µl olacak şekilde tamamlanarak biyosensör bekletilmeye bırakılmıştır. Her bekleme süresi sonunda kronoamperometrik ölçüm alınmıştır.

3.5. Glikoz oksidaz biyosensörünün optimizasyon çalışmaları

Enzim aktivitesi tayinine yönelik olarak geliştirilen glukoz oksidaz temelli biyosensörün, en üst düzeyde performansla çalışmasını sağlamak amacıyla öncelikle biyoaktif tabakasını oluşturan bileşenlerin optimizasyonları gerçekleştirildi.

3.5.1. Jelatin miktarının belirlenmesi

En uygun jelatin miktarının belirlenebilmesi için farklı jelatin miktarları kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Hazırlanan biyosensörlerin diğer tüm optimizasyon şartları sabit tutularak sadece jelatin miktarları değiştirildi. Aşağıda hazırlanan biyosensörlerin bileşimleri verilmiştir. İnkübasyon adımı 1 saat, 24°C ve NaHCO₃ tamponunda gerçekleştirildi.

Jelatin miktarı optimizasyonu için hazırlanan sensörler

- **2,5mg jelatin** + 18U GOD + %1 glutaraldehit
- **5mg jelatin** + 18U GOD + %1 glutaraldehit
- **7,5mg jelatin** + 18U GOD + %1 glutaraldehit
- **10mg jelatin** + 18U GOD + %1 glutaraldehit

Bu biyosensörler için elde edilen tripsin aktivitesi standart grafikleri karşılaştırılarak en uygun jelatin miktarına karar verildi (Çalışma koşulları;25Mm K₃Fe(CN)₆ içeren, pH 5,5 50mM sitrat tamponu T:24°C ve 0.5V potansiyelde).

3.5.2. Tripsin enziminin inkübasyon süresinin belirlenmesi

Tripsin enziminin aktivitesini en iyi gösterdiği süreyi belirlemek amacıyla farklı zaman aralıklarında hazırlanan biyosensörler bekletildi. Zamanlamanın farklı olduğu biyosensörlerde diğer optimizasyon şartları eşit tutularak denemeler yapıldı. İnkübasyon adımı 24°C ve NaHCO₃ tamponunda gerçekleştirildi. Hazırlanan biyosensörlerin biyoaktif bileşenleri aşağıdaki gibidir;

İnkübasyon süre optimizasyonu için hazırlanan sensörler

- **10dk inkübasyon** → 7,5mg jelatin + 18U GOD + %1 glutaraldehit
- **20dk inkübasyon** → 7,5mg jelatin + 18U GOD + %1 glutaraldehit
- **30dk inkübasyon** → 7,5mg jelatin + 18U GOD + %1 glutaraldehit
- **40dk inkübasyon** → 7,5mg jelatin + 18U GOD + %1 glutaraldehit
- **50dk inkübasyon** → 7,5mg jelatin + 18U GOD + %1 glutaraldehit
- **60dk inkübasyon** → 7,5mg jelatin + 18U GOD + %1 glutaraldehit

Bu biyosensörler için elde edilen tripsin aktivite süreleri standart grafikleri karşılaştırılarak en uygun süre için karar verildi (Çalışma koşulları;25Mm K₃Fe(CN)₆ içeren, pH 5,5 50mM sitrat tamponu T:24°C, 0,5V potansiyelde).

3.5.3. Glukoz oksidaz aktivitesinin belirlenmesi

Glukoz oksidaz aktivitesinin biyosensör üzerindeki etkisini incelemek amacıyla glukoz oksidaz aktivitesi değiştirilerek hazırlanan biyosensörlerde belirlenen optimizasyon şartları sabit tutulmuştur. İnkübasyon adımı 1saat, 24°C ve NaHCO₃ tamponunda gerçekleştirildi. Hazırlanan biyosensörlerin biyoaktif bileşenleri aşağıdaki gibidir;

Glukoz oksidaz konsantrasyonu optimizasyonu için hazırlanan sensörler

- ❖ **9 unite GOD** + 7,5mg jelatin + 40dk + %1 glutaraldehit
- ❖ **18 unite GOD** + 7,5mg jelatin + 40dk + %1 glutaraldehit
- ❖ **36 unite GOD** + 7,5mg jelatin + 40dk + %1 glutaraldehit
- ❖ **72 unite GOD** + 7,5mg jelatin + 40dk + %1 glutaraldehit

Yukarıda belirtilen bileşimlerde biyosensörler hazırlanarak tripsine ilişkin standart grafikler oluşturuldu. Oluşturulan standart grafikler karşılaştırılıp yorumlanarak elde edilen verilerden en uygun GOD aktivitesi miktarı belirlendi (Çalışma koşulları;25Mm K₃Fe(CN)₆ içeren, pH 5,5 50mM sitrat tamponu, T:24°C, 0,5V potansiyelde).

3.5.4. En uygun çalışma potansiyelin belirlenmesi

Uygun potansiyelin seçilebilmesi için, farklı potansiyel değerleri denenerek belirlenen optimizasyon şartlarında uygulama yapılmıştır. İnkübasyon adımı 40dk, 24°C ve NaHCO₃ tamponunda gerçekleştirildi. Hazırlanan biyosensörlerin biyoaktif bileşenleri aşağıdaki gibidir;

- **0,2V** + 7,5mg jelatin + 18U GOD + %1 glutaraldehit
- **0,4V** + 7,5mg jelatin + 18U GOD + %1 glutaraldehit
- **0,5V** + 7,5mg jelatin + 18U GOD + %1 glutaraldehit
- **0,75V** + 7,5mg jelatin + 18U GOD + %1 glutaraldehit

Yukarıda belirtilen bileşimlerde biyosensörler hazırlanarak potansiyele ilişkin standart grafikler oluşturuldu. Oluşturulan standart grafikler karşılaştırılıp yorumlanarak elde edilen verilerden en uygun potansiyel seçildi (Çalışma koşulları;25Mm K₃Fe(CN)₆ içeren, pH 5,5 50mM sitrat tamponu T:24°C).

3.5.5. Tripsin enziminin aktivitesine yönelik uygun tampon pH'sının belirlenmesi

Bu çalışmada uygun pH'nın bulunabilmesi için NaHCO₃ tamponunu aktiviteleri değiştirilerek ve diğer optimizasyon şartları sabit tutularak uygulamalar gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon adımı 40dk, 24°C ve NaHCO₃ tamponunda gerçekleştirildi. Aşağıda biyoaktif bileşenlerin değerleri belirtilmiştir:

- **pH6,4** + 7,5mg jelatin + 18U GOD + % 1 glutaraldehit
- **pH6,8** + 7,5mg jelatin + 18U GOD + % 1 glutaraldehit
- **pH7** + 7,5mg jelatin + 18U GOD + % 1 glutaraldehit
- **pH7,4** + 7,5mg jelatin + 18U GOD + % 1 glutaraldehit
- **pH8** + 7,5mg jelatin + 18U GOD + % 1 glutaraldehit
- **pH8,5** + 7,5mg jelatin + 18U GOD + % 1 glutaraldehit

Bu biyosensörler için elde edilen pH'ların standart grafikleri karşılaştırılarak en uygun pH'ya karar verildi (Çalışma koşulları;25Mm K₃Fe(CN)₆ içeren, pH 5,5 50mM sitrat tamponu T:24°C, 0,5V).

3.5.6. Tripsin enziminin aktivitesine yönelik uygun sıcaklığın belirlenmesi

Biyosensör sisteminin geliştirilmesine yönelik tripsin enzim aktivitesi tayini için belirli sıcaklık derecelerinde ölçümler alınmıştır. İnkübasyon adımı 40dk, ve NaHCO₃ tamponunda gerçekleştirildi. Bu ölçümler aşağıdaki gibidir:

- **4°C** + 7,5mg jelatin + 18U GOD + % 1 glutaraldehit
- **24°C** + 7,5mg jelatin + 18U GOD + % 1 glutaraldehit
- **35°C** + 7,5mg jelatin + 18U GOD + % 1 glutaraldehit
- **45°C** + 7,5mg jelatin + 18U GOD + % 1 glutaraldehit

Tüm bu yapılan çalışmalar sonucunda tripsin aktivitesinin tayini için geliştirilen biyosensörün en uygun çalışma sıcaklığına karar verildi (Çalışma koşulları;25Mm K₃Fe(CN)₆ içeren, pH 5,5 50mM sitrat tamponu T:24°C, 0,5V).

3.6. Glukoz oksidaz biyosensörünün karakterizasyon çalışmaları

Tripsin aktivitesinin tayinine yönelik olarak geliştirilen biyosensör için gerçekleştirilen detaylı optimizasyon çalışmalarından sonra belirlenen optimum koşullarda karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bu çalışmalar aşağıda açıkça belirtilmiştir.

3.6.1 Biyosensörün lineer ölçüm aralıkları

Bu amaçla; optimize edilen immobilizasyon parametrelerine göre hazırlanan biyosensörlerle farklı tripsin konsantrasyonlarında ölçümler yapılarak, tripsin ölçüm aralıkları belirlendi. Ölçümler optimum koşullarda gerçekleştirildi.

3.6.2. Tekrarlanabilirlik

Bu biyosensör sisteminin tripsin enziminin aktivitesine karşılık verdiği yanıtlarının tekrarlanabilir olup olmadığının anlaşılması için belirlenen optimum koşullarda 10 ölçüm gerçekleştirildi. Bu ölçümlerden elde edilen veriler ışığında R^2 değerleri hesaplanarak yorumlandı.

3.6.3. Tekrar üretilebilirlik

GOD biyosensörünün farklı hazırlanma aşamalarında, elde edilen yanıtların bir birinden ne kadar saptığının belirlenmesi için biyosensörün tekrar üretilebilirlik denemeleri gerçekleştirildi. Buna yönelik olarak aynı optimum hazırlanma şartlarında ve aynı bileşimde 10 biyosensör hazırlanılarak tripsin aktivite standart grafikleri oluşturuldu. Bu standart grafiklere ilişkin doğrusal tayin aralıkları ve R^2 değerleri kıyaslanarak yorumlandı.

3.6.4. Elektrokimyasal impedans karakterizasyonu

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), sistemlerin kompleks elektriksel dirençlerini, yüzey hassasiyetlerini ve miktarlarındaki değişimleri analiz etmede kullanılan çok etkili ve kullanışlı bir metottür. Bu tez çalışmasında tripsin miktarına bağlı olarak elektrot yüzeyinde meydana gelen elektriksel değişim incelenmiştir.

3.6.5. Gerçek örnek denemesi

Gerçek serum örneğinde de uygun bulunan tüm optimizasyon şartları sağlanarak tayin işlemi yapıldı ve duyarlılığı tespit edildi.

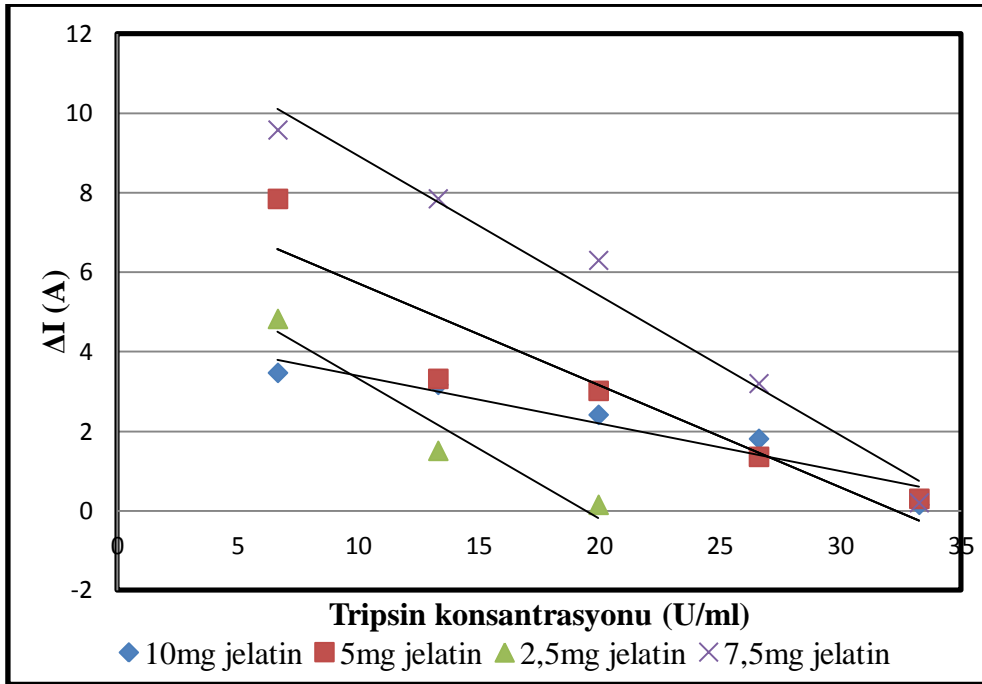
4.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Glukoz oksidaz biyosensörünün optimizasyon çalışmalarına ilişkin bulgular

4.1.1 Jelatin miktarının belirlenmesi

Biyosensör hazırlanmasında kullanılan jelatin miktarının tripsin aktivite tayinini nasıl etkilediği araştırılmıştır. Farklı miktarlardaki jelatin ile hazırlanan biyosensörlere ilişkin tripsin standart grafikleri Şekil4.1’de gösterilerek birbirleriyle kıyaslanmıştır.

Uygun jelatin miktarının bulunmasına yönelik yapılan çalışmalar sonucunda 4 farklı jelatin miktarı denenerek hazırlanan biyosensörlerin R^2 değerlerinin birbirinden farklı çıktığı gözlenmiştir. Tablo 4.1’de jelatin miktarı optimizasyonunun R^2 ve denklem sistemi görülmektedir.



Şekil 4.1.GOD biyosensörünün jelatin miktarının optimizasyonu (GOD aktivitesi ve glutaraldehit yüzdesi sırayla 18U GOD ve %1 olarak sabit tutulmuştur. Çalışma koşulları 50mM pH 5,5 sitrat tamponu T=24°C).

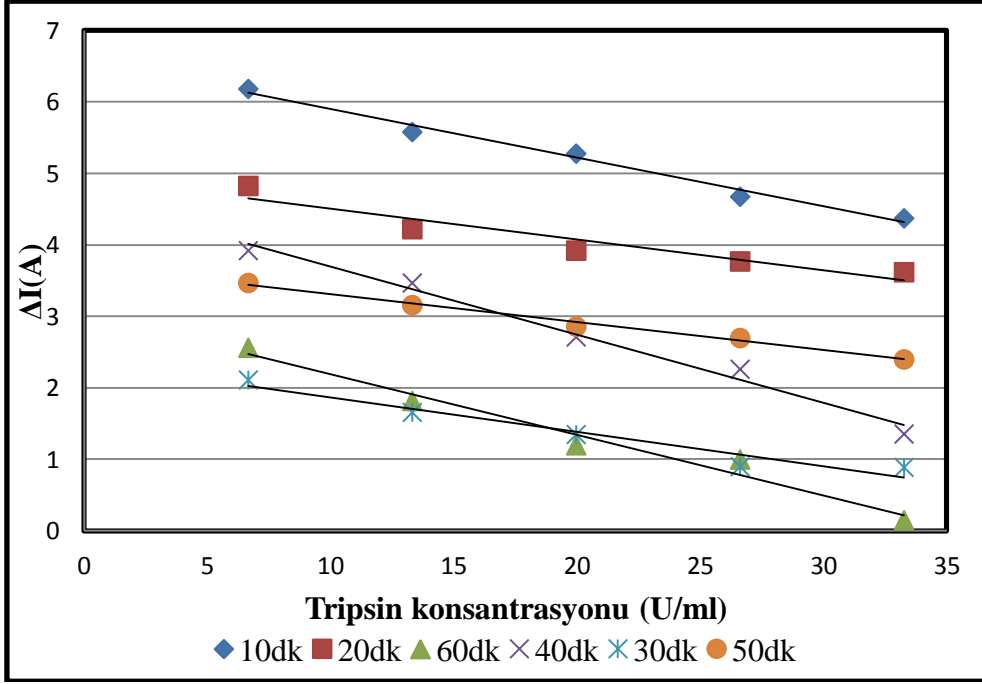
Tablo 4.1 Jelatin miktarı optimizasyonunun R^2 değerleri ve denklem sistemi

| Jelatin miktarı (mg) | R^2 | Denklem |
|----------------------|--------|-------------------------|
| 2,5 mg | 0,9446 | $y = -0,3517x + 6,8387$ |
| 5mg | 0,8698 | $y = -0,2565x + 8,2844$ |
| 7,5mg | 0,9758 | $y = -0,352x + 12,449$ |
| 10mg | 0,9204 | $y = -0,1203x + 4,6016$ |

Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde 2,5mg, 5mg ve 10mg jelatin ile çalışıldığında istenilen uygunluğa erişilemediği görülmüştür. 10mg jelatin ile hazırlanan biyosensörün istenilen düzeyde olmamasının sebebi jelatin miktarının arttırılmasına paralel olarak ortaya çıkacak olan difüzyon problemidir. 5mg jelatin ile hazırlanan biyosensörde biyoaktif tabakanın jelleşme zamanı çok uzun sürmüştür. 2,5mg jelatinle hazırlanan biyosensörde jelatin ile jelleşme tam olarak meydana gelememiştir. 7,5mg jelatinle hazırlanmış olan biyosensörün daha geniş bir doğrusal tayin aralığı sağladığı görülmüştür. Sonuç olarak doğrusal tayin aralığı, biyosensörün hazırlanma kolaylığı ve alınan sinyallerin büyüklüğünden dolayı en uygun jelatin miktarının 7,5mg olmasına karar verilmiştir.

4.1.2 Tripsin enziminin inkübasyon süresinin belirlenmesi

Bu tarz enzim çözeltisi çalışmalarında hazırlanan biyosensörün biyoaktif tabakasının çözelti içerisinde bekletilme süresinin önemi göz ardı edilmemelidir. Proteaz sınıfı enzimlerin parçalayıcı etkisinin olması nedeniyle uzun süre biyosensörün bekletilme koşulunda biyoaktif tabakanın bozunduğu ve uygun sürenin geçilmesi ile son ölçümlerin alınmadığı gözlenmiştir. Uygun inkübasyon süresinin bulunması amacıyla 4 farklı sensör hazırlanmış olup aynı koşullarda ölçüm alınmıştır.. Bu ölçümlerin grafikleri ve ortam koşulları şekil 4.2.'de belirtilmiştir. Grafikler sonucu elde edilen R^2 değerleri ve denklem sistemi tablo 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. GOD biyosensörünün tripsin enziminin inkübasyon süresinin optimizasyonu (GOD aktivitesi glutaraldehit yüzdesi ve jelatin miktarı sırayla 18U, %1 ve 7,5mg olarak sabit tutulmuştur. Çalışma koşulları 50mM pH 5,5 sitrat tamponu T=24°C).

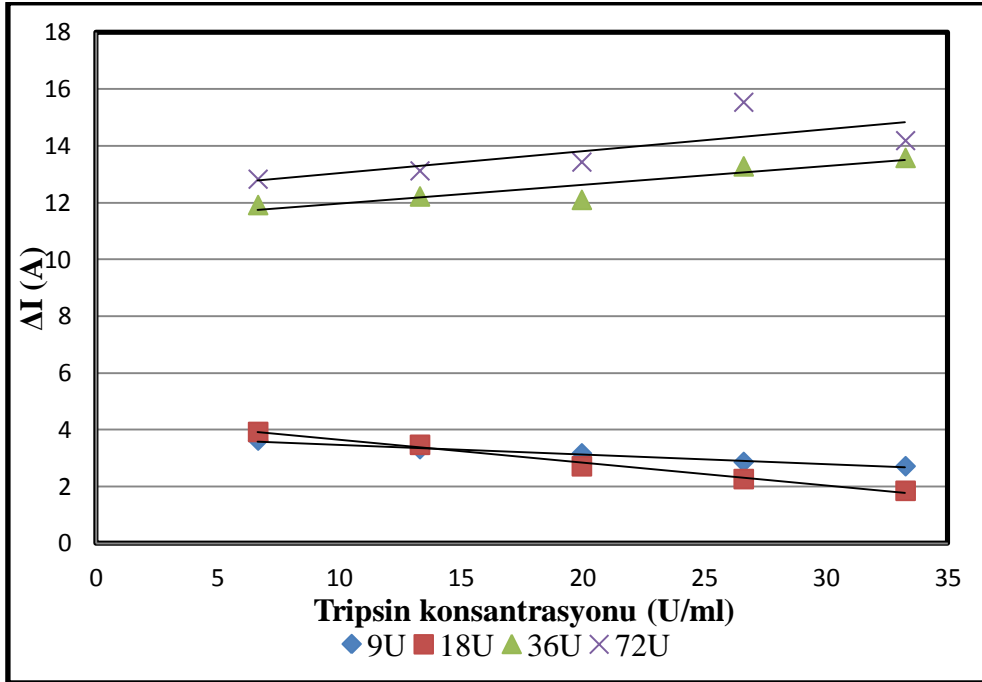
Tablo 4.2. Tripsin inkübasyon süresinin R² değerleri ve denlem sistemi

| İnkübasyon süresi (dk) | R ² | Denklemler |
|------------------------|----------------|-------------------------|
| 10dk | 0,9869 | $y = -0,068x + 6,5773$ |
| 20dk | 0,9024 | $y = -0,0431x + 4,9334$ |
| 30dk | 0,9455 | $y = -0,0482x + 2,3444$ |
| 40dk | 0,9865 | $y = -0,0953x + 4,6473$ |
| 50dk | 0,9995 | $y = -0,0391x + 3,698$ |
| 60dk | 0,9727 | $y = -0,0849x + 3,0408$ |

Yapılan süre denemelerinde en uygun süre 40dk olarak belirlenmiştir. Bu değer altındaki şartlarda(10dk+20dk+30dk) istenilen düzeye ulaşılammış yeterli bozunma gerçekleştirilememiştir. Üst değerlerde ise (50dk+60dk) uygun değerler çıkmasına karşın süreyi daha iyi kullanmak ve akım farklarının daha iyi gözlenmesi nedeniyle 40dk tercih edilmiştir.

4.1.3 Glukoz oksidaz aktivitesinin belirlenmesi

Çalışmanın bu kısmında tripsin enziminin aktivitesinin tayinine yönelik olarak geliştirilen glukoz oksidaz biyosensörünün, biyoaktif tabakasındaki glukoz oksidaz aktivitesinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Buna yönelik 4 farklı aktivitelere (U) glukoz oksidaz kullanılarak hazırlanan biyosensörlerle tripsine ilişkin standart grafikler oluşturulmuş ve karşılaştırılmıştır. Bu standart grafik Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. GOD biyosensörünün GOD konsantrasyonunun optimizasyonu (Glutaraldehit yüzdesi, jelatin miktarı sırayla %1 ve 7,5mg olarak sabit tutulmuştur. Çalışma koşulları 50mM pH 5,5 sitrat tamponu T=24°C ve 40dk inkübasyon).

Tablo 4.3 GOD konsantrasyon optimizasyonunun R² değerleri ve denklem sistemi

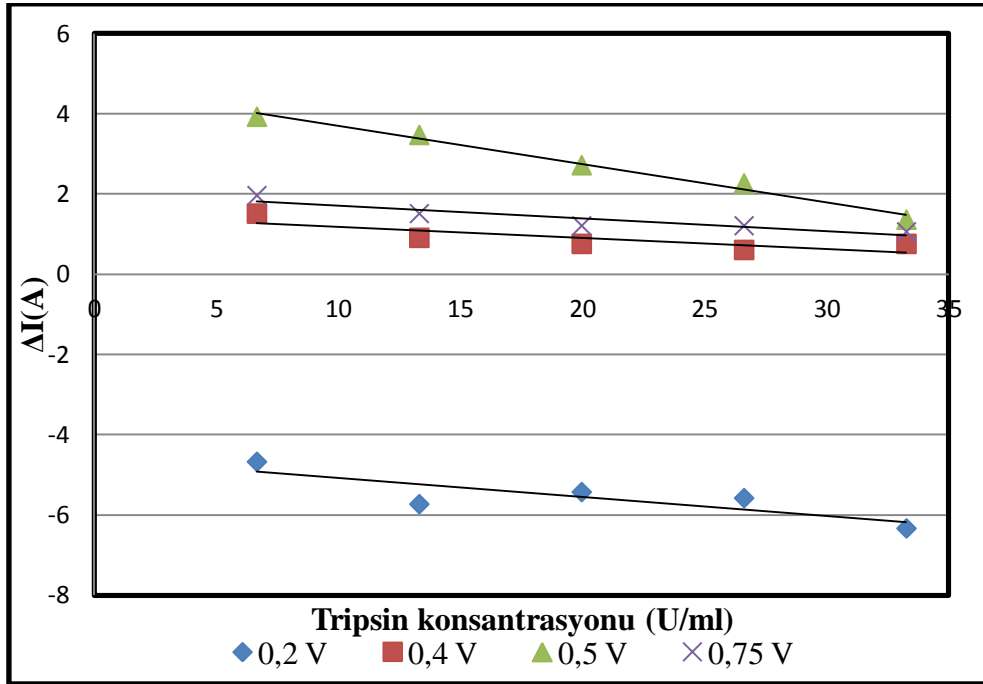
| GOD konsantrasyon (U) | R ² | DENKLEM |
|-----------------------|----------------|-----------------------|
| 9U | 0,9868 | y = -0,0805x + 4,4501 |
| 18U | 0,9887 | y = -0,034x + 3,817 |
| 36U | 0,843 | y = 0,0659x + 11,304 |
| 72U | 0,5594 | y = 0,0772x + 12,281 |

Yapılan etkileşimler incelendiğinde GOD aktivitesinin artırılması doğrusal tayin aralığının daralmasına neden olmuştur. Bununla birlikte GOD aktivitesinin azaltılması belli

bir değere kadar tayin derecesini etkilememiştir. 9U GOD ile hazırlanan biyosensörde gözlemlenen GOD aktivitesinin çok düşük aktivitelere tripsin tarafından açığa çıkarılan glukozu yeterince dönüşüme uğrattak düzeyde olmamasıdır. 18U'lık GOD ile biyosensör hazırlandığında tripsin için çizilen grafikte daha iyi R^2 elde edilmiştir. 36U ve 72U ile hazırlanan biyosensörlerde biyoaktif tabakanın olumsuz etkilenerek istenilen verimi vermemesi bu değerlerin uygun olmadığını göstermiştir. GOD optimizasyonunun R^2 değerleri ve denklem sistemi tablo 4.3.'te verilmiştir. Bu çalışma sonucunda 18U'lık GOD konsantrasyonuyla devam edilmiştir.

4.1.4 Uygun çalışma potansiyelin belirlenmesi

Kullanılan cihaz şartlarının uygunluğu da bu tarz çalışmalarda önem taşımaktadır. Uygun potansiyelin belirlenebilmesi için dört farklı potansiyel uygulaması yapıldı. Yapılan optimizasyon şartları da değerlendirilerek ve biyoaktif tabakanında bozunma durumu göz önüne alınarak aşamalar gerçekleştirildi. Denenen potansiyel değerleri ve biyoaktif tabakaya etkisi şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. GOD biyosensörünün potansiyel optimizasyonu (Glutaraldehit yüzdesi, jelatin miktarı ve GOD konsantrasyonu sırayla %1, 7,5mg ve 18U olarak sabit tutulmuştur. Çalışma koşulları 50mM pH 5,5 sitrat tamponu T=24°C).

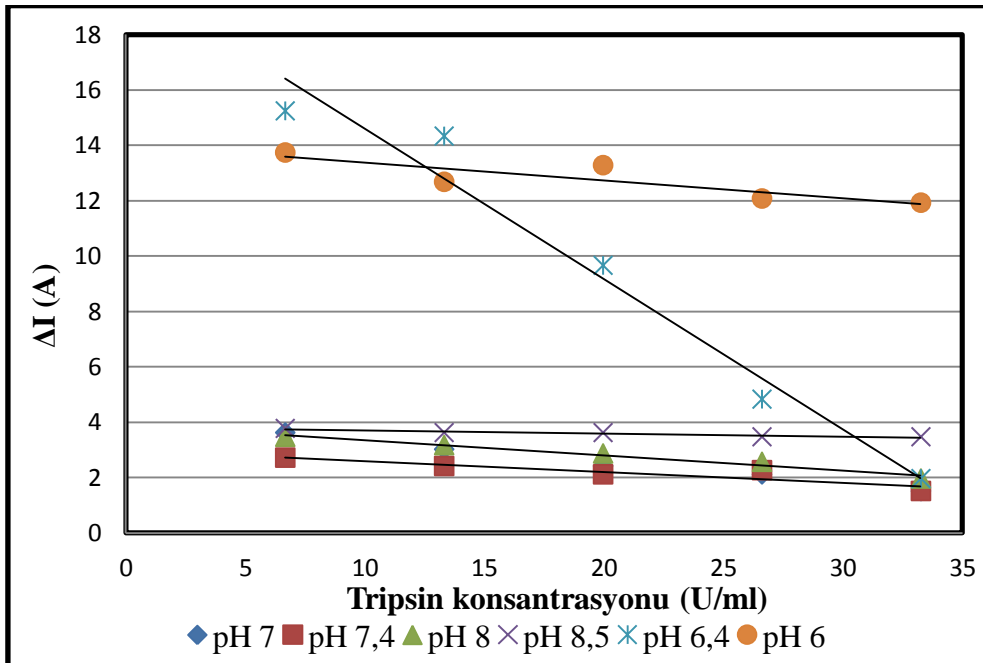
Tablo 4.4 Çalışma potansiyeli optimizasyonunun R² değerleri ve denklem sistemi

| Potansiyel (V) | R ² | Denklem |
|----------------|----------------|-----------------------|
| 0,2 | 0,7022 | y = -0,0477x - 4,6013 |
| 0,4 | 0,6545 | y = -0,0272x + 1,4486 |
| 0,5 | 0,9865 | y = -0,0953x + 4,6473 |
| 0,75 | 0,8599 | y = -0,0318x + 2,0216 |

Tablo 4.4’te potansiyel optimizasyonunun R² değerleri ve denklem sistemi verilmiştir. Yapılan uygulamalar sonucunda en iyi potansiyel çalışmasının 0,5 olduğu gözlemlendi. Daha düşük değerlerde eksi akımlara geçildiği ve yüzeyin olumsuz etkilendiği daha yüksek değerlerde ise akım farkında istenilen düzeye ulaşamadığı gözlemlenmiştir.

4.1.5 Enzim aktivitesi için uygun tampon pH’nın belirlenmesi

Biyosensörün performansının iki farklı enzimle bağlantılı olması bir optimum pH çalışmasını gerekli kılmıştır. GOD için optimum pH 5,1 tripsin için optimum pH 7,8 olarak karşımıza çıkmaktadır. Çalışma tamponunun nitelikleri, ölçüm sistemi ve benzeri parametrelerdeki değişiklikler nedeniyle önemli bir sebep haline gelmektedir.



Şekil 4.5. GOD biyosensörünün enzim tamponu pH optimizasyonu (Glutaraldehit yüzdesi, jelatin miktarı ve GOD konsantrasyonu sırayla %1, 7,5mg ve 18U olarak sabit tutulmuştur. Çalışma koşulları 50mM pH 5,5 sitrat tamponu T=24°C).

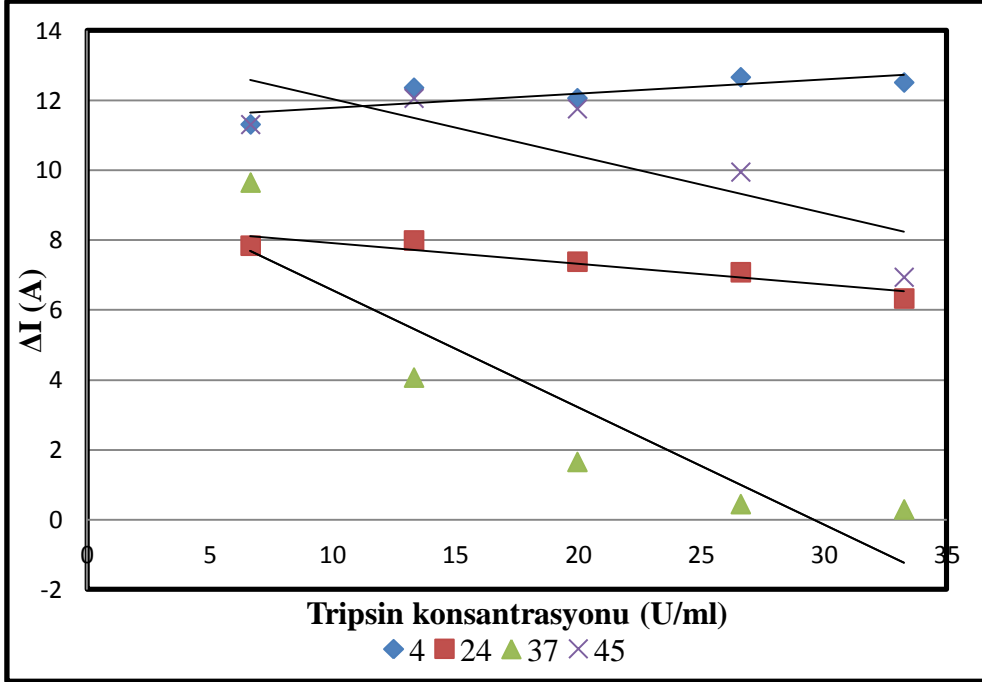
Tablo 4.5 NaHCO₃ tampon pH optimizasyonu R² değerleri ve denklem sistemi

| Enzim tamponu (pH) | R ² | Denklem |
|--------------------|----------------|-----------------------|
| 6 | 0,746 | y = -0,0635x + 14,004 |
| 6,4 | 0,9666 | y = -0,5422x + 20,021 |
| 7 | 0,9898 | y = -0,0772x + 4,0742 |
| 7,4 | 0,8218 | y = -0,0385x + 2,9713 |
| 8 | 0,9729 | y = -0,0545x + 3,8923 |
| 8,5 | 0,8927 | y = -0,0114x + 3,8172 |

Uygun pH'nın belirlenmesi için yapılan bu çalışmaların grafikleri şekil 4.5'te verilmiştir. Bu grafikler sonucunda elde edilen R² değerleri ve denklem sistemi tablo 4.5'te görölmektedir. En iyi biyosensör cevabı pH 7 olan tamponla elde edilmiştir. Bu aşamaya kadar yapılan çalışmalarda pH 8 NaHCO₃ tamponu kullanılmıştı. pH değişimine bağlı olarak aktivitedeki değişimin nedeni, uygun pH'dan daha asidik veya daha bazik değerlere doğru gidildikçe GOD'nin optimum pH'sına yaklaşırken tripsinin optimum pH'ından uzaklaşması veya tam tersi durumdur. Bu durum ciddi anlamda aktivite kaybına sebep olmaktadır.

4.1.6. Enzim aktivitesi için uygun sıcaklık belirlenmesi

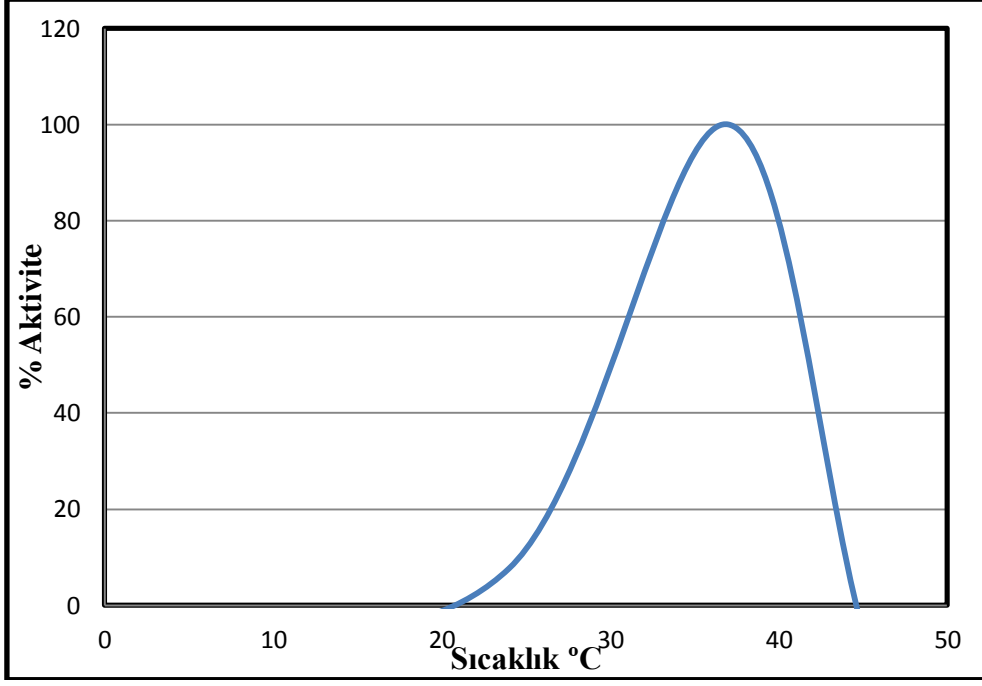
Yapılan bu tarz çalışmalarda biyosensörlerin performanslarının ve kararlılıklarının sıcaklıkla nasıl etkilenebileceği iyi bilinmektedir. Bu sebepten en uygun çalışma sıcaklığının belirlenmesi kısa ve uzun vadede hem biyosensörün performansının hem de kararlılıklarının korunması açısından büyük önem arz etmektedir. Bu çalışmada sıcaklığın belirlenmesi, iki enzimle birlikte çalışılması nedeniyle ayrı bir önem taşımaktadır. Aktivitesi tayin edilecek olan tripsin ve biyosensörde immobilize edilmiş olan GOD için ortak uygun bir çalışma sıcaklığı saptamak çok önemlidir.



Şekil 4.6. GOD biyosensörünün sıcaklık optimizasyonu (Glutaraldehit yüzdesi, jelatin miktarı ve GOD konsantrasyonu sırayla %1, 7,5mg ve 18U olarak sabit tutulmuştur. Çalışma koşulları 50mM pH 5,5 sitrat tamponu).

Tablo 4.6. Sıcaklık optimizasyonu R^2 değerleri ve denklem sistemi

| Sıcaklık (°C) | R^2 | Denklem |
|---------------|--------|-------------------------|
| 4°C | 0,6378 | $y = 0,0406x + 11,378$ |
| 24°C | 0,8767 | $y = -0,0591x + 8,5122$ |
| 37°C | 0,8267 | $y = -0,3358x + 9,9273$ |
| 45°C | 0,6684 | $y = -0,1631x + 13,663$ |



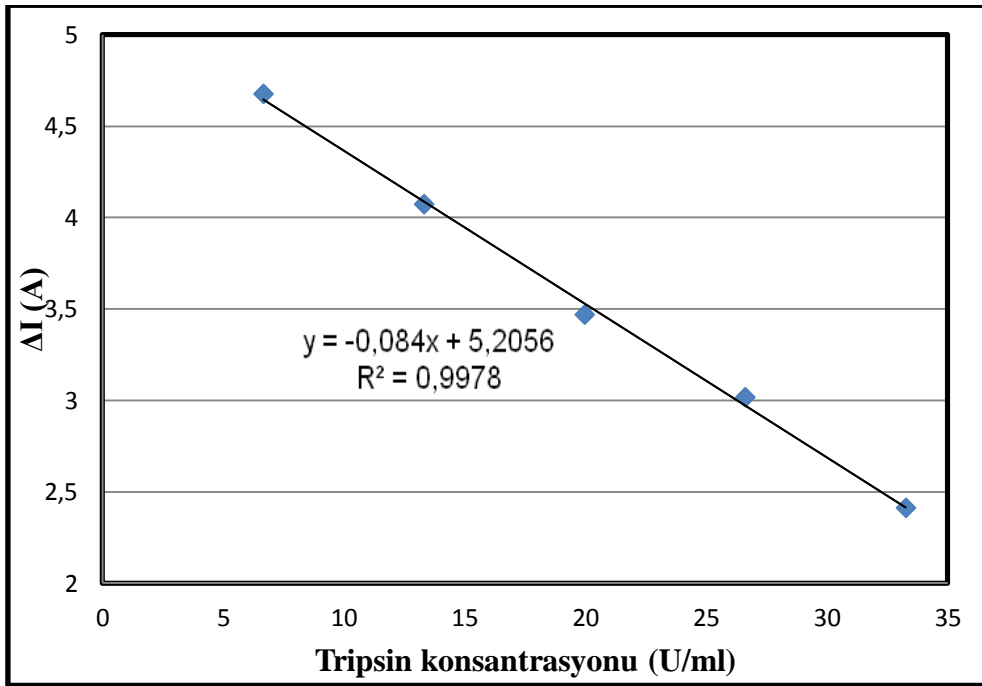
Şekil 4.7 Biyosensörün optimum sıcaklığı

Şekil 4.6'da sıcaklık optimizasyonu için elde edilen değerlerin grafiği görülmektedir. Tablo 4.6'da bu grafiklerin R^2 değerleri ve denklem sistemi belirtilmiştir. Şekil 4.7 'de görüldüğü gibi biyosensör cevabı belli bir sıcaklığa kadar artış göstermektedir. 37°C'den sonra düşmeye başlamıştır. Bunun sebebi substratın yüksek sıcaklıkta bozunabileceği durumlar haricinde biyosensörde immobilize halde olan enzimin optimum sıcaklıktan uzaklaşmasından kaynaklanmaktadır. Enzim içeren sistemlerde 37°C üstü yüksek sıcaklıklarda çalışmak yarı ömürleri oldukça düşürebileceğinden tercih edilmez.

4.2. Glukoz oksidaz biyosensörünün karakterizasyon çalışmaları

4.2.1 GCE-GOD biyosensörünün lineer kalibrasyon grafiği

Bu amaçla; optimize edilen immobilizasyon parametrelerine göre hazırlanan biyosensörlerle farklı tripsin konsantrasyonlarında ölçümler yapılarak, tripsin ölçüm aralıkları belirlendi. Ölçümler optimum koşullarda gerçekleştirildi. Ölçüm sonuçlarına bakılarak R^2 değerlerine göre enzimin 6,65 U/ml – 33,25 U/ml konsantrasyon aralığında lineer grafiği şekil 4.8’de belirtilmiştir.



Şekil 4.8.GCE-GOD biyosensörünün kalibrasyon grafiği

4.2.2. GCE-GOD biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları

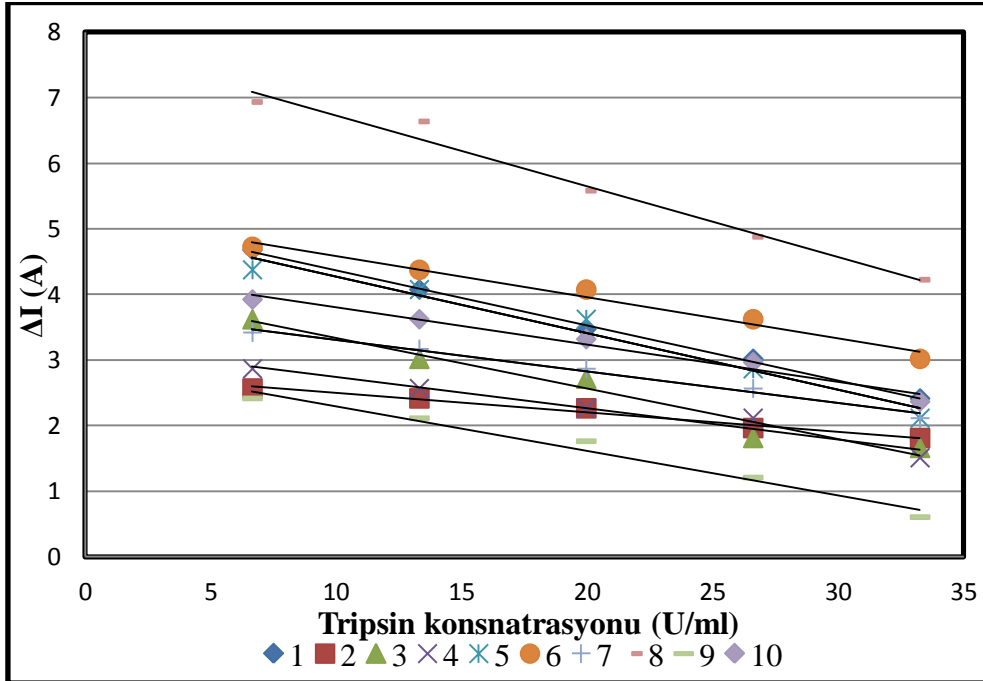
Bütün basamakların optimizasyon koşulları sağlandıktan sonra uygun konsantrasyonlar ve zamanlarda tekrarlanabilirlik sonuçları alındı. Sonuçlara göre biyosensörün tekrarlanabilir bir sistem olduğu anlaşılmaktadır. Geliştirilen biyosensörün üç farklı tripsin konsantrasyonu için standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı ve tablo 4.7’de verilmiştir. Elde edilen bulgular, geliştirilen biyosensörün tripsin aktivitesinin tayini için, oldukça uygun bir yöntem olabileceğini göstermiştir.

Tablo 4.7. Tripsinin üç farklı konsantrasyonu için hesaplanan ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayı değerleri

| Tripsin Konsantrasyonu (U/ml) | Ortalama Değer (Xi) (U/ml) | Standart Sapma (Ss) (U/ml) | Varyasyon Katsayısı (C.V) (%) |
|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| 6,65 U/mL | 6,99 U/mL | ±0,58 U/mL | % 8,29 |
| 19,95 U/mL | 21,55 U/mL | ±1,78 U/mL | % 8,25 |
| 33,25 U/mL | 31,1 U/mL | ±2,65 U/mL | % 8,52 |

4.2.3. GCE-GOD biyosensörünün tekrar üretilebilirliği

Biyosensörde sahip olunması istenen en önemli özelliklerden biride onun tekrar aynı doğrulukta ölçümlere olanak verecek şekilde hazırlanabiliyor olmasıdır. Biyosensörün tekrarlanabilirliğinin kabul edilebilir olması onun tekrar üretilebilirliğinde mümkün olduğunun bir ölçüsü değildir. Bu çalışmada geliştirilen biyosensörün her hazırlanışta ne kadar birbirine yakın sonuçlar alınabileceği incelenmiştir.Yapılan ölçümlerin grafiği şekil 4.9’da verilmiştir.Grafiklerden alınan değerlerin R^2 ve denklem sistemi tablo 4.8’de belirtilmiştir.



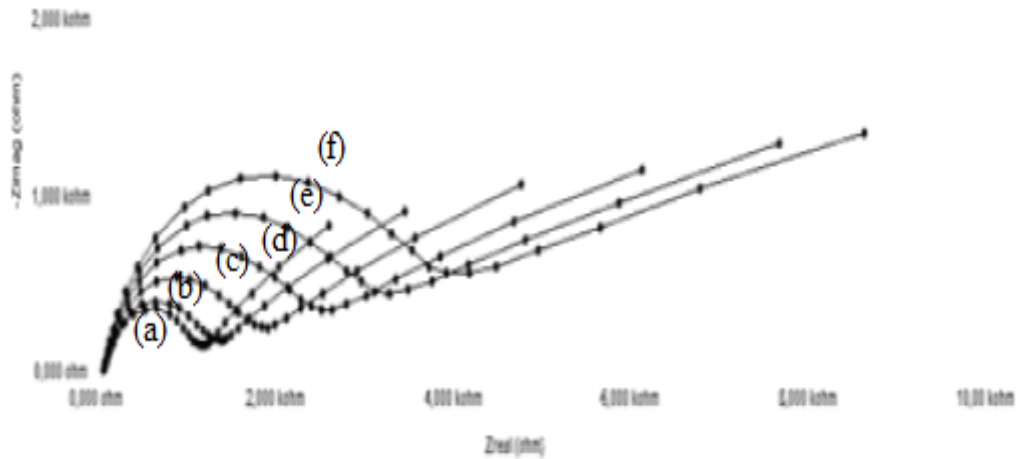
Şekil 4.9. Tekrar üretilebilirlik çalışması için hazırlanmış olan 10 biyosensörün grafiği

Tablo 4.8. Tekrar üretilebilirlik çalışmasının R^2 değerleri ve denklem sistemi

| Tekrar üretilebilirlik | R^2 | Denklem |
|------------------------|--------|-------------------------|
| 1 | 0,9978 | $y = -0,084x + 5,2056$ |
| 2 | 0,9828 | $y = -0,0295x + 2,7914$ |
| 3 | 0,9635 | $y = -0,0771x + 4,1037$ |
| 4 | 0,9684 | $y = -0,0476x + 3,213$ |
| 5 | 0,9678 | $y = -0,0862x + 5,1298$ |
| 6 | 0,98 | $y = -0,0627x + 5,2142$ |
| 7 | 0,9874 | $y = -0,0483x + 3,7909$ |
| 8 | 0,9804 | $y = -0,108x + 7,8055$ |
| 9 | 0,9771 | $y = -0,068x + 2,9773$ |
| 10 | 0,9751 | $y = -0,0567x + 4,3697$ |

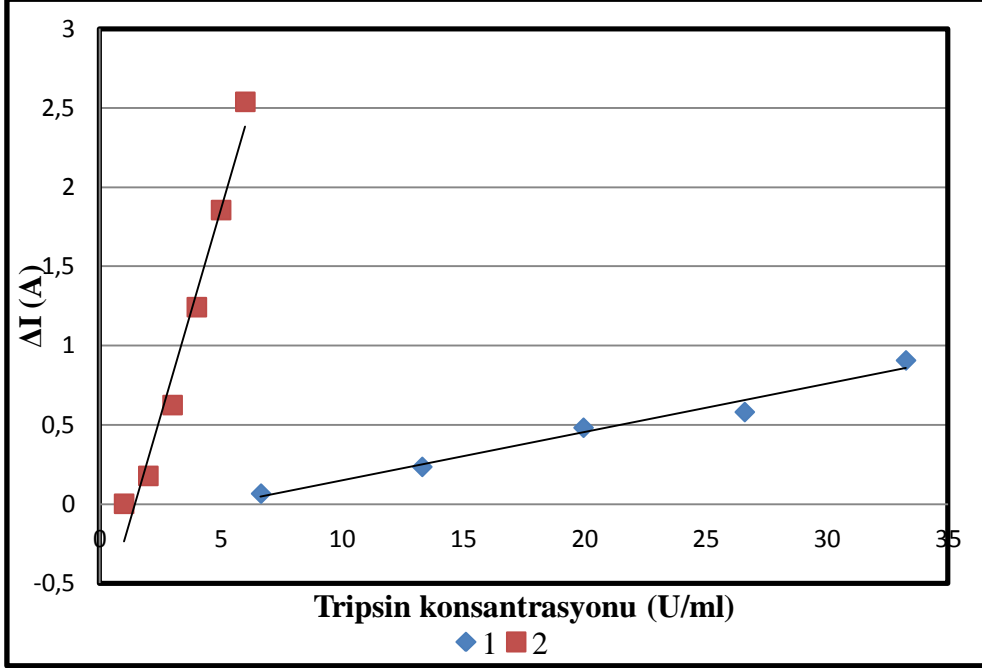
4.2.4. İmpedans denemeleri

İmpedans spektroskopisi, yüzeyi modifiye edilmiş elektrotların elektriksel özelliklerinin ölçülmesi için etkin bir yöntemdir. Ancak geniş bir frekans aralığında bütün impedans spektrumunun taranması zaman alıcıdır. Bundan dolayı impedimetrik teknikler, enzim temelli bir biyosensörün karakterizasyonu için kullanılmaktadır.



Şekil 4.10. EIS ölçümü , hazırlanan tripsin çözeltisinden (a) 5µl tripsin (b) 10µl tripsin (c) 15µl tripsin (d) 20µl tripsin (e) 25µl tripsin eklenerek alınmıştır.

Şekil 4.10'da tripsin miktarına bağlı olarak sinyalin arttığını gözlemliyoruz. Bunun sebebi yüzey bozulmasına karşı difüzyonun etkisidir. Şekil 4.11'de iki sensörün EIS grafiği görülmektedir. Bu grafiğe göre elde edilen R^2 değerleri ve denklem sistemi tablo 4.9'da belirtilmiştir.



Şekil 4.11. İki aynı biyosensörde impedans denemelerinin grafiği

Tablo 4.9. İmpedans denemelerinin R^2 değerleri ve denklem sistemi

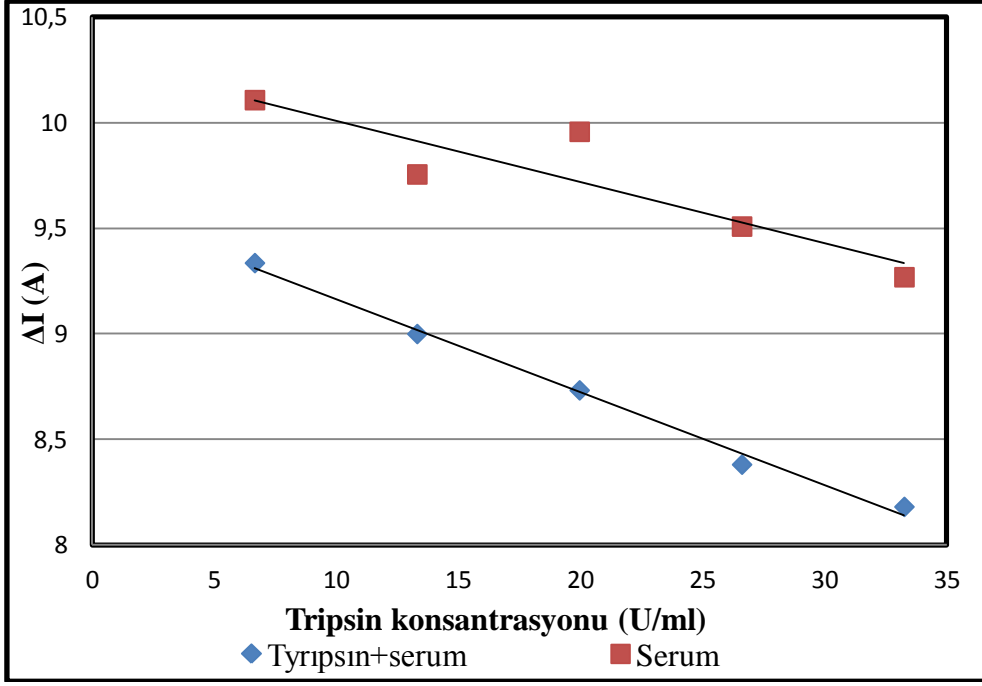
| İmpedans sırası | R^2 | Denklem |
|-----------------|--------|------------------------|
| 1 | 0,9724 | $y = 0,5239x - 0,7619$ |
| 2 | 0,9778 | $y = 0,0305x - 0,1562$ |

4.2.5 Gerçek örnek

Bu yüksek lisans tezinin son kısmını tripsin aktivitesinin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün gerçek örnekte tripsin aktivitesinin belirlenmesi oluşturmaktadır.

Bu aşamada biyosensör iki çözeltide bekletilerek hazırlanmıştır:

- 1.biyosensör = Serum + Tripsin çözeltisi
- 2.biyosensör = Serum + Tampon çözeltisi içerisinde uygun optimizasyon şartları sağlanarak aynı şekilde ölçümler alınıp karşılaştırma yapıldı.



Şekil 4.12. Gerçek örneklerle yapılan denemelerin grafiği

Tablo 4.10. Gerçek örnek denemelerinin R^2 değerleri ve denklem sistemi

| Gerçek örnek | R^2 | Denklem |
|-----------------|--------|-------------------------|
| Tripsin + serum | 0,9938 | $y = -0,044x + 9,6049$ |
| Serum | 0,8119 | $y = -0,0289x + 10,298$ |

Birinci çalışmada beş tripsin çözeltisi konsantrasyonu için 100µl serum içinde toplam hacim 1ml olacak şekilde (pH 8,5, ve 50 mM NaHCO₃ tamponu) 40dk inkübasyona bırakıldı. Her bir sürenin sonunda 1M'lık 60µl glukoz eklenerek tekrar kronoamperometrik ölçüm alındı.

İkinci çalışmada ise sadece serum örneği kullanıldı. Serum örneğinden 100µl, 200µl, 300µl, 400µl, 500µl alınarak (pH 8,5, ve 50 mM NaHCO₃ tamponu) toplam hacim 1ml olacak şekilde 40dk inkübasyona bırakıldı. Her bir sürenin sonunda 1M'lık 60µl glukoz eklenerek tekrar kronoamperometrik ölçüm alındı. Şekil 4.12'de gerçek örnek denemelerinin grafiği görülmektedir. Bu grafiklerden yararlanarak hesaplanan R^2 değerleri ve denklem sistemi Tablo 4.10'da belirtilmiştir. Gerçek serum örneklerinde yapılan çalışmalarda tripsin enziminin kanda aktif olarak bulunduğu gözlemlendi.

5.SONUÇ

Biyosensörler, analiz edilecek maddenin biyosensör yüzeyindeki biyokomponentle etkileşime girmesi sonucu transduser yüzeyinde analit miktarıyla orantılı bir sinyalin oluşumu ve bu sinyalin ölçüm cihazına iletilmesi ilkesine dayanır. Biyosensörlerde biyokomponent olarak enzimler, mikroorganizmalar, bitkisel ve hayvansal dokular, reseptörler, antikorlar ve nükleik asitler kullanılabilir.

Analiz edilecek moleküle uygun olarak bir biyokomponent ve analitin dönüşümü sonucunda oluşan elektrokimyasal, optik ya da gravimetrik sinyali elektriksel sinyale çeviren uygun bir dönüştürücü seçilmelidir. Biyosensör sistemlerinde en büyük sorunlardan biri biyolojik materyali en uygun şekilde immobilize etmeyi başarmaktır. İmmobilizasyon adımı biyolojik materyalin yaşam ve kullanım süresini akıbetinde biyosensörün kullanım ve yaşam ömrünü belirler. İdeal bir immobilizasyon sisteminin seçimi ile hazırlanan biyosensör sistemlerinden son yıllarda ticari alanda da geniş çapta yararlanılmaktadır.

Yaşayan bütün organizmalar proteazlara fizyolojik olarak gerek duydukları için, bu enzim bitkiler hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi kaynaklardan elde edilebilmektedir. Tripsin, pankreastan salgılanan, ince bağırsakta proteinlerin sindiriminden sorumlu olan ana enzimdir. Tripsin bir serin proteazdır ve peptit bağlarını lizin ve arginin kalıntılarından sonra gelen karboksil gruplarından hidrolizler.

Tez çalışmam sonucunda tripsin aktivitesi tayini için spesifik ekonomik ve duyarlı bir biyosensör geliştirildi. Tripsin GOD biyoaktif tabakasını hidrolizleyerek enzim aktivitesiyle doğru orantılı aktivite kaybına neden olmuştur.

Geşiltirilen biyosensör EIS ve kronoamperometride olumlu sonuçlar oluşturmuştur. Kronoamperometrik ölçümde tripsin yüzeyi bozduğundan sinyal azalmaktadır. Bu sebeple EIS de yüzey bozulması difüzyona neden olduğundan sinyallerde artış göstermektedir.

Geliştirdiğimiz enzim temelli biyosensörde, GOD jelatin ve glutaraldehit ile GCE yüzeyine immobilize edildi. Geliştirdiğimiz biyosensörün biyoaktif tabakasının ve çalışma koşullarının optimizasyon çalışmaları yapıldı. Bu çalışmalar sonunda;

- I. Uygun jelatin miktarı:7,5mg
- II. Biyosensörün inkübasyon süresi:40dk
- III. GOD konsantrasyonu:18U
- IV. Cihazın uygun potansiyel miktarı: 0,5V
- V. Bekletilecek enzim çözeltisinin pH 7 (NaHCO₃)
- VI. Ortam sıcaklığı:37°C olarak uygun görülmüştür.

Yapılan karakterizasyon çalışmalar sonucunda geliştirdiğimiz biyosensörün hem tekrarlanabilir ve tekrar üretilebilir sonuçlar verdiği hem de duyarlılığının iyi olduğu gözlenmiştir.

6.KAYNAKLAR

- Anonim“Endoproteases”
http://www.nature.com/nature/journal/v459/n7245/box/nature08146_BX1.html (2011)
- Anonim “Trypsin” <http://en.wikipedia.org/wiki/Trypsin> (2011)
- Anonim “Pepsin” <http://en.wikipedia.org/wiki/Pepsin> (2011)
- Anonim www.chem.ch.huji.ac.il (erişim tarihi 10.07.2014)
- Anwar, A., Saleemuddin M., “Alkaline proteases: a review”, *Bioresource Technology*, 64: 175-183 (1998).
- Burtis, C. A., Ashwood, E. R. *Klinik Kimyada Temel İlkeler* 5.baskı D. Aslan, Palme Yayıncılık, Ankara, 159-160 (2007)
- Cahn, T.M. 1993, *Biosensors*, Chapman and Hall ISBN 0-412-48190-1, London, 211p.
- Devlin, T. M., “Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, 6th ed.“, Wiley-Liss pub., Hoboken, 367, 390 (2006).
- Demirjian, D. C., Morís-Varas,F., Cassidy, C., “Enzymes from extremophiles” *Current Opinion in Chemical Biology*, , 5: 144–151 (2001).
- Espesito, E., Cortesi, R., Nastrazzi, C., Gelatin microspheres: influence of preparation parameters and thermal treatment on chemico-physical and biopharmaceutical properties, *Biomaterials*, 20, 2009-2020, (1995)
- Conway, T. W., Spector, A. A., “Biyokimya Olgu Sunumlu Yaklaşım 6. baskı”, N., Altan, Palme Yayıncılık, Ankara, 74 (2000).
- Gerard, M. Chaubey, A. Malhotra, B.D. 2002, Application of conducting polymers to biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*. 17, 345-359.
- Gupta, R., Beg, Q. K., Lorenz, P., “Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications”, *Appl Microbiol Biotechnol* 59: 15– 32 (2002).
- Grudkowska M., Zagdańska B., “Multifunctional role of plant cysteine proteinases”, *Acta Biochimica Polonica*, 51(3): 609-624 (2004).
- Harem, M. K., “Mast Hücre Proteazları ve Biyolojik Önemi”, *Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences)*, 14(1): 61-67, (2005).
- HSDB. Hazardous Substances Data Bank. National Library of Medicine, Bethesda, MD (TOMES CD-ROM Version). Denver, CO: Micromedex, Inc. (1996)

- Ito, S., Kobayashi, T., Ara, K., Ozaki, K., Kawai, S., Hatada, Y., "Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures" *Extremophiles*, 2: 185-190 (1998).
- Kapoor, M., How to cross-link proteins, Cellular, Molecular and Microbial Biology Division, University of Calgary, Calgary, Canada, T2N 1N4, (1996)
- Koolman, J., Roehm, K. H., "Color Atlas of Biochemistry, 2nd ed", Thieme, Stuttgart, 151 (2005)
- Kumar, C.G., Takagi, H., "Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint", *Biotechnology advances*, 17: 561-594 (1999).
- Ling, W.F. 2008, Enzyme immobilization and permselectivity analysis of an interference free peroxide based glucose biosensor, Master Thesis, Universiti Teknologi Malaysia Faculty of Chemical and Natural Resource Engineering, Johor, 126p.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W., "Harper"ın Biyokimyası, 24. Baskı", Barış Kitabevi, İstanbul, 68-69 (1998).
- Montgomery, R., Conway, T. W., Spector, A.A., "Biyokimya Olgu Sunumlu Yaklaşım 6. Baskı", N., Altan, Palme Yayıncılık, Ankara, 74 (2000).
- Nelson, D. L., Cox, M. M., "Biyokimyanın İlkeleri, 3.baskı", N. Kılıç, Palme Yayıncılık, Ankara, 115, 244-246, 266 (2005).
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., Antranikian, G., "Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application", *Appl Microbiol Biotechnol* 51: 711-729 (1999).
- Norouzian, D. 2003, Enzyme Immobilization: the state of art in biotechnology, *Iranian Journal of Biotechnology*. 1(4), 197-206.
- Odacı, D., Timur, S., Telefoncu, A., Immobilized Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*) Tissue Electrode for Phenol Detection, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 32, 2, 315-323, (2004)
- Onat T, Emerk, K., "Temel Biyokimya", Saray Medikal Yayıncılık, İzmir 785-802 (1997)
- Otin, C. L., Bond, J. S., "Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease", *The Journal of Biological Chemistry*, 283(45): 30433-30437 (2008).
- Powers, J. C., Asgian, J. L., Dogan Ekici, O., and James, K. E., "Irreversible Inhibitors of Serine, Cysteine, and Threonine Proteases", *Chem. Rev.* 102: 4639-4750 (2002)
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., and Deshpande, V. V., "Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases", *Microbiology and Molecular Biology reviews*, 62(3): 597-635 (1998).

- Rawlings N. D., Morton, F. R., and Barrett, A. J. "An Introduction to Peptidases and the MEROPS Database" *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications* Springer, Dordrecht, 161-171 (2007).
- Rose, P.J. Mark, H.F., Bikales, N.M., Overberger, C.G., Menges, G., Kroschwitz, J.I., *Encyclopedia of polymer science and engineering*, vol.7, Wiley Interscience, New-York. 89, (1987).
- Scheller, F. and Florian, S. 1992, *Biosensors*, Elsevier ISBN 0-444-98783-5, Amsterdam, 353p.
- Sezgintürk, M.K., Göktuğ, T., Dinçkaya, E., Detection of benzoik asit by an amperometric inhibitor biosensor on mushroom tissue homogenate, *Food Technol. Biotechnol.* 43 (4), 329-334, (2005)
- Sookkheo, B., Sinchaikul, S., Phutrakul, S., and Chen, S.T., "Purification and Characterization of the Highly Thermostable Proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33", *Protein Expression and Purification* 20: 142– 151 (2000).
- Telefoncu, A. 1997, *İmmobilize enzimler*, *Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu Kitabı*,(Ed. Azmi Telefoncu) 183-196, Ege Üniversitesi yayımları.
- Telefoncu, A. 1999, *Mikrobiyal Biyosensörler*, *Biyosensörler* (Ed.AzmiTelefoncu)178-185, Ege Üniversitesi yayımları.
- Thomas, S. Russell, A.D. Temperature-Induced Changes in the Sporicidal Activity and Chemical Properties of Glutaraldehyde, *Applied Microbiology*, 28(3), 331-335, (1974)
- Timur, S., Pazarlıoğlu, N., Pilloton, R., Telefoncu, A., 2003, Detection of phenolic
- Türk, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects, *Nature Reviews*, 5: 785-799 (2006).
- Tong, L., "Viral Proteases", *Chem. Rev.*, 102: 4609–4626 (2002).
- Wang, J. 1999, Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 19, 47–53.

ÖZGEÇMİŞ

Belfin IŞIK, 1989 yılında Adana'nın Yüreğir ilçesinde dünyaya gelmiştir. Lise öğrenimini Güngören İzzet Ünver Lisesi'nde 2007 yılında tamamladıktan sonra, 2008 yılında başladığı Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Kimya Bölümünden 2012 yılında mezun olmuştur. Aynı yıl Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır.