

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YENİ ENZİM POLİMER KONJUGATLARINA DAYALI GLUKOZ BİYOSENSÖRÜ
HAZIRLANMASI VE UYGULAMALARI**

GÖKAY VARDAR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. MELDA ALTİKATOĞLU YAPAÖZ**

İSTANBUL, 2014

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YENİ ENZİM POLİMER KONJUGATLARINA DAYALI GLUKOZ BİYOSENSÖRÜ
HAZIRLANMASI VE UYGULAMALARI

Gökay VARDAR tarafından hazırlanan tez çalışması 23.12.2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Melda ALTİKATOĞLU YAPAÖZ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Melda ALTİKATOĞLU YAPAÖZ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Sevil YÜCEL
Yıldız Teknik Üniversitesi

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarımnda bilgi ve deneyimi ile bana yol gösteren, karşılaştığım her türlü sorunu ilgi ve sabırla dinleyip çözümlerini esirgemeyen, akademik çalışma hayatımda ilerleyebilmem için bana her zaman destek olan, kendisinden çok şey öğrendiğim ve saygı duyduğum değerli hocam Sayın Doç. Dr. Melda ALTİKATOĞLU YAPAÖZ'e içtenlikle teşekkür ederim

Biyomühendislik laboratuvarlarında çalışma imkanı sunarak bu tezin ortaya çıkmasında büyük katkıları olan, tez çalışmamda bilgi ve deneyimi ile bana yol gösteren, her zaman destek olan Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölüm Başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. İbrahim IŞILDAK'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvarında çalışma imkanı sunan Biyomühendislik Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Sevil YÜCEL'e teşekkürlerimi sunarım,

Tez çalışmasının yürütülmesinde ve tamamlanmasında her türlü destek ve katkılarını esirgemeyen Araş. Gör. Yeliz BAŞARAN ELALMIŞ, Biyomühendislik Bölümü Doktora Öğrencisi Özlem ÖZTOLAN TAVUKÇUOĞLU, Araş. Gör. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI'na teşekkürlerimi sunarım,

Yıldız Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü'nde bulunan diğer yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma teşekkür ederim,

Hayatım boyunca aldığım kararlarda her zaman yanımda olan ve yüksek lisans eğitimim boyunca maddi, manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme çok teşekkür ederim.

Aralık, 2014

Gökay VARDAR

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	vii
KISALTMA LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	1
1.3 Hipotez	2
BÖLÜM 2	
BIYOSENSÖRLER, ENZİMLER, POLİETİLEN GLİKOL, DEKSTRAN	4
2.1 Biyosensörler	4
2.1.1 Biyosensörler Yapısı ve Fonksiyonu	5
2.1.2 Biyokomponentler (Biyoreseptörler)	7
2.1.3 Fiziksel Komponentler (Transduserler).....	7
2.1.4 Biyosensörlerin Avantajları.....	7
2.1.5 Biyosensörlerin Dezavantajları	7
2.1.6 Elektrokimyasal Biyosensörler.....	8
2.1.6.1 Potansiyometrik Biyosensörler	8
2.1.6.2 Amperometrik Biyosensörler	9
2.1.6.3 Optik Biyosensörler	9
2.1.6.4 Kalorimetrik Esaslı Biyosensörler	10
2.1.6.5 Piezoelektrik Biyosensörler	10

2.1.7	Glukoz Biyosensörü	11
2.1.8	Biyosensörlerin Başlıca Kullanım Alanları.....	12
2.1.9	Biyosensörlerin Performans Kriterleri	12
2.2	Enzimlere Giriş	13
2.2.1	Enzimlerin Sınıflandırılması	15
2.2.2	Enzimler Nasıl Çalışır?	16
2.2.3	Glukoz Oksidaz (β -D-glukoz: Oksijen 1- oksidoredüktaz, EC 1. 1. 3. 4).....	18
2.2.4	Glukoz Oksidaz'ın Reaksiyon Mekanizması	18
2.2.5	Glukoz Oksidaz Enziminin Yapısı.....	19
2.2.6	Glukoz Oksidaz Enziminin Genel Özellikleri.....	19
2.2.7	Glukoz Oksidaz Enziminin Aktivite Analizleri.....	20
2.2.8	Glukoz Oksidaz Enziminin Kullanım Alanları.....	21
2.2.9	Enzim Stabilizasyonu	22
2.2.10	Enzimlerin İmmobilizasyonu	24
2.3	Polietilen Glikol (PEG)	26
2.3.1	Pegilasyon	27
2.4	Dekstran.....	30
2.4.1	Dekstran Protein Konjugasyonu	31

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM	32	
3.1	Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	32
3.1.1	Kullanılan Cihazlar	32
3.1.2	Kullanılan Malzemeler	33
3.1.3	Kullanılan Kimyasal Maddeler	33
3.2	Deneylerin Yapılışı.....	34
3.2.1	GOD enziminin Aktivite Tayini	34
3.2.2	Enzim Polimer Konjugatlarının Sentezi.....	35
3.2.2.1	PEG Aldehit Türevinin Eldesi	35
3.2.2.2	GOD PEG Konjugatlarının Sentezi	36
3.2.3	Enzim Polimer Konjugatlarının Aktivite Tayinleri	38
3.2.3.1	GOD PEG Konjugatlarının Aktivite Tayinleri.....	38
3.2.3.2	GOD PEG Konjugatlarının Raf Ömürlerinin Belirlenmesi	39
3.3	Elde Edilen Ürünlerin Değerlendirilmesi.....	39
3.3.1	Konjugatların Viscotek Marka GPC Sisteminde İncelenmesi.....	39
3.3.2	FTIR Spektroskopisi İle Fonksiyonel Grupların Analizi.....	39
3.4	Biyosensör Hazırlanması İle İlgili Çalışmalar	39
3.4.1	pH Elektrodlarının (H^+ Seçici) Hazırlanması	39
3.4.2	Enzim İmmobilizasyonu ve Glukoz Biyosensörünün Hazırlanması ...	41

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER	43	
4.1	GOD Enziminin (GOD) pI Değerinin Aktivite Tayini.....	43
4.1.1	GOD PEG Konjugatlarının Aktivite Sonuçlarının Değerlendirilmesi ..	44
4.1.2	Raf Ömrü Sonuçlarının Değerlendirilmesi	46

4.2	FTIR Spektrumları.....	47
4.3	Dört Dedektörlü HPLC Sisteminde (Viscotek Marka GPC Sistemi) Alınan Kromatogramlar.....	49
4.4	pH Elektrotların Potansiyometrik Davranışı	51
4.5	Glukoz Biyosensörünün Potansiyometrik Davranışı	52
	KAYNAKLAR.....	56
	ÖZGEÇMİŞ.....	60

SİMGE LİSTESİ

A	Absorbans
°C	Santigrat derece
Da	Dalton
g	Gram
kDa	Kilo dalton
M	molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
Mε	Molar absorpsiyon katsayısı
n _{GOD}	GOD enziminin mol sayısı
n _{PEG}	PEG'in mol sayısı
μl	Mikrolitre
U	Ünite

KISALTMA LİSTESİ

Cat	Katalaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
FAD	Flavin adenin dinükleotit
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi
GOD	Glukoz oksidaz
GPC	Jel filtrasyon kromatografisi
H ₂ SO ₄	Sülfirik asit
HRP	Horseradish peroksidaz
PEG	Polietilen glikol
PEG-CHO	Polietilen glikol aldehit
PBS	Fosfat tamponu
PMM	Polimetil metakrilat
PVC	Polivinil klorür
RNA	Ribonükleik asit
THF	Tetrahidro furan
UV	Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1	Biyosensörün Yapısı 4
Şekil 2. 2	Clark'ın Enzim Elektrodu 5
Şekil 2. 3	Biyosensörlerin Yapısı ve Çalışma Prensibi 6
Şekil 2. 4	Potansiyometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi 8
Şekil 2. 5	Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi 9
Şekil 2. 6	Optik esaslı enzim sensörünün şematik gösterimi 10
Şekil 2. 7	Kalorimetrik biyosensörün şematik gösterimi 10
Şekil 2. 8	Piezoelektrik esaslı biyosensörün şematik gösterimi 11
Şekil 2. 9	Glukoz Oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon 11
Şekil 2. 10	Haloenzim-apoenzim çiftinin çeşitli kofaktörlerle gösterimi 14
Şekil 2. 11	Bir kimyasal reaksiyonun enzim varlığında yokluğundaki halleri için enerji diyagramı 16
Şekil 2. 12	Substrat-enzim etkileşmeleri: a) anahtar-kilit modeli, b) Etkileşme sonucu uygunluk modeli 17
Şekil 2. 13	Glukoz oksidazın reaksiyon mekanizması 18
Şekil 2. 14	GOD yapısındaki FAD kısmı ve aktif bölgedeki amino asit rezidüleri 19
Şekil 2. 15	Kromojenik substrat olarak ABTS kullanıldığında GOD reaksiyonu 21
Şekil 2. 16	Kromojenik substrat olarak o-dianisidin kullanıldığında GOD reaksiyonu 21
Şekil 2. 17	Polietilen glikol' ün (PEG) kimyasal yapısı 26
Şekil 2. 18	PEG veya türevleri ile protein modifikasyonunun yapıldığı çalışmalar 27
Şekil 2. 19	Polimer enzim arasındaki kovalent immobilizasyon 28
Şekil 2. 20	Pegilasyona uğramış proteinin avantajları 29
Şekil 2. 21	Dekstran polimerinin kimyasal yapısı 30
Şekil 3. 1	GOD-PEG kovalent konjugatlarının sentezinin şematik gösterimi 37
Şekil 3. 2	GOD PEG kovalent konjugatlarının sentezi 38
Şekil 3. 3	Polimerik membran pH elektrodunun şematik gösterimi 41
Şekil 3. 4	Glukoz biyosensörünün şematik gösterimi 42
Şekil 4. 1	GOD Enziminin pl değerinin değeri grafiği 43
Şekil 4. 2	GOD ve GOD-PEG konjugatlarının farklı pH değerlerindeki aktiviteleri 44
Şekil 4. 3	GOD ve GOD-PEG konjugatlarının farklı sıcaklıklardaki aktiviteleri 45
Şekil 4. 4	GOD enzimi, 1/5 ve 1/1 oranlı konjugatların aktivite sonuçları 46
Şekil 4. 5	GOD enzimi ve konjugatların raf ömürlerinin grafiği 47
Şekil 4. 6	GOD enziminin FTIR spektrumu 47
Şekil 4. 7	PEG aldehit türevinin FTIR spektrumu 48
Şekil 4. 8	GOD-PEG Konjugatının FTIR spektrumu 48

Şekil 4. 9 Konjugatların, PEG ve GOD enziminin GPC sistemi Viscotek marka cihaz kırılma indisi dedektörü ile alınan kromatogramlar	49
Şekil 4. 10 Konjugatların, PEG ve GOD enziminin GPC sistemi ile Viscotek marka cihaz UV dedektörü ile alınan kromatogramlar	50
Şekil 4. 11 Konjugatların, PEG ve GOD enziminin GPC sistemi ile Viscotek marka cihaz ışık saçılması dedektörü ile alınan kromatogramlar	50
Şekil 4. 12 Kompozit pH elektrotun potansiyometrik davranışı.....	51
Şekil 4. 13 Polimerik pH elektrodun potansiyometrik davranışı.....	52
Şekil 4. 14 Glukoz Biyosensörünün potansiyometrik değişimi.....	53

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2. 1 Enzimler için kofaktör görevi yapan bazı İnorganik elementler .	14
Çizelge 2. 2 Grup transferi gerçekleştiren bazı koenzimler	15
Çizelge 2. 3 Enzimlerin Uluslararası Sınıflandırılması	16
Çizelge 3. 1 Kullanılan kimyasal maddeler	33

**YENİ ENZİM POLİMER KONJUGATLARINA DAYALI GLUKOZ BİYOSENSÖRÜ
HAZIRLANMASI VE UYGULANMASI**

Gökay VARDAR

Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Melda ALTİKATOĞLU YAPAÖZ

Enzimler tıpta, biyoteknoloji ve endüstrinin çeşitli alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu uygulama alanlarında, enzimlerin sıcaklığa, pH'ya ve diğer çevre koşullarına karşı dirençli olması istenmektedir. Bu nedenle, enzim moleküllerinin özelliklerini değiştirmeye yönelik genetik ve kimyasal modifikasyonlar ile ilgili araştırmalar önem kazanmıştır. Enzimler suda çözünür polimerler veya bazı kimyasal maddeler kullanılarak modifiye edilebilmektedir. Bu şekilde üretilen, optimum sıcaklığı ve pH aralığı farklı, ortamda bulunan kimyasal maddelere dirençli modifiye enzimler çeşitli uygulamalarda yararlı olmaktadır. Doğal ve sentetik makromoleküllerin enzimler ile oluşturduğu konjugatlar tıpta ve biyoteknolojinin çeşitli dallarında kapsamlı uygulama alanları bulmaktadır.

Glukoz oksidaz (β -D-glukoz:oksijen 1-oksidoreedüktaz , EC 1.1.3.4), β -D-glukoz ile hidrojen peroksid arasında gerçekleşen ve sonuçta D-glukono- δ -lakton oluşum reaksiyonunu katalizleyen flavoprotein yapısında ticari bir enzimdir. Bu reaksiyonda elektron alıcı olarak moleküler oksijen kullanılmaktadır. Her bir GOD alt ünitesi kofaktör olarak, bağlı olmayan ve gevşek bir biçimde yapıda bulunan bir mol flavin adenin dinükleotid (FAD) içermektedir.

Bu çalışmada termal stabilitesi yüksek olan Glukoz Oksidaz (GOD) - Polietilen glikol (PEG) kovalent konjugatları sentezlendi. Öncelikle, polietilen glikolün (PEG) aldehid türevi sentezlendi ve GOD enzimi ile farklı mol oranlarında (n_{GOD}/n_{PEG} : 1/1, 1/5, 1/10,

1/20) enzim-polimer konjugatları sentezlendi. Elde edilen enzim-polimer konjugatları dört dedektörlü HPLC sisteminde (GPC) ve FTIR spektroskopisi yöntemiyle incelendi.

Sentezlenen konjugatların ve serbest enzimin farklı sıcaklıklarda ve farklı pH değerlerindeki aktiviteleri tayin edildi ve sonuçlar kıyaslandı. Konjugatlar, tüm sıcaklık ve pH değerlerinde serbest enzimden daha düşük aktivite gösterdi. Ancak yüksek sıcaklığa karşı oldukça iyi direnç göstererek serbest enzimden daha yüksek aktivite değerleri izlendi. Konjugatın zamana bağlı termal stabilitesinin oldukça iyi olduğu gözlemlendi. Ayrıca, GOD PEG konjugatının tayin edilen raf ömürlerinin, serbest enzimden daha iyi olduğu görüldü.

Bu tez çalışmasında, Prof.Dr. İbrahim Işıldak tarafından Biyomühendislik laboratuvarlarında geliştirilen mikro boyutlarda kompozit pH duyarlı sensör kullanılarak glukoz duyarlı potansiyometrik biyosensör geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Biyosensörün hazırlanmasında enzim, kompozit pH sensör membran yüzeyine veya içine immobilize edildi. Hazırlanan glukoz duyarlı biyosensör iç referans elektrot ve iç referans çözelti içermemektedir. Uzun süre kararlı okuma yapabileceği ve sürekli ölçüm sistemlerinde kullanılmaya elverişli olabileceği düşünülen biyosensörün potansiyometrik performansı bilgisayar kontrollü ölçüm sistemi ile izlendi.

Anahtar Kelimeler: Enzim stabilizasyonu, enzim immobilizasyonu, enzim polimer konjugasyonu, glukoz oksidaz, polietilen glikol (PEG), dekstran, biyosensör, aktivite

**DEVELOPMENT AND APPLICATION OF GLUCOSE BIOSENSOR BY USING
NEW ENZYME-POLYMER CONJUGATES**

Gökay VARDAR

Department of Chemistry

MSc. Thesis

Adviser: Doç. Dr. Melda ALTIKATOĞLU YAPAÖZ

Enzymes are widely used in medicine, many fields of biotechnology and industry. In these fields, enzymes being stable against high temperature, pH and other media conditions are desired. For this reason, genetical and chemical modifications for the alteration of enzyme molecule characteristics are gained considerable importance. Enzymes can be modified chemically by using water-soluble polymers or some chemicals. Modified enzymes, produced by this way, whose optimum pH range and optimum temperature is changed and also stable against chemicals found in media, are advantageous for various applications. Conjugates of natural and synthetic macromolecules with enzymes provides wide usage in medicine and in many fields of biotechnology.

The commercial enzyme, Glucose oxidase (β -D-glucose: oxygen 1-oxidoreductase, EC 1.1.3.4) is flavoprotein structured enzyme catalyzing a reaction between β -D-glucose and hydrogen peroxide and generating D-glucono- δ -lactone as a product. In this reaction molecular oxygen is used as an electron acceptor. Each GOX subunit contains one mole of flavin adenine dinucleotide (FAD) as cofactor which is not covalently bonded and loosely found in the structure.

In this study, Glucose Oxidase (GOD) - polyethylene glycol (PEG) covalent conjugates were synthesized whose resistance was increased against high temperature. Firstly polyethylene glycol aldehyde derivative was synthesized and enzyme-polymer conjugates with different molar ratios ($n_{\text{GOD}}/n_{\text{PEG}}$: 1/1, 1/5, 1/10, 1/20) were

synthesized using enzyme (GOD). The obtained conjugates were examined with GPC system and FTIR spectroscopy.

Activities of synthesized conjugates and free enzyme at different temperatures and pH values are determined and results are compared. The conjugates showed lower activity compared to purified enzyme in all temperatures and pHs. However, the conjugates against increasing temperatures showed greater activity values when it is compared to free enzyme. The conjugate displayed quite well thermal stability against high temperatures. Storage stability of GOD-PEG conjugate was also studied and showed better stability than free enzyme.

In this thesis study, the development of a glucose sensitive biosensor has been purposed by using micro sized potentiometric pH sensitive composite membrane sensor first time produced in Bioengineering's laboratories by the Prof.Dr. İbrahim Işıldak.

The enzyme is be used to immobilize for composite pH sensor membrane surface or inside while biosensor is being prepared. The glucose-sensitive biosensor is not include inner reference electrode and inner reference solution. The biosensor is thought to be more suitable to make stable readings for a long time and to be used for continuous measurement systems. Potentiometric performance of biosensor will be examined with a computer-controlled measurement system designated.

Keywords: Enzyme stabilization, enzyme immobilization, enzyme polymer conjugation, glucose oxidase, polyethylene glycol (PEG), dextran, biosensor, activity

1.1 Literatür Özeti

Biyosensörler biyokomponentler ve fiziksel komponentlerden oluşan analiz cihazlarıdır. Biyosensörlerde biyokomponent olarak en çok enzimler kullanılmaktadır. Glukoz oksidaz enziminin (GOD), iletken polimerlere immobilizasyon olmasıyla oluşturulan glukoz biyosensörlerinin glukoz tayininde diğer yöntemlere nazaran birçok avantajı bulunmaktadır. Enzimlerin denatürasyon koşullarına karşı daha dirençli hale getirmek için enzim stabilizasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri, enzimin polimerlere kovalent bağlanmasıyla oluşan enzim polimer konjugasyonlarını biyosensörlerde kullanarak biyosensörlerin kullanım ömrü artmakta ve çevre koşullarından daha az etkilenmektedir.

1.2 Tezin Amacı

Genelde biyosensörler; kimya, biyokimya, biyoloji, mühendislik gibi pek çok bilim alanının bilgi birikiminden yararlanılarak, kimyasal ve biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirilmesiyle geliştirilen analitik/biyoanalitik aygıtlar olarak tanımlanabilir. Spesifik enzim-substrat reaksiyonlarını temel alan elektrokimyasal biyosensör sistemler; minyatürize olabilmek, ekonomik, taşınabilir, özel türlere karşı seçici ve yüksek duyarlılık sergileme gibi önemli özelliklere sahiptirler. Biyolojik moleküllerin immobilizasyonu ve transdüşer sensör membran ara yüzey teknolojisinin tasarımı, biyosensörlerin performansını (doğrusal çalışma aralığı, seçiciliği, cevap zamanı, duyarlılığı, kullanım ömrü, kararlılığı ve girişim yapana ajanlara karşı hassaslığı) önemli şekilde

etkilediğinden, elektrokimyasal sensör sistemlerde anahtar rol oynamaktadır. Ayrıca dış çevre şartlarından etkilenmeyen kapalı bir mikro çevreye sahip biyosensör üretimi için önemlidir. Bu nedenle elektrokimyasal sistemlerde, etkili bir algılama amacıyla, araştırmalar yeni immobilize enzim sistemler ve tasarımlar üzerine yoğunlaşmıştır.

Doğal polimerlerin, sahip oldukları işlevsel özellikler nedeniyle değişik kullanım alanları bulunmaktadır. Bunlar başlıca kalınlaştırıcı, jel yapıcı, bağlayıcı, dağıtma ajanı, kayganlaştırıcı, yapıştırıcı ve biyomalzeme olarak kullanılmaktadırlar. Polietilen glikolün hidroksil içeriği, bu polimerin hidrofilik ve diğer moleküllere bağlanabilmesi için kolay modifiye olmasını sağlar. Aldehit-PEG ise, ticari PEG'in periyodat oksidasyonu ile elde edilebilmektedir. Bu polimer, enzimler üzerinde bulunan temel amin grupları ile kovalent olarak reaksiyon verebilmektedir. Diğer taraftan suda çözünebilmeleri, biyoyumlu olmaları, biyolojik bozunmaya uğrayabilmeleri ve toksik olmamaları enzim teknolojisinde çeşitli alanlarda kullanılmalarına neden olmuştur. Enzim yüzeyinin hidrofilik bir polimer ile minimal modifikasyonu, enzim yüzeyinde bir kılıf oluşturmak ve onu hidrofobik ara yüzeyler ile etkileşime karşı korumak için iyi bir yol olmaktadır.

Bu tez çalışması,

1) İlk kez glukoz oksidaz enzimi ile polietilen glikol-aldehid farklı oranlarda kovalent konjugatlarının hazırlanması böylece GOD enziminin stabilitesinin artırılması,

2) Prof. Dr. İbrahim Işıldak tarafından geliştirilen mikro büyüklükte kompozit yapıda potansiyometrik pH sensör kullanılarak uygulama koşullarında denatürasyona dirençli ve uzun kullanım ömrü olan ve kararlı okuma yapabilen mikro büyüklükte yeni tip glukoz duyarlı potansiyometrik biyosensör geliştirilmesini ve glukozun hızlı, hassas ve doğru şekilde tayininin sağlanması için yöntem geliştirilmesini amaçlamaktadır.

1.3 Hipotez

Hedeflediğimiz çalışmalarımız amacına ulaşarak, Glukoz Oksidaz enziminin termal stabilitesi başarılı bir şekilde iyileştirilmiştir. Bu maksatla polietilen glikol polimerinin aldehit türevi sentezlenerek, enzim ile kararlı konjugatları hazırlanmıştır. Mikro büyüklükte kompozit yapıda potansiyometrik pH sensör kullanılarak glukoz biyosensörü hazırlanmıştır. Enzim konjugatlarının optimum koşulları belirlenmiş olup glukoz tayini için biyosensör hazırlamada başarılı bir şekilde kullanılması için bir temel

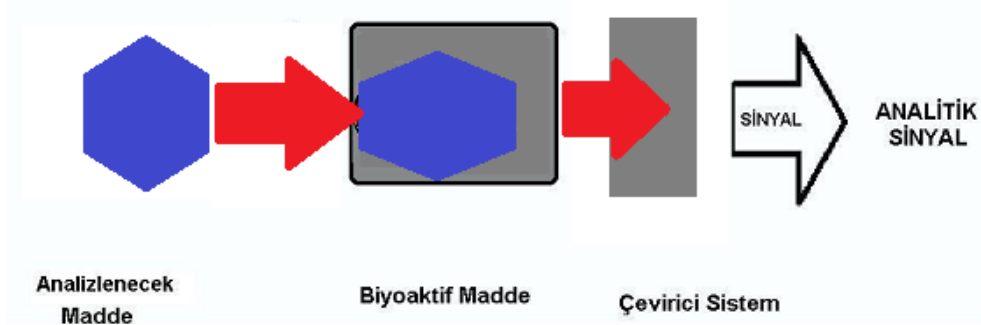
oluřturacađı dűřűnűlmektedir. Bűylece denatűrasyona dirençli ve uzun kullanım űmrű olan ve kararlı okuma yapabilen bir glukoz biyosensűr geliřtirilebilecektir. Literatűrde polietilen glikol-aldehit tűrevi ile GOD enzim konjugatlarının hazırlanmasına rastlanmamıřtır. Bu maksatla bu konjugatların yűksek termal stabilitesi ve daha ileride biyosensűr uygulamalarında kullanım imkanı bulması, çalıřmanın űzgűn olduđunu gűstermektedir.

BİYOSENSÖRLER, ENZİMLER, POLİETİLEN GLİKOL, DEKSTRAN

2.1 Biyosensörler

Canlıların tümü yaşadıkları ortamlardaki değişimleri algılayıp yaşamlarının devam ettirebilmek için bu değişimlere ayak uydurmaya çalışırlar. Canlıların bu uyarıları algılamasını sağlayan biyolojik maddelerin analitik sistemler ile birleştirilmesi biyosensörleri ortaya çıkarmıştır [1].

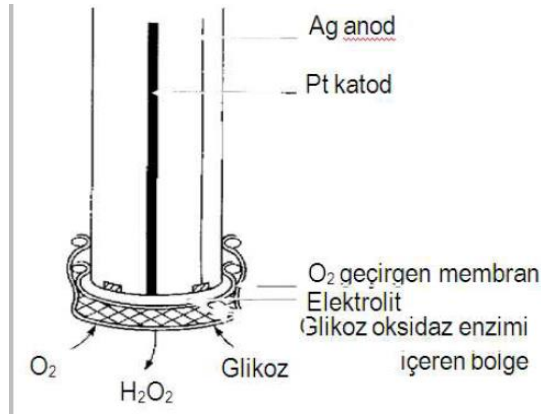
Biyosensörler, biyolojik bir olayın ya da cevabın ölçülebilir elektrikselsel bir sinyale dönüştürülmesidir [2]. International Union Of Pure And Applied Chemistry (IUPAC) tarafından yapılan tanıma göre de biyosensörler, kimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı optik, termal veya elektrikselsel sinyallere dönüştüren elektrokimyasal cihazlardır [3].



Şekil 2. 1 Biyosensörün Yapısı

Biyosensörlerle alakalı çalışmalar 20. Yüzyılın başlarında pek yapılmamaktaydı [2]. İlk biyosensör 1956 yılında biyosensörlerin babası olarak bilinen Leland C. Clark

tarafından Cincinnati Hastanesi'nde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kandaki oksijen miktarını oksijen elektrodu ile izlemesiyle başladı. 1962 yılında Clark ve Lyons Glukoz Oksidaz enzimini diyaliz membrana tutuklayarak ve oksijen elektroduyla kombine ederek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başardılar [1], [4], [3]. Bu yöntem, ortamdaki harcanan oksijen konsantrasyonu ile orantılı olarak glukoz konsantrasyonunu bulunmasını sağlamaktadır [4].

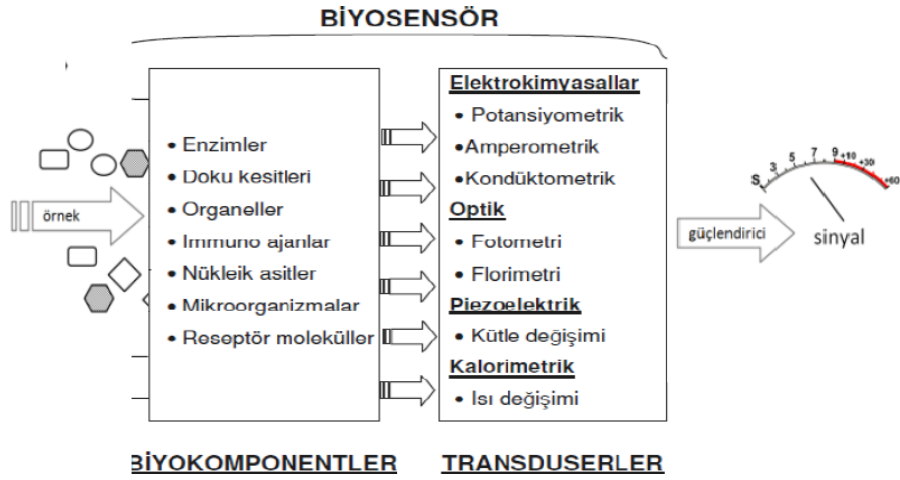


Şekil 2. 2 Clark'ın Enzim Elektrodu

Guilbault ve Montalvo üreaz enziminin amonyum seçici sıvı membran elektroduna immobilize ederek oluşturduğu üre sensörü sayesinde ilk potansiyometrik enzim elektrodlarının detaylı olarak anlaşılmasını sağlamışlardır. 1974 yılında termal transducerların biyosensörlerde kullanımı tasarlandı [4]. Clark'ın çalışmaları ve sonraki yapılan çalışmalar 1975 yılında Yellow Spring Instrument Company firmasının başarılı ilk ticari glukoz biyosensörünü piyasaya sürmesine yol açtı [2]. Bu uygulamalardan sonra dünya çevresinde birçok araştırma laboratuvarında yüzlerce biyosensör geliştirildi [2], [5]. Ayrıca son üç yılda biyosensörle ilgili iki yüzden fazla akademik makale yayınlanmıştır [5].

2.1.1 Biyosensörler Yapısı ve Fonksiyonu

Biyosensörler, spesifik olarak analite bağlanan biyokomponentler (biyoreseptör) ve biyoreseptörün analit ile etkileştiğinde ortaya çıkan fiziksel yada kimyasal sinyalin elektriksel sinyale dönüştüren fiziksel komponentlerden (transducer) oluşur. Analit ile biyoreseptör etkileştiğinde ortaya çıkan sinyal proton konsantrasyonundaki değişimden, amonyak ya da oksijen gibi gazların salınmasından, ışık veya ısı emisyonu, kütle değişimi, absorpsiyon gibi değişimlerden kaynaklanır [7].



Şekil 2. 3 Biyosensörlerin Yapısı ve Çalışma Prensibi

Biyosensörlerin oluşturulmasında biyoreseptör ve transducer seçimi ve kombinasyonu çok önemlidir. Bu yüzden teorik olarak reseptör ve transducerlerin kombinasyonu mümkün olmasına rağmen bu kombinasyon bir elektriksel sinyal oluşturamazsa biyosensör fonksiyon göstermez [1].

İyi ve kullanışlı bir biyosensör hazırlamak için aşağıdaki parametreler göz önünde bulundurulmalıdır.

- Biokatalizörün analite karşı afinitesi çok yüksek olmalıdır, normal saklama koşullarda stabilite göstermeli ve analizler arasındaki değişkenliği düşük olmalıdır
- Reaksiyon gerçekleştirildiği ortamdaki karıştırma, pH ve sıcaklık gibi fiziksel parametrelerden bağımsız olmalı
- Biyosensörün cevabı kesin, duyarlı, tekrarlanabilir ve lineer olmalıdır. Aynı zamanda elektriksel ya da diğer transduserlerden gelen gürültüleri kaynaklarını içermemeli.
- Eğer biyosensör klinik çalışmalarda kullanılacaksa, biyosensör probu küçük, biyoyumlu, toksik ve antijenik etkilere sahip olmamalıdır.
- İnsan örneklerindeki analitlerin hızlı ölçümleri için biyosensörden istenen eş zamanlı ölçümler sağlamasıdır.

Komple bir biyosensör ucuz, küçük, portatif olmalıdır [2].

2.1.2 Biyokomponentler (Biyoreseptörler)

Biyosensörlerin yapısında bulunun biyoreseptörler, analite karşı yüksek afinite, özgüllük gösteren ve analit ile seçici olarak etkileşime giren biyomoleküllerdir. Biyosensörlerin yapısında bulunan başlıca biyoreseptörler; nükleik asitler, proteinler (başlıca enzimler ve antikorlar) lektinler, mikro organizmalar, organellerdir [2],[4],[5],[6]. Antikorum biyoreseptör olarak kullanıldığı biyosensörler yaygın olarak immünosensörler olarak bilinirler [5]. Biyoreseptörler içinde en yaygın kullanılanları enzim ve antikorlardır [1], [2].

2.1.3 Fiziksel Komponentler (Transduserler)

Transduserler, reseptörlerin biyolojik reaksiyonunu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürür. Biyokimyasal reaksiyona göre transduser seçilir. Elektrodlar amperometrik ve potansiyometrik ölçümlerde kullanılır ve burada hedef maddedir. Optik sensörlerde hedef ışık, piezoelektrik sensörlerde ise kristalin salınım rezonansının kütle yüklenimi sebebiyle değişmesidir. Bunların haricinde transistörler ve termistörler de transduser olarak kullanılır [1].

2.1.4 Biyosensörlerin Avantajları

- Kısa ölçüm süresine sahip olması
- Dayanıklılıklarının iyi olması
- Kolayca minyatirüze edilebilmesi
- Mükemmel deteksiyon limitine sahip olması
- Bulanık biyoakışkan çözeltilerde kullanılabilme yeteneğinin olması
- Maliyetinin düşük olması
- Gereksinime göre işlem akışı
- Otomatik ölçüm ve ayar sistemlerinin devreye sokulabilmesi [1], [4].

2.1.5 Biyosensörlerin Dezavantajları

- Biyokomponentlerin ömrünün kısa olması

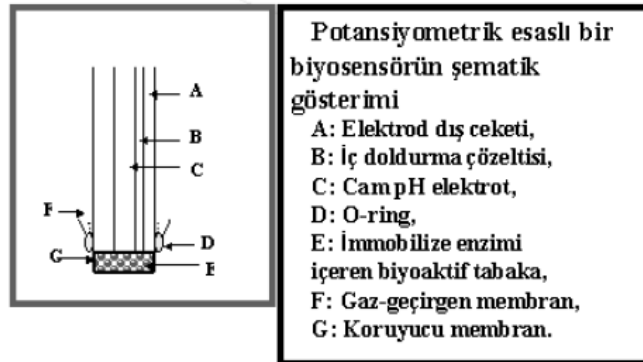
- Biyosensör hazırlamanın uzun sürmesi
- Moleküler biyolojik prosesler hakkında yeterli bilginin olmaması
- Biyokompatibilite sorunları
- İmplant edilen biyosensörlerin steril tutulabilme güçlüğü [1].

2.1.6 Elektrokimyasal Biyosensörler

Biyosensördeki biyoreseptörlerin analiz edilecek bileşiklerle spesifik reaksiyonu sonucu analitin konsantrasyonu ile orantılı elektrotlar arasında ölçülebilir bir akım, ölçülebilir bir potansiyel yada şarj birikmesi, ölçülebilir şekilde ortamdaki iletkenlik değişmesi ortaya çıkmaktadır. Elektrokimyasal biyosensörler potansiyometrik, amperometrik ve konduktometrik olarak sınıflandırılır. Ayrıca impedans ölçen impedimetric yöntem ve transistör teknolojisinin kullanıldığı bir gate elektrottaki potansiyometrik etki sonucundaki akımın ölçüldüğü alan-etki yöntemidir [2], [8].

2.1.6.1 Potansiyometrik Biyosensörler

Bir elektrokimyasal hücrede bir çalışma elektrodu ve bir referans elektrod arasındaki çözeltideki türe ve derişimine bağıli ortaya çıkan potansiyel farkın ölçülmesine dayalı yapılan analiz yöntemine potansiyometri denir. Potansiyometrik tekniklerde transduser genellikle gaz algılayıcı elektrot ya da iyon seçici elektrotdur. Sistemlerde kullanılan türlere karşı seçici çalışma elektrodları sayesinde potansiyometrik biyosensörün duyarlılığı ve seçiciliğı öne çıkmaktadır [6]. Transistörleri elektriksel sinyal yükseltici olarak kullanılarak enzim, antikor gibi biyolojik materyallerle birleştirilmesiyle enzim alan etki transistor bazlı sensörler elde edilir [8].



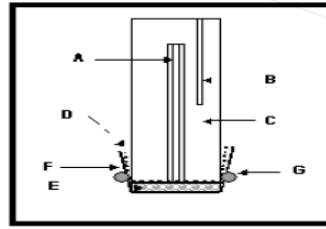
Potansiyometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi

- A: Elektrod dış ceketi,
- B: İç doldurma çözeltisi,
- C: Cam pH elektrot,
- D: O-ring,
- E: İmmobilize enzimi içeren biyoaktif tabaka,
- F: Gaz-geçirgen membran,
- G: Koruyucu membran.

Şekil 2. 4 Potansiyometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi [9].

2.1.6.2 Amperometrik Biyosensörler

Çalışma elektrodu ile referans elektrod arasında uygulanan bir potansiyelle çalışma elektrodunda elektroaktif türlerin kimyasal reaksiyonuyla oluşturulan akımın ölçülmesine dayanır [6], [8]. Üretilen akım çözeltideki türlerin derişimine bağlıdır. Amperometrik sensörler potansiyometrik sensörlere daha hızlı, daha hassas, daha doğru ve daha kesindir. Bu yüzden termodinamik denge sağlanana kadar ve cevap analit konsantrasyonunun lineer fonksiyonu olana kadar bekleme gerekliliği yoktur. Ancak amperometrik cihazların seçiciliği sadece mevcut elektroaktif türlerin redoks potansiyelleri tarafından yönetilmektedir. İkincil nesil biyosensörler olarak bilinen amperometrik biyosensörler mediyatörler tarafından modifiye edilmektedir. Mediyatörler, enzim ve elektrod arasındaki elektron alışverişini kolaylaştıran redoks maddeleridir. Direkt olarak enzim-elektrot birleşmesi yada mediyatörsüz biyosensörün direkt elektron transfer mekanizmalarıyla oluşturulan biyosensörlerde üçüncül nesil adını almıştır. Bu durumda elektrodan enzime ve substrat molekülüne elektron direkt olarak transfer olur [8].

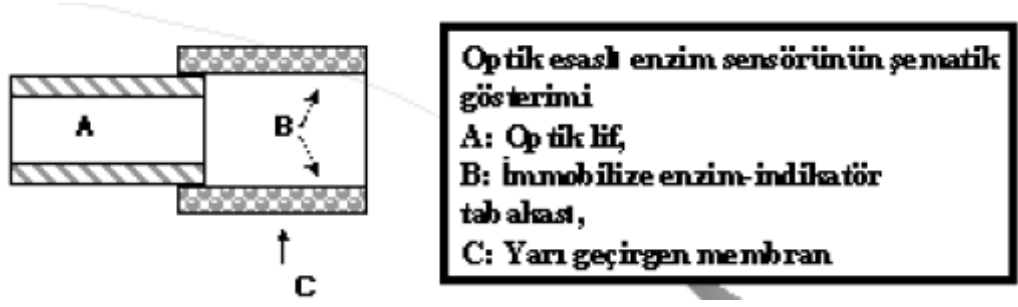


Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi
A: Çalışma elektrodu (Pt),
B: Referans elektrot (Ag/AgCl),
C: Elektrolit çözelti (KCl),
D: İç gaz geçirgen membran (Teflon),
E: İmmobilize enzimi içeren biyoaktif tabaka
F: Dış koruyucu membran (Selüloz a setat v.s)

Şekil 2. 5 Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi [9].

2.1.6.3 Optik Biyosensörler

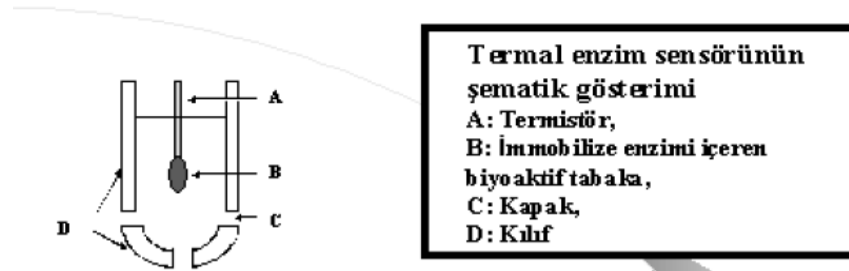
Optik biyosensörler, fiber optik ve lazer teknolojilerindeki ilerlemeler sonucu günümüzde büyük bir ilgi görmektedir. Optik biyosensörler, biyokatalizörlerin optik lifler üzerine immobilize edilerek hazırlanan ölçüm cihazlarıdır. Optik biyosensörler enzimin analitle etkileşmesi sonucu Uv-Vis absorpsiyon, Biyo/kimyasal lüminesans, floresans, fosforesans, reflektans gibi temel ilkeler çerçevesinde işlev görürler [1], [8]. Genetik olarak tasarlanmış mikroorganizmaların optik hücre biyosensörlerinde geniş çapta uygulamaları mevcuttur [6].



Şekil 2. 6 Optik esaslı enzim sensörünün şematik gösterimi [9].

2.1.6.4 Kalorimetrik Esaslı Biyosensörler

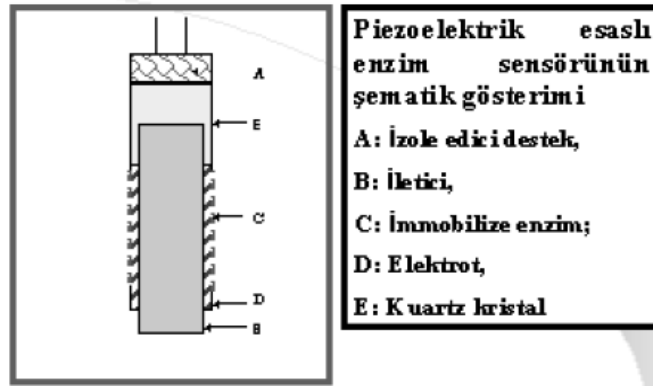
Kalorimetrik esaslı biyosensörler, temel olarak enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanarak substrat konsantrasyonunu belirlemektir. Genel olarak enzimatik reaksiyonların ekzotermik doğasından yararlanılır. Enzimatik reaksiyon sonucu meydana gelen sıcaklık değişimi ile substrat konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkiyle sonuçta ulaşırlar [1].



Şekil 2. 7 Kalorimetrik biyosensörün şematik gösterimi

2.1.6.5 Piezoelektrik Biyosensörler

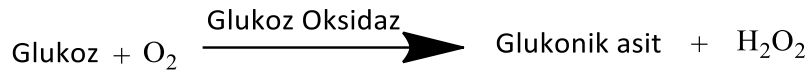
Piezoelektrik esaslı biyosensörler daha çok immunosensörlerde kullanılmaktadır. Bu sensörlerde biyokomponent kristal yüzeyine immobilize olmaktadır [8]. Temel olarak, karakteristik rezonans frekansındaki farklanmayı belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlelerinin ölçülmesine dayanır.



Şekil 2. 8 Piezoelektrik esaslı biyosensörün şematik gösterimi [1].

2.1.7 Glukoz Biyosensörü

Glukoz metabolizmada en önemli enerji ve karbon kaynağıdır. Eğer konsantrasyonu glukoz için kritik konsantrasyonun aşağısına düşerse, hücrelerin glukoz ihtiyacı karşılanamaz ve daha sonra apoptozis denilen hücre ölümleri gerçekleşebilir [1]. Dünya genelinin %5'ini oluşturan diyabetik hastaların tedavisinde ve tanısında kan ve idrar gibi biyolojik sıvılarda glukozun tayini çok önemlidir. Bunun yanında gıda kimyası, çevresel koruma ve biyoteknoloji alanlarında geniş bir kullanım alanına sahiptir. Önceki çalışmalarda glukoz tayininde elektrokimyasal, spektroskopik, kolorimetrik ve diğer metotları içeren yöntemler kullanılmıştır. Bu yöntemler arasında elektrokimyasal biyosensör metodu yüksek seçiciliği, duyarlılığı, düşük maliyeti ve uygulama kolaylığından dolayı glukoz tayininde en sık kullanılan yöntemdir. Elektrokimyasal glukoz biyosensörü biyospesifik enzim reaksiyonunu temel alır. Glukoz oksidaz enzim immobilize biyosensör hazırlanmasında biyolojik komponent olarak en çok çalışılan enzimdir. Glukoz oksidaz, glukozu glukano lakton ve hidrojen peroksida okside ederek ölçülebilir bir sinyal oluşturur [10], [11]. Ancak denatürasyondan dolayı zamanla enzim aktivitesinin kaybedilmesi glukoz biyosensörleri için dezavantaj bir durumdur [6].



Şekil 2. 9 Glukoz Oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon

Bu reaksiyonda;

- Temel sensör olarak O₂ duyar ve H₂O₂ duyar elektrotlar kullanıldığında oksijendeki azalmayla ya da hidrojen peroksinin oluşumu sonucunda ilgili elektrotların bu değişimi algılayarak amperometrik ölçüm yapılabilmektedir [1].
- pH duyarlı elektrotlar kullanılarak reaksiyon sonucu oluşan glukonik asit vasıtasıyla ortamdaki hidronyum iyonunun pH elektrotuyla algılanarak potansiyometrik ölçüm yapılabilmektedir [1].

2.1.8 Biyosensörlerin Başlıca Kullanım Alanları

Biyosensörler birçok alanda kullanılmakla birlikte genel olarak biyoteknolojik uygulamalarda, klinik analizlerinde, genel sağlık taramalarında, veterinerlikte, endüstriyel proseslerin kontrolünde, çevresel kirlilik kontrollerinde, tarım ve ziraat uygulamalarında, gıda endüstrisinde, askeri uygulamalarında kullanılmaktadır [1],[4],[5],[12].

2.1.9 Biyosensörlerin Performans Kriterleri

Kararlılık: Bir biyosensörün kararlılığı, diğer faktörlerde yeterli koşullar sağlandıktan sonra onun pratik kullanılabilirliğinin en önemli belirteçlerinden biridir. Kararlılık bir biyosensör ömrünün uzunluğu hakkında fikir verir.

Tayin aralığı ve Tayin sınırı: Kalibrasyon grafiğinde substrat konsantrasyonuyla sensör cevabı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu konsantrasyon aralığına "doğrusal aralık" denir. Bu doğrusal grafiğin en alt sınırı tayin sınırı olarak tanımlanır.

Seçimlilik: Diğer analiz sistemleriyle kıyaslandığında biyosensörlerin varlık nedenlerinin en önemli sıralarında gelmektedir. Cihazın sadece analite özgünlüğünü gösterir. Cihaz başka reaktiflere ilgi göstermez ve hatalı sonuç vermez.

Cevap zamanı: Biyosensörün analizlenecek maddenin bulunduğu ortama temas ettiği andan itibaren ölçüm düzeneğinden sonucun okunduğu ana kadar geçen süredir.

Tekrarlanabilirlik: Aynı örnekte yapılan ardı ardına ölçümlerin sonuçları arasında standart bir farkın olmamasıdır [1], [12].

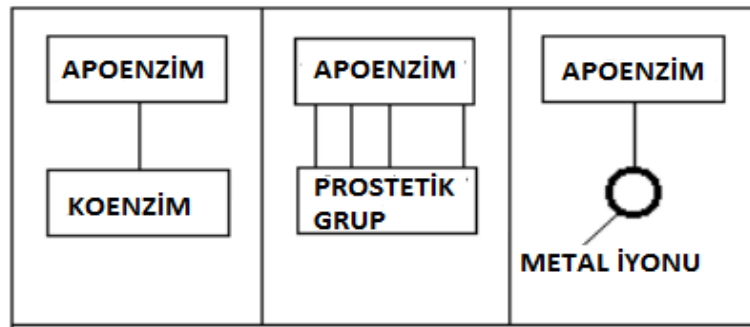
2.2 Enzimlere Giriş

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandırarak, hiçbir yan ürün oluşmasına fırsat vermeyen ve yüzde yüzlük ürün verimi sağlayan protein yapılı biyolojik katalizörlerdir [13]. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç, bütün enzimler proteindir [13], [15]. Enzimler katalizörlerin özel bir türüdür. Birçok enzim hücre sıvılarında çözünmüş halde bulunur. Kimyasal katalizörlerin aksine substratlarıyla etkileşerek enzim-substrat kompleksleri oluştururlar ve reaksiyonu katalizlerler. Bu etkileşimden sonra substratı ürüne dönüştürürler. Bu yüzden enzimlerin substratı tanıma ve reaksiyonu katalizleme kabiliyeti gibi iki önemli karakteristik özelliği vardır [14].

Enzimler, kimyasal katalizörlere göre çok önemli bir katalitik güce ve üstünlüklere sahiptir. Bu üstünlüklerden ilki substratları için yüksek özgülüğe sahip olmasıdır. İkincisi kimyasal tepkimeleri olağanüstü hızlandırmasıdır. Enzimler bir reaksiyonun hızını enzimsiz reaksiyona oranla yaklaşık bir milyon ya da bir milyar kat artırmaktadır. Son olarak pH ve sıcaklığın optimum koşullarındaki sıvı çözeltilerde işlev görmesidir. Kimyasal katalizörlerin çok çok azı bu özelliklerin hepsine sahiptir [15], [16], [17].

Biyokimya tarihinde enzimler üzerine oldukça fazla çalışma yapılmıştır. Bir enzim üzerindeki ilk çalışma 1835 yılında İsveçli kimyager Jon Jakob Berzelius tarafından gerçekleştirilmiş, diastazın nişastayı in vivo olarak sülfirik asitten daha yüksek verimde hidrolizlediğini göstermiştir [13], [15], [18]. 1850'lerde Louis Pasteur şekerin mayayla alkole fermentlenmesini enzimler tarafından katalizlendiği sonucuna vardı. Bu sebeple enzimlere için "fermentler" terimi kullanılmaya başlandı [13], [15]. Enzim alanındaki en önemli gelişme 1926 yılında James Sumner'ın ürenin hidrolizi sonucu karbondioksit ve amonyağın açığa çıkmasını sağlayan reaksiyonun katalizini sağlayan üreaz enziminin "Jack bean" bitkisinden elde edip kristallendirtikten sonra bu kristallerin tamamen proteinlerden oluştuğunu buldu ve bütün enzimlerin protein yapılı olduğunu ileri sürdü. Yalnız başka örnek çalışmalar olmadığı için bu sonuç hep şüphe ile karşılandı. 1930'larda John H. Northrop ve Moses Kunintz pepsin, tripsin ve kimotripsin gibi sindirim enzimlerini kristallendirdi ve bunların protein yapıda olduklarının bulunmasıyla Sumner'in fikri geniş kabul gördü. Böylece James Sumner'a 1947 yılında Nobel ödülü kazandırdı [13], [14], [15], [18].

Enzimler diğerk proteinler gibi, birkaç milyon dalton molekül ağırlığına sahiptir. Bazı enzimler katalizi protein yapılarıyla yerine getirebilirken, bazıları protein yapısında olmayan “kofaktör” denilen gruplara ihtiyaç duyarlar. Kofaktörler Fe^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} ve Zn^{+2} gibi metal iyonu olabildiği gibi, “koenzim” denilen kompleks organik yada metaloorganik bileşiği olabilir. Eğer bu koenzim ya da metal iyonu çok sıkı hatta kovalenet olarak bağlanıyorsa “prostetik grup” adını alır. Bu şekilde metal iyonlarıyla yada koenzimler ile katalitik aktivite gösteren enzim “haloenzim” olarak adlandırılır. Bu enzimlerin protein kısmı “apoenzim” olarak adlandırılır.



Şekil 2. 10 Haloenzim-apoenzim çiftinin çeşitli kofaktörlerle gösterimi [18].

Çizelge 2. 1Enzimler için kofaktör görevi yapan bazı inorganik elementler [15].

Metal iyonu	Enzim
Cu^{+2}	Sitokrom oksidaz
Fe^{+2} ve Fe^{+3}	Sitokrom oksidaz,katalaz ve peroksidaz
K^{+}	Piruvat kinaz
Mg^{+2}	Hekzokinaz,glukoz 6-fosfataz ve purivat kinaz
Mn^{+2}	Arjinaz, Ribonükleotid redüktaz
Mo	Dinitrogenaz
Ni^{+2}	Üreaz
Se	Glutasyon peroksidaz
Zn^{+2}	Karbonik anhidraz, Alkol dehidrogenaz

Çizelge 2. 2 Grup transferi gerçekleştiren bazı koenzimler [13], [15].

Koenzim	Taşınilan Birim
Biyotin	CO ₂
Koenzim A	Açıl Grupları
Deoksi adenzil kobalamin	H atomları ve alkil grupları
Flavin adenin dinükleotit	Hidrojen atomları (elektronlar)
Nikotinamid adenin dinükleotit	Hidojen atomları (elektronlar)
Lipoamid	Açıl grupları
Piridoksal fosfat	Amino grupları
Tiamin pirofosfat	Aldehit Grupları

2.2.1 Enzimlerin Sınıflandırılması

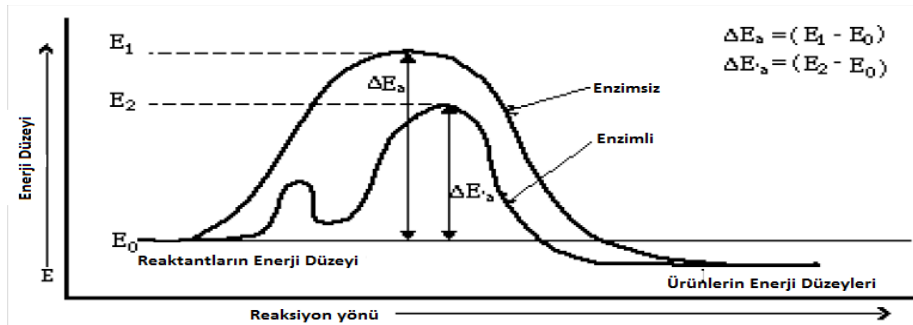
Enzimler önceleri katalitik aktivite gösterdikleri substratların sonuna "az" eki getirilerek isimlendirilmişlerdir. Yani üre hidrolizini sağlayan enzime üreaz, DNA oluşturmak üzere nükleotitlerin polimerleşmesini katalizleyen enzime DNA polimeraz, fosfat esterlerinin hidrolizlenmesini sağlayan enzime fosfataz denilmiştir. Pepsin, tripsin gibi bazı enzimler de substrat ve tepkimeleri hakkında hiçbir bilgi verilmeden isimlendirilir. Zamanla birçok enzimin ortaya çıkmasıyla sistematik bir adlandırmaya ihtiyaç duyulmuştur. The international Union of Biochemistry'e göre enzimler katalizlediği tepkime tipini esas alarak 6 gruba ayırmıştır. Her bir grupta kendi içinde gruplara ayrılmıştır. Böylece her enzime katalizlediği tepkimeyi tanımlayan 4 sayılı sınıflandırma numarası ve sistematik ad verilmiştir. Bu sınıflandırma numarası E.C(enzyme Commission) harflerinde sonra gelen ardı ardına 4 rakamdan oluşur. İlk sayı sınıf adını, ikinci sayı alt sınıfını, üçüncü sayı alt alt sınıfını, dördüncü sayı enzimin aynı üç rakama sahip enzimler arasındaki sınıfını gösterir [13], [15], [18].

Çizelge 2. 3 Enzimlerin Uluslararası Sınıflandırılması [15].

No.	Sınıf	Katalizlenen tepkime tipi
1	Oksidoredüktazlar	Elektronların transferi
2	Transferazlar	Grup transfer tepkimeleri
3	Hidrolazlar	Hidroliz tepkimeleri
4	Liyazlar	Çift bağlara grupların ilavesi ve grupların yer değiştirilmesiyle çift bağların oluşumu
5	İzomerazlar	Molekül içindeki grup transferleri
6	Ligazlar	ATP'nin ayrılmasıyla C-C,C-S,C-O veC-N bağlarının oluşması

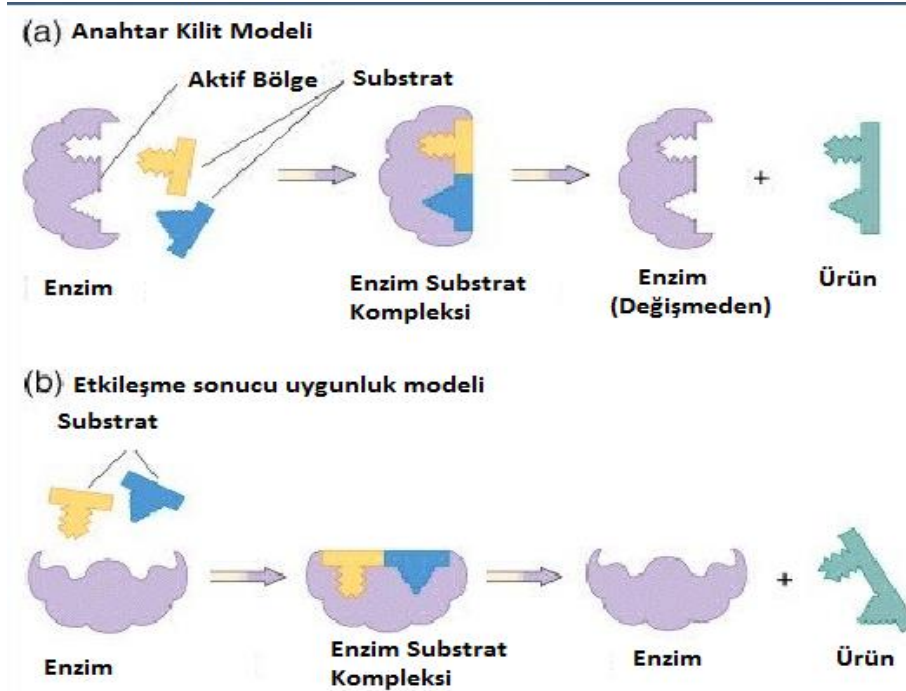
2.2.2 Enzimler Nasıl Çalışır?

Bir reaksiyonun gerçekleşmesi için bazı enerji formları gereklidir [18]. Yani reaksiyona giren maddelerin ürünlere dönüşebilmesi için "Aktivasyon Enerjisi" denilen bir enerji engelini aşmaları gerekmektedir. Enzimler reaksiyonun yolunu değiştirerek, reaksiyonun daha düşük aktivasyon enerjili yoldan gerçekleşmesini sağlarlar [15], [18]. Bir başka deyişle, reaktantlarla daha düşük enerjili bir geçiş kompleksi oluşturarak daha çok sayıda ürünün oluşumunu sağlarlar [13]. Substrattan ürüne geçişte reaksiyon birkaç adım üzerinden olur ve böylece tek bir adımda aşılması gereken enerji engeli daha kolay aşılabılır küçük engeller haline gelir ve açığa çıkan enerji de kontrol edilebilir [19]. Enzimler reaksiyonun dengesini etkilemezler. Enzimlerin rolü, substratın ürüne dönüşümünü hızlandırmaktır. Ayrıca tepkime uygun enzim varlığında tepkime hızının artması nedeniyle daha hızlı dengeye ulaşır [15].



Şekil 2. 11 Bir kimyasal reaksiyonun enzim varlığında, yokluğundaki halleri için enerji diyagramı [18].

Enzimlerin reaksiyonları ne şekilde katalizlendiğine dair 21'den fazla hipotez ortaya atılmıştır. Bu hipotezlerin en önemlisi 1894 yılında Fischer tarafından ortaya atılan anahtar-kilit hipotezidir. Bu hipotez enzim substrat ilişkisini enzimlerin yüksek derecedeki özgülüğü ile açıklamaktadır. Ancak anahtar kilit modelini yapılan çalışmalarda kesin olarak gözlemleyemiyoruz. Örneğin; Substrata benzer bileşiklerin daha küçük hacimli grupları substrat gibi enzime bağlanamazken, daha büyük hacimli grupları olan bileşikler substrattan enzime daha sıkı bağlanabilmektedir. Eğer anahtar-kilit hipotezi doğru olsaydı büyük hacimli grupların enzime bağlanamamış olması gerekirdi. Koshland 1958 yılında uygunluk modeli hipotezini ortaya attı. Yani substrat enzime bağlanmaya başladığında, enzim üzerindeki fonksiyonel gruplar ile substrat üzerindeki çeşitli gruplar etkileşmeye başlar ve bu karşılıklı etkileşim enzim üzerinde bir konformasyon değişikliğine sebep olur. Enzimdeki bu değişimin sonucunda düşük katalitik form yüksek katalitik forma dönüşür. Konformasyonel değişim substrat spesifikliğı için bir temel olarak sunulabilir. Substrata benzer bileşikler enzime bağlanabilir fakat kataliz için gerekli enzimdeki konformasyon değişikliğine neden olamaz. Ayrıca anahtar-kilit modelinin tersine uygunluk modelinde enzimlerde farklı bağlanma modellerine ve konformasyonel değişimlere eşlik etmesi için esnek bir aktif bölge gerekmektedir [14].



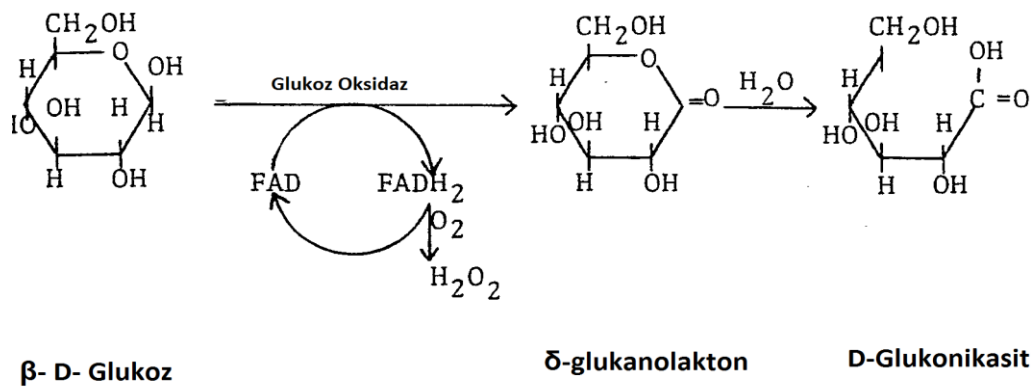
Şekil 2. 12 Substrat-enzim etkileşmeleri: a) anahtar-kilit modeli, b) Etkileşme sonucu uygunluk modeli.

2.2.3 Glukoz Oksidaz (β -D-glukoz: Oksijen 1- oksidoredüktaz, EC 1. 1. 3. 4)

Glukoz Oksidaz (GOD) moleküler oksijeni elektron alıcısı olarak kullanarak β -D-glukozun glukonik aside oksidasyonunu gerçekleştiren enzimdir [20], [21], [23]. Glukoz oksidaz ilk kez 1928 yılında Müller tarafından *Aspergillus Niger* ve *Penicillium glaucum* mantar küflerinden izole edilerek bulunmuştur [21], [22]. God başlıca genus *Aspergillus* ve *Penicillium* olmak üzere birçok farklı fungal kaynaktan elde edilebilir. *Aspergillus niger* GOD üretimi için en çok kullanılan kaynaktır. Glukoz oksidasyonu için *Penicillium* türlerinden elde edilen GOD, *Aspergillus niger* göre daha avantajlı kinetik tutum sergiler [20].

2.2.4 Glukoz Oksidaz'ın Reaksiyon Mekanizması

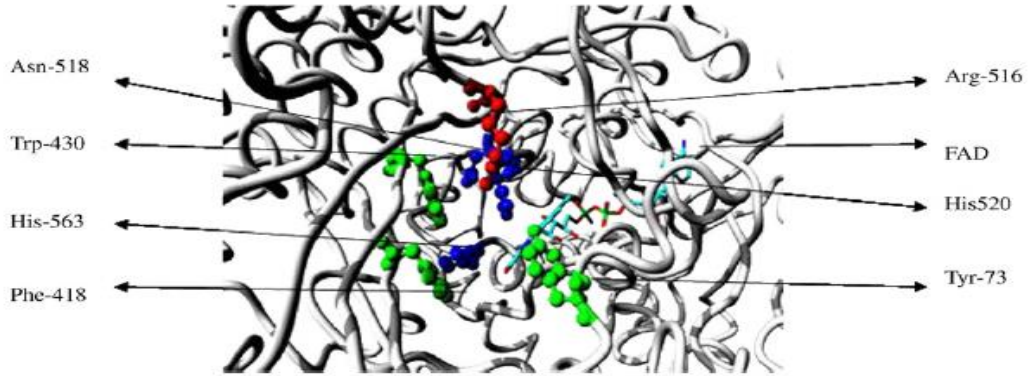
GOD elektron alıcısı olarak moleküler oksijenin kullanıldığı β -D-glukozun D-glukano- δ -laktona ve H_2O_2 'ye oksidasyonu katalizleyen bir flavoproteindir. Bu reaksiyon indirgeyici ve yükseltgeyici basamak olarak ikiye ayrılır. İndirgeyici yarı reaksiyonda GOD β -D glukozun enzimatik olmayan şekilde glukonik aside hidroliz olan D-glukano- δ -laktona oksidasyonu katalizler. Akabinde GOD yapısındaki flavin adenin di nükleotid (FAD) $FADH_2$ 'ye indirgenir. Oksidatif yarı reaksiyonda ise moleküler oksijen varlığında indirgenmiş GOD reoksidasyonla H_2O_2 ürüne dönüşür. İndirgenmiş $FADH_2$ de FAD'a katalize olur. H_2O_2 katalaz (CAT) enzimi vasıtasıyla suya ve oksijene ayrışır. Witteveen glucano- δ -laktonun glukonik aside hidrolizini katalizleyen laktonaz enzimini *Aspergillus niger*de bulmuştur [20], [23].



Şekil 2. 13 Glukoz oksidazın reaksiyon mekanizması [24].

2.2.5 Glukoz Oksidaz Enziminin Yapısı

Glukoz oksidaz disülfid bağlarıyla birbirine kovalent bağlı iki benzer polipeptid zinciri içeren dimerik bir glukoproteindir [20], [25]. P.amagasakiense GOD yapısına göre her bir altbirim yapıya kovalent bağlı olmayan, her bir dimere gevşek bağlanmış bir mol kofaktör FAD kısmı içermektedir. Glukoz oksidazın yapısında bulunan FAD, enzimin üç boyutlu yapısını stabilize etmektedir ve nötral pH değerlerinde diyaliz ile uzaklaştırılmaktadır [20], [22]. Ayrıca her alt birim bir mol şelat iyonu içermektedir [23]. Glukoz oksidaz molekül ağırlığının %10-16 sı kadar yüksek mannoz tipinde karbonhidrat içeriğine sahiptir. Karbonhidrat kısımları enzime N- veya O- glikozid bağlarıyla bağlanmıştır. Glukoz oksidazın temel yapısındaki tek bir polipeptid zincirinin bir alt birimi 583 amino asit rezidüsüne sahiptir [21]. Glukoz oksidaz'ın aktif bölge rezidüleri Tyr-73, Phe-418, Trp-430, Arg-516, Asn-518, His-520 ve His-563 dir. Arg-516 GOD'nin β -D-glukoz etkili biçimde bağlanması için en önemli aminoasittir. GOD yapısındaki Tyr-73, Phe-418 ve Trp-430 aromatik rezidüleri glukoz oksidasyonun maksimum hızlı olmasının yanında substratın doğru yönelmesinde de önemli rolleri vardır [20].



Şekil 2. 14 GOD yapısındaki FAD kısmı ve aktif bölgedeki amino asit rezidüleri [20]

2.2.6 Glukoz Oksidaz Enzimin Genel Özellikleri

GOD molekül ağırlığı yaklaşık olarak 130-175 kDa arasında değişmektedir. GOD D-glukozun β anomeri için oldukça spesifik iken aynı spesifikliği α -anomeri için göstermemektedir [20]. D-glukozun β -anomerinin reaksiyonu 20 °C 'de α -anomerine göre 150 kat hızlı olmaktadır [22]. 2-deoksi-D-glukoz, D-mannoz ve D-galaktoz substrat

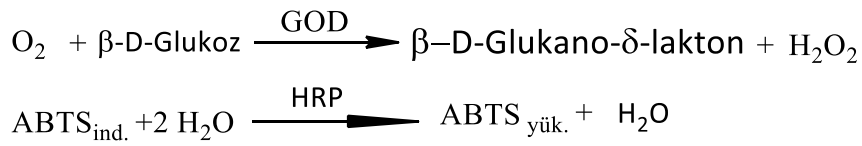
olarak kullanıldığında GOD düşük bir aktivite göstermektedir. GOD'nin başlıca inhibitörleri p-kloromerküribenzoat, Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} , hidroksilamin, hidrazin, fenilhidrazin, dimedon ve sodyum bisülfittir. Nakamura ve Fujiki 1968 yılında gerçekleştirdiği çalışmada *A.niger* ve *P.amagasakiense*'den elde edilen GOD enziminin molekül ağırlıklarının sırasıyla 152 ve 150 kDa olduklarını bulmuştur. Her iki kaynaktan elde edilen GOD'nin başlıca glukoz, mannoz ve hekzoamin olmak üzere benzer karbohidratları içermektedir. Yalnız *A. nigerden* elde edilen GOD'nin *P. Amagasakienseye* göre daha fazla mannoz ve hekzoamin, daha az glukoz içermektedir. GOD'nin karbohidrat içeriği *A.nigerde* %16, *P.amagasakiense* de %11 olarak bulunmuştur. Her iki kaynaktan elde edilen GOD'nin amino asit içeriğine baktığımızda *A.niger* GOD *P.amagasakiense* GOD'e göre daha fazla histidin, arginin, tirozin daha az lizin ve fenilalanin içerir. Her iki kaynaktan elde edilen GOD'nin optimum pH aralıklarına baktığımızda *A.niger* GOD'nin optimum pH aralığı 3.5-6.5; *P.amagasakiense* GOD'nin optimum pH aralığı 4.0-5.5 arasındadır [20]. Genellikle GOD'nin optimum pH değeri 5.5 olarak bilinir [23]. *A.nigerden* elde edilen God *P.amagasakienseden* elde edilene göre daha geniş pH aralığı vardır. GOD'nin izoelektrik noktası 4.2-4.4 civarındadır [25].

2.2.7 Glukoz Oksidaz Enziminin Aktivite Analizleri

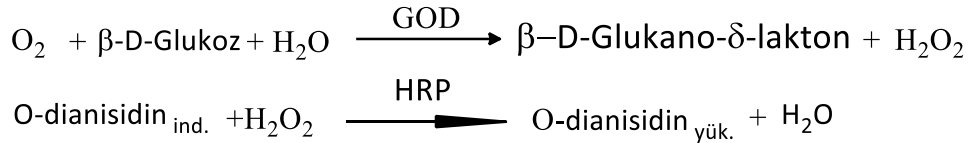
GOD enziminin tayini için literatürde birçok analitik metot bulunmaktadır. Tongbu (1996) GOD tayini için titrimetrik metodu kullanmıştır. Bu metotta enzim çözeltisi %2 lik β -D-glukoz bulunan asetat tamponuna eklenir ve sodyum hidroksit çözeltisi eklenmesiyle reaksiyon durdurulur. Karışım standart hidroklorik asit çözeltisiyle titre edilir ve eklenen standart hidroklorik asit çözeltisinin hacmi hesaplanarak GOD aktivitesi hesaplanır.

Birçok araştırmacı oksijen varlığında GOD'nin β -D-glukozun β -D-glukano- δ -laktona ve H_2O_2 'ye oksidasyon reaksiyonunu baz alan analitik metodu kullanmaktadır. H_2O_2 ikincil bir reaksiyonda, HRP enzimi vasıtasıyla kromojenik bir substratın renk değişimiyle sonuçlanan yükseltgenmesinde kullanılır ve bu renk değişimi spektroskopik olarak ölçülür. GOD reaksiyonunda iki kromojenik substrat kullanılır. Bunlar 2,2'-Azino-di-[3-

etilbenzthiazolin-sülfonat] (ABTS) ve o-dianisidin. ABTS formunda yeşilimsi mavi bir oksidasyon ürünü oluşur ve bu ürün 420 nm’de spektroskopik olarak ölçülür.



Şekil 2. 15 Kromojenik substrat olarak ABTS kullanıldığında GOD reaksiyonu [20]



Şekil 2. 16 Kromojenik substrat olarak o-dianisidin kullanıldığında GOD reaksiyonu [20]

O-dianisidin oksidasyonu sonucunda 500nm’de spektroskopik olarak ölçülen kinonimin boyası oluşmaktadır [20].

2.2.8 Glukoz Oksidaz Enziminin Kullanım Alanları

GOD’nin kimya, biyoteknoloji, eczacılık, yiyecek ve içecek, klinik kimya ve diğer endüstrilerde birçok uygulama alanları olmasından dolayı son birkaç yılda ticari önemi kat ve kat artmıştır. Ayrıca ucuz ve kararlı olmasından dolayı glukoz tayininde analitik reaktif olarak en yaygın kullanılan enzimdir.

God başlıca balık, bira, konserve yiyecek ve içeceklerde oksijenin uzaklaştırılması, tat, raf ömrü ve kokunun iyileştirilmesinde kullanılır. Ayrıca mayonezdeki ekşimeyi de önlemektedir. Gıda endüstrisinde glukoz oksidaz enzimi gıdanın kalitesini korumak amacıyla da kullanılır [20]. Örneğin yumurtanın kurutulması sırasında Maillard reaksiyonun ve buna bağlı rengin bozulmasını önlemek için yumurtanın bileşimindeki az miktardaki glukoz, glukoz oksidaz ile okside edilerek kurutmadan önce ortamdaki uzaklaştırılır. Ancak bu uygulama ortamdaki glukozun az olması halinde başarılı sonuç vermektedir [26].

Glukoz oksidaz en çok endüstriyel çözeltilerde ve kan, üre gibi vücut sıvılarında glukoz tayininde kullanılır. Özellikle diyabet hastalarında kandaki glukoz değerinin sürekli takip edilmesi gereklidir. Biyosensörler kandaki glukoz değerinin ölçülebilen cihazlardır. GOD biyosensörlerde kullanılan uygun enzimlerden biridir.

Biyoyakıt hücreleri katalizörleri kullanarak biyokimyasal enerjiyi elektriksel enerjiye dönüştürürler. Biyoyakıt hücrelerinin bir çeşidinde biyokatalizör olarak enzimler kullanılır ve GOD kullanılan enzimlerden birisidir [20].

GOD şarap endüstrisinde de kullanım alanına sahiptir. Glukozu δ -glukano-1, 5-laktone dönüştürerek glukozun alkole dönüşmesi önlenir ve bu sayede şarapta alkol içeriğini ayarlayarak bakterisit etkisiyle şarabın bozulmasını önler ve özelliklerini iyileştirir [20], [27].

GOD ağız ve diş bakımı ürünlerinde anti mikrobiyal ajan olarak kullanılır. GOD'nin ürünü H_2O_2 kullanışlı bir bakterisit olarak rol oynar.

GOD ayrıca glukonik asidin ticari kaynağı olarak kullanılır. Gıda endüstrisinde glukonik asit regülatörü olarak davranarak gıda katkı maddesi olarak, sterilizasyon çözültisi olarak ya da renk açıcı olarak kullanılır. Aynı zamanda metal ve deri endüstrisinde asitlik düzenleyicisi olarak kullanılmaktadır. İnşaat endüstrisinde anormal hava koşullarına karşı stabilite ve direnç artısını sağlayan bir çimento katkısıdır.

GOD tekstil endüstrisinde beyazlatma için bir metot olarak kullanılan H_2O_2 üretiminde kullanılır [20].

2.2.9 Enzim Stabilizasyonu

Endüstriyel enzimlerin stabilite çalışmaları biyoteknolojin en önemli konularından biridir [28]. Birçok alanda özellikle biofarmakoloji ve biomedikal alanlarındaki protein uygulamalarındaki büyük artış sebebiyle enzim stabilizasyonunun önemi giderek artmıştır [29]. Özellikle immobilize ve stabil enzimlerin biyosensör olarak kullanılması klinik, endüstriyel ve çevresel örneklerin enzimatik analizinde çok büyük bir potansiyeldir [30]. Enzimler birçok avantajlarından dolayı endüstride kullanımı giderek artmıştır. Ancak enzimlerin endüstrinin tüm uygulamalarında kullanımı hala kısıtlamalar içermektedir. Endüstriyel katalizör enzimler çalışılan ortamlar altında ve saklama koşullarında uzun bir süre stabil olmalıdırlar. Enzimin saklama koşullarındaki sorunlar ortamdaki nem ve mikrobiyal kontaminasyon gibi istenmeyen etkilerden kaynaklanır. Birçok enzim çevresel küçük bir değişimle sıcaklıkla, pH ile kimyasal ajanlarla, proteazlarla, çevresel modifikasyonla ve radyasyonla kolaylık inaktive olabilir [31], [39]. Protein denatürasyonu aminoasit sırasını değiştirmeksizin proteinin doğal üç

boyutlu yapısındaki küçük ya da büyük değişimleri içeren bir prosestir. Protein stabilizasyonu ise bu noktada bu değişimleri engelleyen ve proteinin doğal yapısını koruyan bir yöntemdir [39]. Genel olarak enzim stabilizasyon yöntemleri çeşitli yollarla gerçekleştirilebilir.

- Ekstrem koşullarda yaşayan mikroorganizmalar üzerinde yapılan çalışmalarla doğal olarak çok yüksek stabiliteye sahip enzimlerin izole edilmesi
- Kimyasal modifikasyon
- Protein mühendisliği
- İmmobilizasyon yöntemleri
- Stabilize edici katkı maddelerinin eklenmesi [30], [31], [39].

Ekstremofil canlılar (termofilik ve halofilik gibi) sıcak kaynaklar ve yüksek iyonik kuvvetteki tuzlu ortamlar gibi kötü çevre koşullarında yüzlerce bar basıncında ve 0°C'nin çok altındaki sıcaklıklarda yaşamaktadırlar. Ekstremofiller üzerine yapılan araştırmalar yüksek stabil enzimlerin umut verici kaynakları olarak değerlendirilmektedir. Ekstremofillerin kullanımı ile ilgili problemler güvensiz olarak kabul edilen yavaş büyüyen organizmalardaki güçlüklerinden dolayı izolasyonu ve üretimindeki zorluklardır [30]. Termofilik enzimler sıcaklık ortamlarında oldukça stabildir. Dahası üre, deterjanlar, organik çözücüler, preteolitik enzimler gibi birçok yaygın protein denatürasyonlarına karşı yüksek bir stabilite gösterir.

Son yıllarda enzimlerin stabilizasyonunu artırmak için farklı kaynaklardan elde edilen proteinlerin üç boyutlu konformasyonları ve bileşimleri karşılaştırarak uygun enzimlere kimyasal olarak modifiye yöntemi kullanılmıştır. Protein yüzeyinde yapay hidrofiliizasyon sağlanabilmesi için -NH₂ grupları farklı reaktiflerle tercihen alkilasyon veya açılasyon reaksiyonlarıyla modifiye olmaktadır. Genel olarak protein yüzeyindeki hidrofiliizasyonun sağlanabilmesi enzim stabilitesinin artmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu etki su molekülleriyle etkileşerek enzimi destabilize eden protein yüzeyinde lokalize olan polar olmayan grupların azaltılmasıyla açıklanabilir.

Glutaraldehit, diamidat ya da ditioller gibi bir ya da polifonksiyonel ajanlarla yapılan retikülasyon protein molekülünün bir ya da birçok bölgesine intra moleküler çapraz

bağlarla bağlanmasıdır. Bu eklenen bağlar birçok denatürasyon faktörlerine karşı enzim stabilitesini ve protein yapısının rijiditesini artırmaktadır.

Enzim stabilizasyonunda en etkileyici ve heyecanlı uygulamalar şüphesiz ki genetik mühendisliği alanındaki yeni teknolojik gelişmelerdir. Rekombinant DNA teknikleri yönlendirilmiş mutagenез yoluyla doğal proteinlerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerini dizaynı ve modifiyesi için fırsat sunar ve onları ilgili prosese uyarlar. Ek olarak, bir DNA molekülünün kimyasal sentezinin yürütülme olasılığının olması spesifik amino asitlerinin birleşimini ve doğada bulunmayan yeni proteinlerin üretimini sağlar [39].

Belirli bileşenlerin enzim çözeltisine eklenmesi enzim stabilizasyonunda belirgin bir etki yaratmaktadır. Bu bileşenler başlıca tuzlar, poliooller (polietilen glikol, gliserol), polimerler (dekstran), bovine serum albumin, polietilenimin, polielektrolitler, organik osmolitler, organik çözücüler, şekerlerdir. Uygun katkı maddelerin seçilmesi enzimin doğasına bağlıdır [31], [39]. Bu bileşiklerin çoğu enzimatik reaksiyonun substratı ya da ürünü, allosterik efektörü, koenzimi ya da koenzim türevi olduğu için protein molekülüne çok güçlü bağlanır. [39]. Bu katkı maddelerin kullanımı özellikle enzimlerin daha uzun süre stabilize kalmalarını sağlamak için iyi bir yöntemdir [31].

2.2.10 Enzimlerin İmmobilizasyonu

Enzimlerin immobilizasyon çalışmaları 1960 yıllarından beri giderek artış göstermiştir ve şu anda hem biyokimyada temel çalışmalarda hem de biyoteknolojide pratik uygulamalarda çok geniş çapta çalışılmaktadır [39].

Katı taşıyıcılara immobilizasyon biyokatalizörün işlevsel stabilitesini artırmaktadır, çalışmanın kontrolü daha iyi hale getirir, kataliz kontaminasyonu ve reaktör dizaynının esnekliği olmaksızın daha kolay ürün geri kazanımı sağlamaktadır. Bu sebeple immobilizasyon belki de en çok kullanılan yöntemdir. Dahası, inhibisyonu azaltmaktadır, çözünür enzimlere nazaran seçiliği ve fonksiyonel özellikleri daha iyidir [30].

İmmobilize enzimlerin biyoteknolojik uygulamaları genel olarak birçok alanı kapsasa da özellikle klinik ve analitik kimya, medikal, gıda, ilaç teknolojisi, organik sentez ve kimyasal bileşiklerin endüstriyel sentezi gibi alanlarda kullanılmaktadır.

Son yıllarda biyolojik aktif proteinlerin immobilizasyonunda birçok yöntem geliştirilmiştir ve bütün enzimler için evrensel uygun bir teknik belirlemek oldukça güçtür. Immobilizasyon metodunun en uygun seçimi immobilize edilecek enzimin tipine bağlıdır [39].

Enzimlerin immobilizasyonunda başlıca 5 yöntem kullanılmaktadır.

- Kovalent bağlama
- Tutuklama
- Adsorpsiyon
- Çapraz bağlama
- İyonik bağlama [1], [25].

Kovalent bağlama: Biyoreseptörün transducer yüzeyine kimyasal bir reaksiyon sonucu kovalent bağlanmasıdır. Bağlanma çok yumuşak koşullarda(oda sıcaklığı, nötral pH vb.) yapılmalıdır. Kovalent bağlanma enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar(karboksil, amino, sülfidril, tiyoester imidiazol) üzerinden gerçekleşir [1], [25]. Enzimin kovalent immobilizasyonunda bazı aktivite kayıpları yaşanabilir. Bunların başlıca nedenleri; sterik engel (aktif bölgenin kısmen bloke edilmesi), difüzyonun sınırlandırılması ve yapısal değişikliklerdir [40].

İyonik bağlama: Bu yöntem iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılarla enzimin iyonik bağlanmasını esas alır. İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleşir ve enzimin aktif merkezinde değişikliğe neden olmaz. Bağlanma kovalent bağ kadar kuvvetli olmadığından uygulama sırasında enzimin yüzeyden kaçışı sorun olmaktadır [25].

Çapraz bağlama: Enzimler çapraz bağlayıcı bi ya da multi fonksiyonel gruplar ile çapraz bağlar oluşturarak suda çözünmeyen kompleksler oluştururlar. Başlıca çapraz bağlayıcı reaktifler glutaraldehit, heksametilen, diizo siyanat, diflorodinitro benzendir. En çok kullanılanı ise glutaraldehittir. Çapraz bağlama reaksiyonu çok yumuşak koşullarda gerçekleşmediği için aktivite kayıpları olabilmektedir [1], [25], [41].

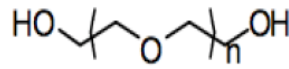
Adsorpsiyon: Bu metot immobilizasyon yöntemleri içerisinde en kolay metottur. Enzim yüzey aktif adsorbentin yüzeyine fiziksel olarak adsorbe olur. Enzimin adsorbente

bağlanmasında etkili olan vander walls kuvvetleridir. Bu yöntemin; immobilizasyonu basit olması, enzim immobilize oluyorken ayrılması ve saflaştırılması mümkün olması, enzimin adsorpsiyon olurken genelde deaktive olmaması, adsorpsiyonun dönüşümlü bir proses olması gibi avantajları mevcuttur. Bağlanmanın zayıf olması, immobilizasyonun çözeltinin pH'sına, sıcaklığına ve iyonik kuvvetine bağımlı olması gibi dezavantajları vardır [41].

Tutuklama: Enzim belirli bir mekanda durmaya zorlanarak bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz durumdadır. Tutuklama polimer matriks içindeki kafeslerde veya yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ile gerçekleştirilebilir [25]. Bu yöntemde enzim herhangi bir kimyasal bir modifikasyona uğramadığından yöntem çok büyük bir avantaja sahiptir. Bu sebeple enzimin kendine özgü özellikleri değişmemektedir. Ancak enzim jel matrikslerde deaktive olabilmektedir. Enzim kaçıışı da aynı zamanda bir problemdir [41].

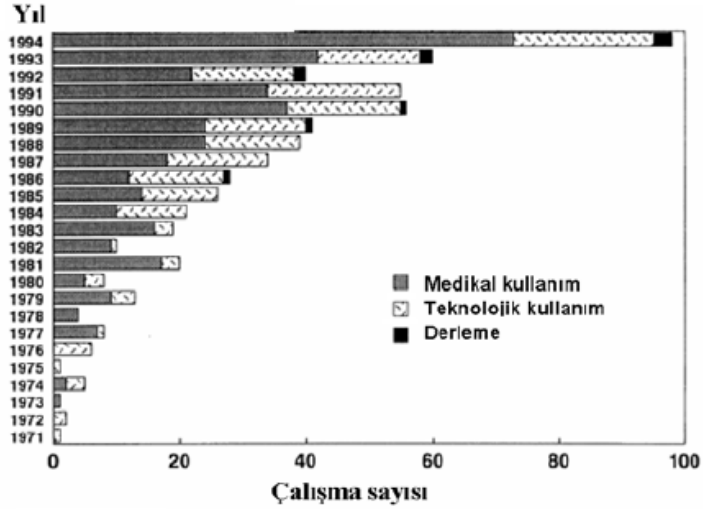
2.3 Polietilen Glikol (PEG)

Polietilen glikol (PEG) tekrarlanan etilen oksit birimlerinden oluşan molekül ağırlığı 500 Da- 30 kDa arasında değişen lineer ya da dallanmış halde bulunan bir maddedir [20].



Şekil 2. 17 Polietilen glikol' ün (PEG) kimyasal yapısı [42].

PEG en çok ilgi çeken ve çok yönlü olan bir polimerdir [33]. PEG ve türevleri protein modifikasyon çalışmalarında oldukça fazla kullanılmaktadır. Şekil 2.18' de görüldüğü gibi her geçen sene PEG ile yapılan çalışmalar artmaktadır [42].



Şekil 2. 18 PEG veya türevleri ile protein modifikasyonunun yapıldığı çalışmalar [42].

PEG ve türevleri lubrikant, çözücü, bağlayıcı, lastik endüstrisinde, gıda, farmakoloji, kozmetik, tarım, tekstil, kağıt, petrol ve birçok endüstride kullanılır [35].

PEG'nin bu çekiciliği hidrofilik, toksik ve immünojik olmaması gibi bazı avantajlı özelliklerine bağlıdır [21]. PEG Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'den alınan onay ile klinik çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır [32], [33], [42]. PEG'nin yapısındaki her etilen oksit biriminin 2-3 su molekülüyle koordinasyonundan dolayı kendine özgün eşsiz çözünme özellikleri vardır. Bu yüksek çözünme PEG molekülünün esnekliğinin yüksek olmasıyla beraber yapıya biyouyumluluk, immünojenik olmayan ve antijenik olmayan özellikler kazandırmaktadır. Çözünmenin diğer önemli sonucu aynı molekül ağırlığındaki globüler proteine göre hidrodinamik açıdan 5-10 kat fazla büyüyebilir [33], [34].

2.3.1 Pegilasyon

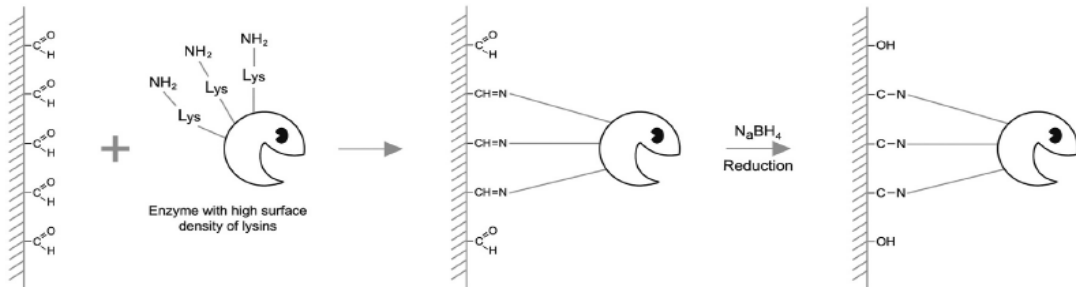
Pegilasyon basitçe protein, peptit ya da bunların dışındaki moleküllerin bir veya daha fazla PEG zincirinin bağlanması ile modifikasyona uğratılmalarıdır. Pegilasyon işlemi genellikle proteinlerin amino gruplarının açılasyon ve alkilasyon reaksiyonları ile oluşmaktadır. Bunun sebepleri amino gruplarının nükleofilik olarak aktif oluşları ve proteinlerin yüzeyinde yer almalarıdır [27], [35].

PEG'nin proteinler, peptitler gibi moleküllere bağlanabilmesi için bir ya da iki terminalinde de fonksiyonel grup içerecek şekilde aktive edilmeleri gerekir.

Fonksiyonel grup, molekülde bulunan ve PEG ile birleşecek uygun reaktif grubun tipine göre seçilmelidir. Protein ve peptitlerin yan zincirlerindeki reaktif amino grupları (lisin, arjinin), sülfhidril (sistein), hidroksil (serin, treonin), karboksi (aspartik asit, glutamik asit) yada N-terminal amino ve C-terminal karboksilik asittir. Glikoproteinlerde ise hidroksil grupları kullanılır [27], [32].

Protein ve peptitlerin pegilasyonu için çoğunlukla lisin, arjininin uygun primer amin gruplarından yada N-terminal amino gruplarından yararlanır [32].

Polimerdeki yüksek reaktiflikte ki aldehit gruplarıyla protein yapısındaki amino grupları arasındaki reaksiyonla geri dönüşümlü imino grupları oluşmaktadır. Daha sonra yapı NaBH_4 ile indirgenerek aldehit gruplarının inert hidroksil gruplarına dönüşümü engellenir hem de aynı zamanda geri dönüşümlü schiff baz yapısı tamamıyla dönüşümsüz kovalent bağlarına dönüşür [29].

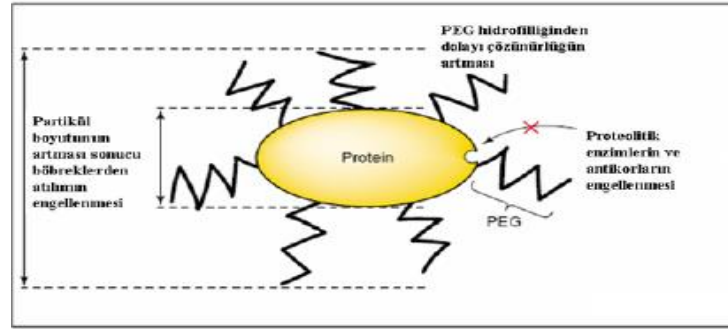


Şekil 2. 19 Polimer enzim arasındaki kovalent immobilizasyon [29].

Pegilasyon işlemi sonucu elde edilen konjugatlar aşağıda belirtilen özellikleri göstermektedir [42].

- PEG, protein yüzeyini sterik engellemeyle maskelemekte ve degrade edici ajanlara karşı korumaktadır.
- Polipeptidin moleküler büyüklüğünü artırmakta ve bunun sonucunda renal ultrafiltrasyonu azaltmaktadır.
- Antikor ya da antijen işleyici hücrelerin teması da PEG zincirlerince engellenmektedir.
- Protein immünojenisitesi azalmakta veya elimine edilmektedir.

- PEG fizikokimyasal özelliklerini bağladığı peptit ya da nonpeptit moleküle taşımakta ve böylece o maddenin biyo dağılım ve çözünürlük özellikleri değişmektedir.
- Enzim ve biyoaktif maddeler organik çözücü veya sulu çözeltilerde çözünmektedir.
- İn vivo olarak PEG-protein konjugatının atılımını ve kandaki sirkülasyon süresini uzatmaktadır.
- Protein ve biyoaktif maddelerin fizyolojik özelliklerini stabilize etmektedir.
- Çeşitli etkin maddelerin farmokinetik özelliklerini stabilize etmektedir.
- Biyolojik moleküller, membranlar, hücre partikülleri ve hücreler ayrılmaktadır.
- Tümörlü dokularda birikimi artırmaktadır.

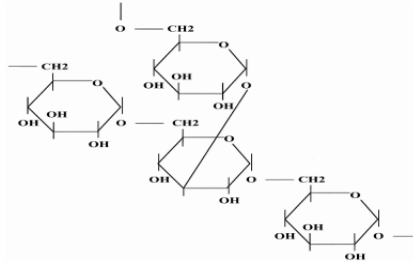


Şekil 2. 20 Pegilasyona uğramış proteinin avantajları [36].

PEG'nin geniş kullanım alanı olmasına rağmen kullanımını kısıtlayan bazı durumlar vardır. PEG tüm sentetik polimerler gibi farklı sayıda monomerleri olan polidispers yapıdadır. Bu durum bazı ilaç konjugatlarının vücutta kalma süresi ve immünojenitesi açısından farklı biyolojik özellik göstermesine neden olabilmektedir. Ayrıca PEG diğer polimerler gibi idrar veya feçesle atılmaktadır. Ancak yüksek molekül ağırlığına sahip ise karaciğerde birikerek makromoleküler sendroma sebep olabilir [42], [36]. PEG-asparajinaz ve PEG-ürikaz ile tedavi edilen hastaların serumlarında terapitik etkiyi kaybetmesiyle tedavi için nötr bir etkiyle sonuçlanan spesifik anti-PEG antikoru bulunmuştur [33].

2.4 Dekstran

Dekstran muhtemelen ilk ve en çok çalışılan polimerlerden birisidir. Dekstran bakteriler tarafından üretilen bir polimerdir. Polimer başlıca glukoz monomerlerinin α -1,6-glukozid bağlarıyla bağlanmış bir polimerdir. Bazı durumlarda yapıda dallanma gösteren 1,3- glukozid bağları da oluşmaktadır. Dallanma derecesi polimerin kaynağına göre %0.5 ile %60 oranında değişmektedir. Dekstranın dallanma derecesi sudaki çözünürlüğünü etkilemektedir. Yapıda ne kadar çok dallanmış varsa, çözünürlüğü o kadar düşük olmaktadır [33]. Bu sebeple ticari olarak kullanılan dekstranların çoğu yüksek derecede suda çözünmeyi sağlayan düşük oranda dallanmış yapı içermektedir (%0.5). Yüksek suda çözünebilirliğinin yanı sıra dekstran polimeri zayıf asit ve baz ortamlarında kararlıdır ve konjugasyon için bir çok hidroksil grubu içermektedir. Bu elverişli fizikokimyasal karakteristikleri ile birlikte ucuz olması ve klinik uygulamalarda bir tarihi olması dekstranı içeceklerde ya da protein taşıyıcısı olarak kullanımı ilgi çekici halde getirmiştir [37].



Şekil 2. 21 Dekstran polimerinin kimyasal yapısı [37].

Dekstran klinik uygulamalarda plazma hacminin artırılması, periferik akışın yükseltilmesi ve anti trombosit ajan olarak kullanılır. Dekstran biyoyumlu ve biyobozunur polimerdir. Bu sebeple başlıca kan dolaşımındaki terapitik ajanların dayanırlıklarını artırır, ilaç ve proteinlerin taşıyıcısı olarak kullanılırlar [25], [37].

Hidrofilik polimerlerle enzim yüzeyinin minimum modifikasyonu enzim yüzeyinin çevresinde bir kabuk oluşturmak ve hidrofobik ara yüzeylere karşı etkileşiminin engellenmesi için iyi bir stratejidir. Modifikasyon sonrası polimer enzimin sadece küçük moleküllerle etkileşimine izin vermemeli, ayrıca enzimin hidrofobik ara yüzeylerle etkileşimini engellemek amacıyla oldukça hidrofobik karakterde olmalıdır. Ayrıca seçilen polimer, enzim yüzeyiyle etkileşecek reaktif grupları barındırmalıdır. Dekstran

aldehit bütün koşulları yerine getirebilen esnek bir polimerdir ve çapraz bağlı immobilize multimerik enzimlerde hidrofobik ortamların oluşturulmasında ve makromoleküllerle destek materyallerinin etkileşimlerini azaltmaktadır [28].

Dekstran sülfat polianyonik bir dekstran türevidir olup klinik çalışmalarda antikoagülant olarak kullanılabilir [38].

2.4.1 Dekstran Protein Konjugasyonu

Önceki çalışmalarda dekstran streptokinaz enzimiyle konjuge edildi ve daha sonraları Rusya’da klinik uygulamalarda kullanılarak insanlarda test edilen ilk protein konjugasyonu idi. Polimerdeki serbest hidroksil grupları periodat ile okside olarak proteindeki amino gruplarıyla reaksiyona giren aldehit gruplarına dönüşür [33]. Bu sayede enzimin polimere çoklu kovalent bağlarla bağlanmasıyla daha rijid bir yapı oluşur [29].

Bu metot hala genel olarak dekstran ve polisakkaritlere proteinlerin bağlanmasında uygulanıyor olmasına rağmen reaksiyon ortamı iyi kontrol edilmezse polimer omurgasındaki çeşitli bağlayıcı gruplar tarafından istenmeyen çapraz bağlı bileşikler oluşabilmektedir

Polisakkaritlerin sodyum periodatla muamelesiyle gerçekleşen oksidasyon reaksiyonunda iki aldehit grubu oluşur. Daha sonra bu aldehit grupları proteinlerle reaksiyonunda hangi aldehit grubunun reaksiyona gireceği ve aldehit gruplarının reaktivlikleri arasındaki fark bazı problemlere neden olmaktadır. Sonuç olarak reaksiyon şartları iyi düzenlenmezse istenilen düzeyde bir konjugasyon gerçekleşemez [33].

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

Kaba terazi:	: Precise BJ 6100D
Hassas terazi:	: Precise XB 220A
Manyetik karıştırıcı:	: Heidoloph MR 3001
pH metre cihazı:	: Inolab
Vorteks:	: Heidolph Type REAX top
Saf su cihazı	: Millipore F4SN77678
Su banyosu	: GFL 1086
Liyofilizatör	: Telstar Cryodos
U.V. Visible Spektrofotometre	: Model V-530 JASCO Program
GPC sistemi	: Viscotek 4 detektörlü SEC-HPLC-GPC
FT-IR Spektrofotometre	: “Pelkin Elmer Spectrum One” marka (Universal ATR Sampling Accessory)
Ultrafiltrasyon cihazı	: Model 8010 “Stirred Ultrafiltration Cell” Millipore
Potansiyometre cihazı	: Laboratuvar yapımı multi kanallı potansiyometre

Ag / AgCl referans elektrod : BiomArge

3.1.2 Kullanılan Malzemeler

Beher : 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 1 L

Otomatik pipet :Ependorf 0-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl

Ependorf tüpleri

Deney tüpleri

Penisilin şişeleri

Manyetik karıştırıcı magnetleri

Kuvartz küvet : 1 ml, 5 ml

Saat camı

Pasteur pipetler

Plastik kablolar

Bakır tel

3.1.3 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çizelge 3. 1 Kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Maddeler	Üretici Firma	Katalog No
Glukoz Oksidaz <i>Aspergillus niger</i>	Sigma	1345292V
HRP	Fluka	49180
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Riedel-de Haen	31432
NaHPO ₄ .7H ₂ O	Fluka	71647
Polietilen glikol M _w :20.000	Sigma	BCBB3752
Asetik asid	Fluka	45754

Çizelge 3.1 Kullanılan kimyasal maddeler (devamı)

H ₂ SO ₄	Merck	K31996213315
o-dianisidin	Fluka	33430
D -(+)- Glukoz Anhidrat	Fluka	49138
NaIO ₄	Fluka	71862
NaBH ₄	Merck	S6177973 107
Ultrafiltrasyon membran Rejenere Selüloz	Millipore	K6HN4528
Tris- HCl	Sigma	3675235
Grafit	Fluka	426277/1
Polimetil metakrilat	Imicryl	12280
Quinhydrone	Aldrich	STBB2147V
2-Nitrofenil oktil eter	Fluka	73732
Poli vinil klorür	Fluka	81392
Sodyum tetrafenil borat	Carlo Erba	483751
Trioktil amin	Aldrich	MKBL6960
Tampon Tabletleri (pH 4, pH 7)	Fluka	82560

3.2 Deneylerin Yapılışı

3.2.1 GOD enziminin Aktivite Tayini

Kullanılan Reaktifler;

0,01 M pH 7 PBS tamponu

%25 Glukoz çözeltisi

10 mM o-dianisidin

0,01 mg/ml HRP enzim çözeltisi

0,005 mg/ml GOD enzim çözeltisi

1M H₂SO₄ çözeltisi

Deneyin yapılışı; 25 °C deki su banyosunda bekletilen deney tüplerine sırasıyla 780 µl PBS tamponu, 50 µl glukoz, 25 µl o-dianisidin, 15 µl HRP enzim çözeltisi ve 30 µl GOD enzim çözeltisi konularak reaksiyon başlatılır. 10 dakika sonra 100 µl 1 M H₂SO₄ eklenmesiyle reaksiyon durdurulur. UV spektrofotometrede 400 nm dalga boyunda (A₄₀₀) absorpsiyon spektrumları okunur [43]. Sülfürik asit eklenmesiyle tüplerde turuncudan sarıya dönen bir renk değişimi gerçekleşti ve oluşan ürün 400 nm’de pik vermiştir.

Aktivite ünite hesaplaması: Bir ünite GOD aktivitesi, pH 7 ‘de 1 dakikada 1 µ mol β-D-glukozun D-glukon-δ-lakton ve H₂O₂’e dönüşmesini katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır [44]. Aşağıda verilen (2.1) eşitliği vasıtasıyla hesaplandı.

$$U/ml = \frac{A_{400} \times 10^6}{M_{\epsilon} \times t \times C_{GOD}} \quad (2.1)$$

3.2.2 Enzim Polimer Konjugatlarının Sentezi

PEG’in 20.000Da boyutları kullanılarak aldehit türevleri sentezlenerek; aldehit yapısındaki karbonil grubu ile proteinin aktif bölgesindeki amin grubu arasında kondensasyon reaksiyonu gerçekleşmesi sonucunda bir schiff bazı olan enzim-polimer konjugatları elde edildi.

3.2.2.1 PEG Aldehit Türevinin Eldesi

Kullanılan çözeltiler;

- 3,33 g PEG (20.000Da) 30 ml distile suda çözülmesiyle elde edilen çözelti
- 8 g NaIO₄ 70 ml distile suda çözünmesiyle elde edilen çözelti

Deneyin yapılışı;

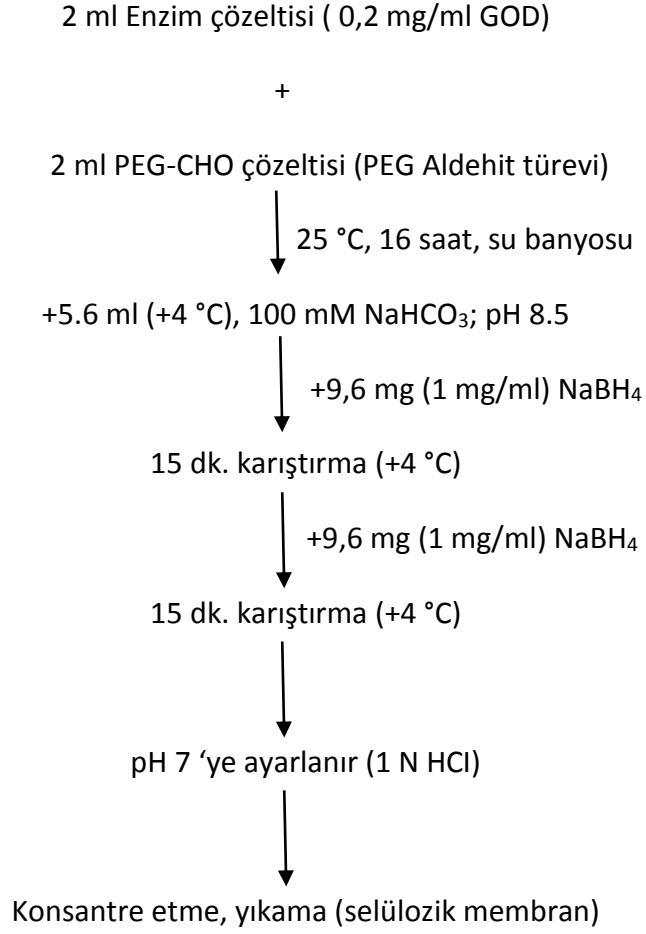
- NaIO₄ PEG çözeltisinin üzerine yavaş yavaş karıştırılarak eklendi

- Bu çözelti oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 24 süre boyunca karışmaya bırakıldı
- Ortamda bulunan fazla iyonları uzaklaştırmak için elde edilen yükseltgenmiş PEG'i 24 saat oda sıcaklığında karanlık ortamda distile suya karşı diyalize bırakıldı.
- Ürün liyofilizatörde kurutularak aldehit grupları içeren PEG elde edildi

3.2.2.2 GOD PEG Konjugatlarının Sentezi

Glukoz oksidaz (GOD) ile 20.000Da PEG' in aldehit türevinin kovalent konjugatları sentezlendi.

Toplamı 4 ml reaksiyon hacminde olacak şekilde konjugasyon reaksiyonu yapıldı. pH 7 de 0,1 M fosfat tamponu (PBS) kullanıldı. Protein konsantrasyonu $C_{\text{protein}} = 0,2 \text{ mg/ml}$ olacak şekilde enzimden $0,2 \text{ mg/ml} \times 2 \text{ ml} = 0,4 \text{ mg}$ proteine karşılık gelen hacim alındı. PEG konsantrasyonu farklı oranda konjugatlar için aşağıda belirtilen formül ile hesaplandı. Penisilin şişelerinde protein-polimer (2 ml enzim+ 2 ml PEG) reaksiyonu 25°C'deki su banyosunda 16 saat bekletildi. Sonra, çözeltinin pH'sını artırmak için 100 mM pH 8,5 sodyum bikarbonat (NaHCO_3) çözeltisinden 5,6 ml eklendi. Daha sonra, aldehit gruplarını ve amino aldehit bağlarını indirgemek için 9,6 mg (1mg/ml) sodyum borhidrür (NaBH_4) eklendi. Çözelti +4 °C' de 15 dakika karıştırıldı ve tekrar aynı miktarda sodyum sodyum borhidrür (NaBH_4) eklendi. Çözelti tekrar 15 dakika +4 °C'de karıştırıldı ve PH 7'ye ayarlandı [28], [50]. Reaksiyon içeriği konsantre edildi. İki kez deiyonize su ve iki kez fosfat tamponu ile ultrafiltrasyon cihazında yıkandı. Konsantre hale getirildi. Konjugatların tümünde protein konsantrasyonu yaklaşık 0,09 mg/ml ($A_{280}/1,34$) bulundu. Yapılan işlemler aşağıdaki şekilde özetlenmektedir.



Şekil 3. 1 GOD-PEG kovalent konjugatlarının sentezinin şematik gösterimi [13].

Hesaplamalar;

GOD konsantrasyonu sabit tutularak (0,2 mg/ml) PEG aldehit türevinin farklı konsantrasyonlarında çözeltileri aşağıda belirtilen (2.3) eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\frac{n_{GOD}}{n_{PEG}} = \frac{C_{GOD} \times M_{PEG}}{C_{PEG} \times M_{GOD}} = 1/1; 1/5; 1/10; 1/20 \quad (2.3)$$

GOD konsantrasyonu =0,2 mg/ml

M_{PEG} =20000Da

M_{GOD}=186000Da

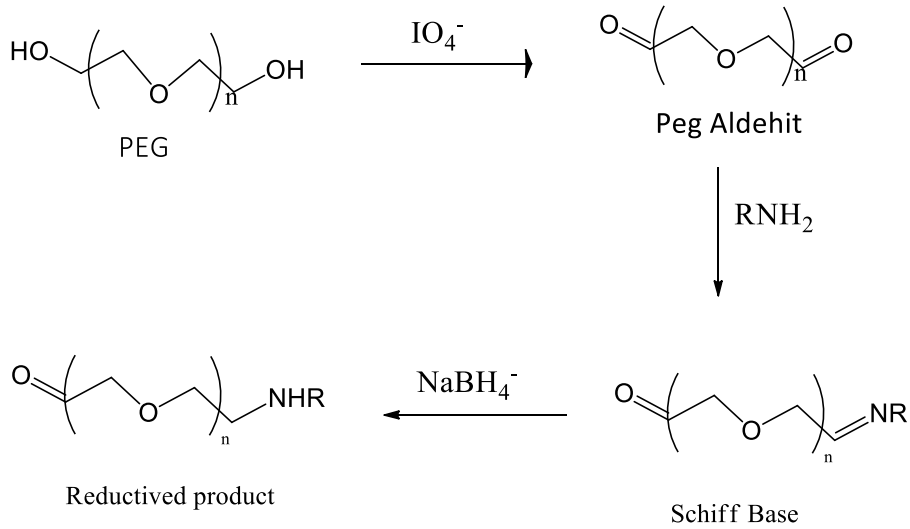
$$1/1 n_{\text{GOD}}/n_{\text{PEG}} \Rightarrow C_{\text{PEG}}=0,0215$$

$$1/5 n_{\text{GOD}}/n_{\text{PEG}} \Rightarrow C_{\text{PEG}}=0,1075$$

$$1/10 n_{\text{GOD}}/n_{\text{PEG}} \Rightarrow C_{\text{PEG}}=0,2150$$

$$1/20 n_{\text{GOD}}/n_{\text{PEG}} \Rightarrow C_{\text{PEG}}=0,4301$$

Hesaplanan PEG aldehit türevleri, enzim çözeltisi ile 25 °C 'de 16 saat su banyosunda reaksiyona bırakıldı.



Şekil 3. 2 GOD PEG kovalent konjugatlarının sentezi

3.2.3 Enzim Polimer Konjugatlarının Aktivite Tayinleri

3.2.3.1 GOD PEG Konjugatlarının Aktivite Tayinleri

GOD PEG konjugatlarının aktivite tayinleri GOD enzimine yapılan aktivite tayininde uygulanan yöntemde olduğu gibi yapılmıştır. GOD PEG konjugatlarının ilk olarak 30 °C 'de su banyosunda farklı pH'lerde (5, 6, 7, 8) aktiviteleri incelendi. pH=5 değerinde 0.05 M asetat tamponu, pH 6 0.05 M sitrat tamponu, pH 7 ve pH 8 de ise 0.01 M fosfat tamponu kullanılmıştır.

Daha sonra GOD PEG konjugatlarının farklı sıcaklıklardaki (30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C) aktiviteleri incelendi.

Ayrıca $n_{\text{GOD}}/n_{\text{PEG}} :1/1$, $n_{\text{GOD}}/n_{\text{PEG}} :1/5$ konjugatlarının ve GOD enziminin 50 °C'deki su banyosunda 0, 60, 120, 180, 240 dakika bekletilerek termal aktivitelerine bakıldı.

3.2.3.2 GOD PEG Konjugatlarının Raf Ömürlerinin Belirlenmesi

Aktivite sonuçları değerlendirilerek seçilen $n_{GOD}/n_{PEG} :1/1$, $n_{GOD}/n_{PEG} :1/5$ konjugatları ve saf enzim +4 °C'de 22 gün bekletilerek, belli aralıklarla şişelerden alınarak aktivite tayinleri yapıldı. Bu sayede elde edilen sonuçlar doğrultusunda raf ömürleri belirlendi.

3.3 Elde Edilen Ürünlerin Değerlendirilmesi

3.3.1 Konjugatların Viscotek Marka GPC Sisteminde İncelenmesi

Viscotek cihazı dolgulu kolon kullanan 4 dedektörlü bir kolon sıvı kromatografisidir. Viscotek cihazında sıvı hareketli faz yüksek basınçta ufak tanecikli hareketli faz üzerinde hareket ettirilmektedir. Bu tekniğe yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) adı verilmektedir.

Viscotek marka GPC sisteminde,

0,1 mg/ml GOD-PEG konjugatları, GOD çözeltisi ve PEG çözeltisi analiz edildi. UV, kırılma indisi, viskozite dedektörleri, ısıtma saçılması ile elde edilen kromatogramlar kaydedildi.

3.3.2 FTIR Spektroskopisi İle Fonksiyonel Grupların Analizi

PEG aldehit türevi, GOD enzimi, $n_{GOD}/n_{PEG} : 1/1$ oranlı konjugatın FTIR cihazında spektrumları alındı. Elde edilen spektrumlar ve değerlendirmeleri sonuç kısmında belirtildi.

3.4 Biyosensör Hazırlanması İle İlgili Çalışmalar

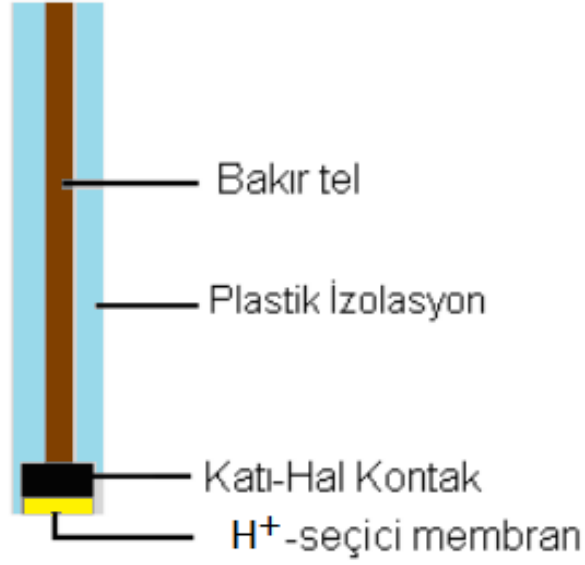
3.4.1 pH Elektrotlarının (H⁺ Seçici) Hazırlanması

pH elektrotların hazırlanmasında iki farklı yöntem kullanılmıştır. İlk yöntemde kompozit pH elektrotları hazırlanmıştır. Kompozit karışımı ağırlıkça %11,11 quinhidron, %22,22 grafit, %22,22 polimetil metakrilat (PMM) ve %44,44 akrilik sıvısı içermektedir. Quinhidron, grafit, polimetil metakrilat tozları iyice homojenize edildikten sonra üzerine akrilik sıvısı ilave edildi ve uygun kıvama gelinceye kadar karıştırıldı. Uygun

kıvama gelen kompozit karışımı ince borulara dolduruldu. Borunun bir ucuna ince bir tel, katı kontakt ile bağlandı. Elektrotlar kuruması için bir hafta bekletildi. [49].

İkinci yöntemde polimer pH membran kokteyli katı-hal kontakt elektrotlara kaplanarak pH elektrotları hazırlanmaktadır. Elektrotun iç iletken kısmı olan katı-hal kontaktın hazırlanması için grafit, epoksi reçinesi ve sertleştirici kullanıldı. Ağırlıkça %50 grafit (w/w), %35 epoksi, %15 sertleştirici kullanılarak toplam karışım 2 g olacak şekilde katı-hal kontaktlar hazırlandı. Sertleştirici ve epoksi reçinesini çözerek grafitle homojen bir karıştırma oluşturmak için yüksek saflıkta THF (Tetrahidro Furan) kullanıldı. Karışım homojen olana kadar spatülle karıştırıldı. Homojen ve vizkoz karışım olduğunda sert bir bakır tel bu karışıma daldırılarak bakır tel görünmeyecek ve elektrot yüzeyinde boşluk kalmayacak şekilde kaplandı. Katı-hal kontakt ile kaplanan elektrotlar oda sıcaklığında 4-5 saat kurumaya bırakıldı [46].

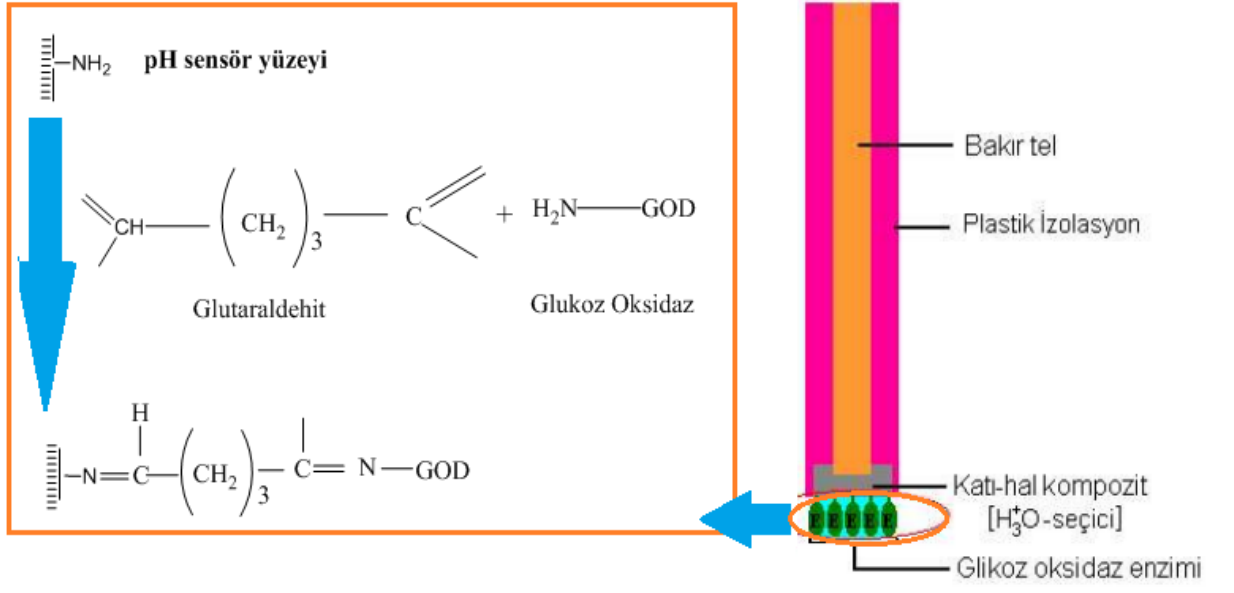
Hazırlanan katı-hal kontakt elektrotlara kaplanması için pH membran kokteyli hazırlandı. Membran kokteyli, ağırlıkça %4 trioktilamin (w/w), %67 plastikleştirici Nitrofenil oktileter (w/w), %28 PVC (w/w) ve %1 sodyum tetra fenil borat (w/w) kompozisyonuna sahiptir. pH membran kokteyli ağırlıkça toplam 250 mg olacak şekilde hazırlandı ve bu karışım 5 ml THF kullanılarak çözüldü. Homojen bir karışım elde edildikten sonra bu membran kokteyli kaplama yapabilecek vizkoziteye ulaşması için karanlıkta ve oda sıcaklığında beklemeye bırakıldı. Yeterli vizkoziteye gelen pH membran kokteyline katı-hal kontakt 3-4 kez daldırılıp, elektrotun kendi eksenine etrafında döndürülmesiyle kaplandı. Kaplanan pH membran elektrotlar karanlıkta ve oda sıcaklıkta 1 gece kurumaya bırakıldı. Hazırlanan pH elektrotları 10 mM HCl çözeltisinde 5 saat doyurulmaya bırakıldı. Bu pH elektrotları standart pH tampon çözeltisinde (pH 4-7-10) test edildi [47].



Şekil 3. 3 Polimerik membran pH elektrodunun şematik gösterimi

3.4.2 Enzim İmmobilizasyonu ve Glukoz Biyosensörünün Hazırlanması

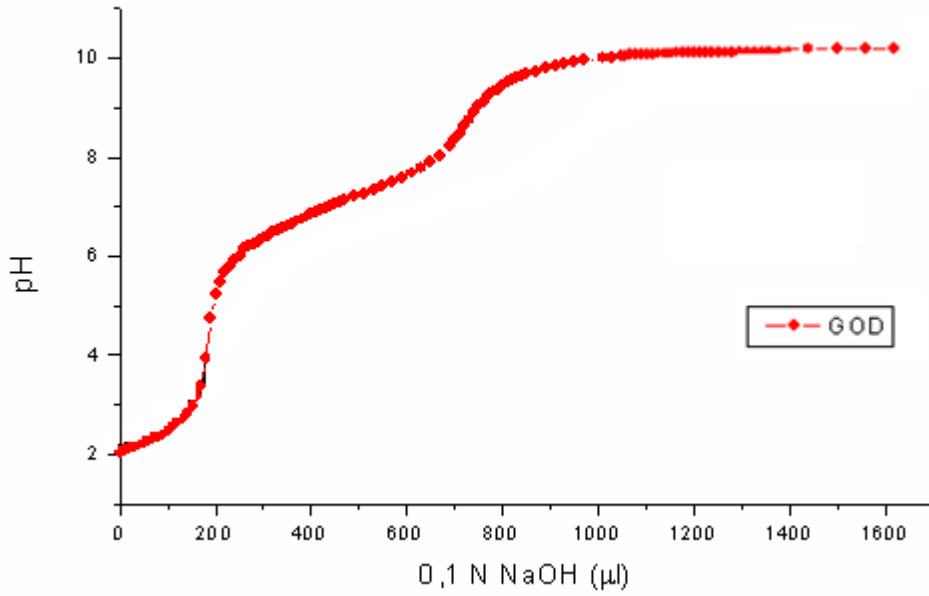
Hazırlanan pH sensör elektrotunun yüzeyine glukoz oksidaz enzimi (GOD), çapraz bağlayıcı reaktif olan glutaraldehitin kullanılmasıyla tutturuldu. 2.5 mg GOD enzimi 50 µl 50 mM pH 7 fosfat tamponunda çözülerek enzim çözeltisi hazırlanır. Hazırlanan enzim çözeltisinin 20 µl'si ile 7 µl glutaraldehit (%2.5(w/w)) karıştırıldı. pH sensör elektrotu enzim-glutaraldehit çözeltisine daldırılır ve 1 gece +4 °C' de bu çözelti içerisinde bekletilir. 1 gece enzim-glutaraldehit çözeltisinde bekletilen elektrotlar daha sonra 50 mM pH 7 fosfat tamponunda yıkanarak ölçüme hazır halde geldi. Biyosensörler kullanılmadığı zamanlarda +4 °C' de saklandı [48].



Şekil 3. 4 Glukoz biyosensörünün şematik gösterimi

SONUÇ VE ÖNERİLER**4.1 GOD Enziminin (GOD) pI Değerinin Aktivite Tayini**

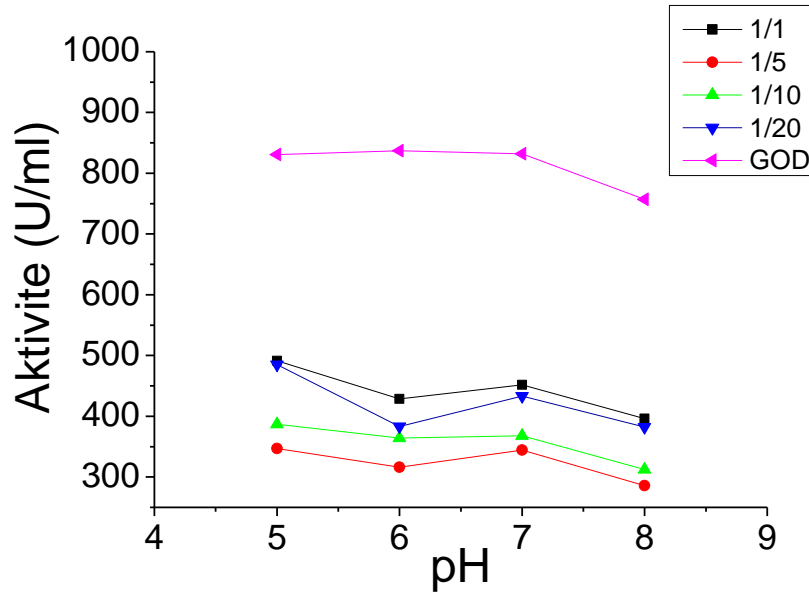
GOD enziminin NaOH ile titrasyon eğrileri Şekil 4.1 'de verilmektedir. Alınan sonuçlar pI değerinin yaklaşık 4 dolayında olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 1 GOD Enziminin pI değerinin değeri grafiği

4.1.1 GOD PEG Konjugatlarının Aktivite Sonuçlarının Değerlendirilmesi

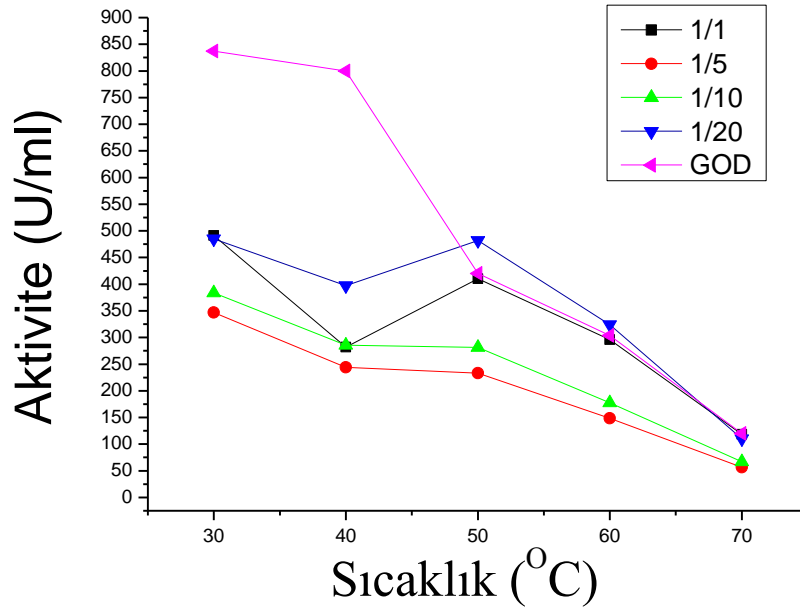
GOD PEG konjugatlarının ve GOD enziminin farklı pH değerlerindeki tampon çözeltilerde (pH 5, 6, 7, 8) yapılan aktivite tayinlerinde alınan sonuçlar Şekil 4.2 'de verilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre GOD, konjugatlardan daha yüksek aktiviteye sahiptir ve GOD'nin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri 6'dır. 1/1 oranlı konjugat bütün pH değerlerinde en yüksek aktiviteyi göstermektedir. 1/5 oranlı konjugatın ise bütün pH değerlerinde en düşük aktiviteyi gösterdiği bulunmuştur. Konjugatların hepsi en yüksek aktivitelerini pH 5'de gösterirken, en düşük aktivitelerini ise pH 8'de göstermektedir. 1/10 oranlı konjugat ise pH değişimlerinden aktivitesi en az etkilenen konjugat olarak görülmüştür.



Şekil 4. 2 GOD ve GOD-PEG konjugatlarının farklı pH değerlerindeki aktiviteleri

GOD-PEG konjugatlarının ve serbest GOD enziminin farklı sıcaklık değerlerindeki (30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C) aktiviteleri Şekil 4. 3'de gösterilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre konjugatların hepsi en yüksek aktiviteyi 30 °C' de, en düşük aktiviteyi ise 70 °C' de göstermektedir. Konjugatlar arasında 1/1 oranlı konjugat 30 °C' de ve 70 °C' de en yüksek aktiviteye gösterirken, 1/20 oranlı konjugat ise 40 °C, 50 °C ve 60 °C' de en yüksek aktiviteyi göstermektedir. 50 °C' den sonra konjugatların aktivitelerinde büyük bir düşme gözlenmektedir. GOD enzimi en yüksek aktiviteyi 30 °C' de göstermekte, en düşük aktiviteyi 70 °C' de göstermektedir. GOD enzimi 50 °C' de aktivitesinde çok büyük

bir düşüş gözlenmektedir. Bu sebeple 1/20 oranlı konjugat 50 °C ve 60 °C' de GOD enziminden daha yüksek aktivite göstermektedir. 1/5 ve 1/10 oranlı konjugatların sıcaklık değişimlerine karşı aktiviteleri en az etkilenen konjugatlardır.



Şekil 4. 3 GOD ve GOD-PEG konjugatlarının farklı sıcaklıklardaki aktiviteleri

GOD, 1/1 ve 1/5 oranlı konjugatların pH 5 0.05 M asetat tamponunda 50 °C' de su banyosunda 0 Dakika, 60 dakika, 120 dakika, 180 dakika ve 240 dakika beklemeleri sonucunda gösterdikleri aktiviteler Şekil 4. 4'de gösterilmiştir.

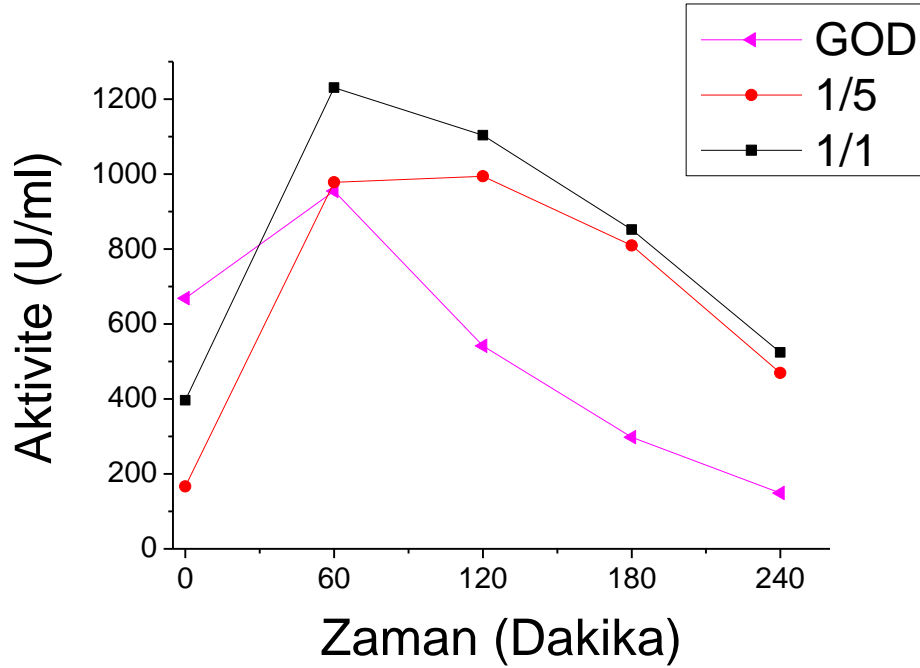
Elde edilen sonuçlara göre 60 dakika bekleme sonunda, konjugatların aktivitelerinde, GOD enzimine nazaran çok büyük bir artış göstermektedir.

120 dakika bekleme sonunda, GOD enziminin aktivitesinde çok büyük bir düşüş gözlenmekte, 1/1 oranlı konjugatın aktivitesi çok az düşmekte ve aktivitesini hemen hemen korumaktadır, 1/5 oranlı konjugatın aktivitesinde ise artış gözlenmektedir.

180 dakika bekleme sonunda, GOD enzimin aktivitesinde belirgin bir düşüş gözlenmektedir, konjugatların aktivitelerinde ise çok az bir düşüş gözlenmekte ve aktivitelerinde önemli kayıp olmamaktadır.

240 dakika bekleme sonunda, GOD enziminin aktivitesinde düşüş devam etmekte ve artık aktivite göstermemektedir. 240 dakikaya gelinmesine rağmen konjugatlar hala yüksek aktivite göstermektedir.

240 dakika bekleyen serbest enzim ve konjugatlarda, serbest enzimin aktivite göstermemesi bunun tersi konjugatlarda görülen yüksek aktivite, konjugatların termal kararlılıklarının çok yüksek olduğunu kanıtlar.

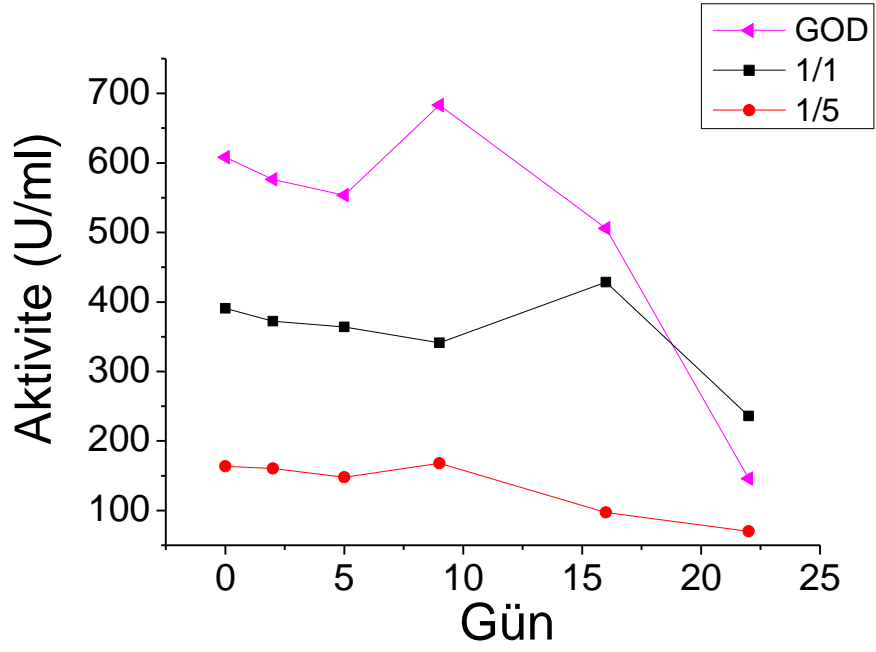


Şekil 4. 4 GOD enzimi, 1/5 ve 1/1 oranlı konjugatların termal kararlılıkları

4.1.2 Raf Ömrü Sonuçlarının Değerlendirilmesi

GOD enzimi, 1/1 ve 1/5 oranlı konjugatların + 4°C'deki raf ömürleri Şekil 4.5'de verilmektedir. Bekletilme süreci sonunda, konjugatlar aktivitelerini enzime kıyasla daha az kaybettiği görülmektedir. 22. günde GOD enzimi aktivitesinde çok büyük bir düşme gözlenmekte ve hemen hemen aktivitesi sıfırlanmakta iken konjugatların aktivitelerinde GOD enzime kıyasla çok büyük bir düşme gözlenmemektedir.

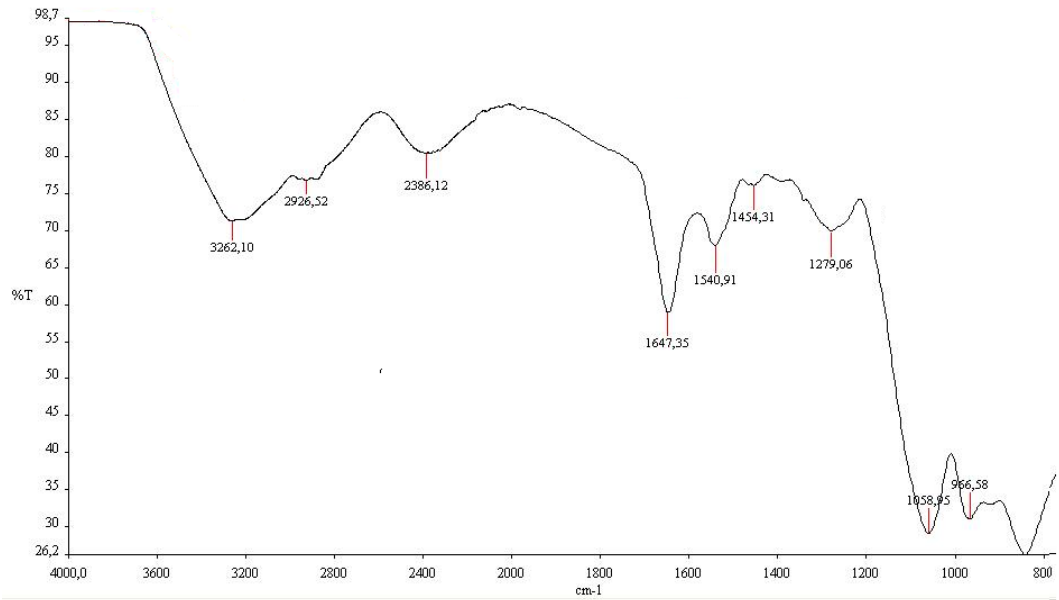
Sonuç olarak konjugatların +4 °C'deki raf ömürlerinin, GOD enzime göre daha yüksek olduğu görülmüştür.



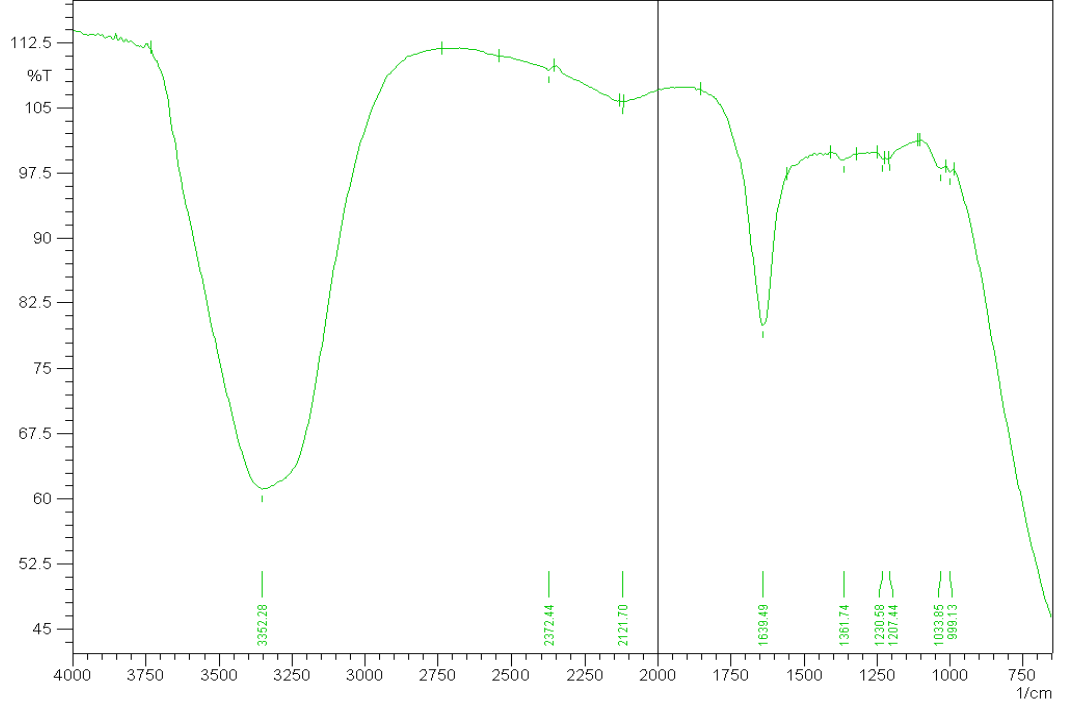
Şekil 4. 5 GOD enzimi ve konjugatların raf ömürlerinin grafiği

4.2 FTIR Spektrumları

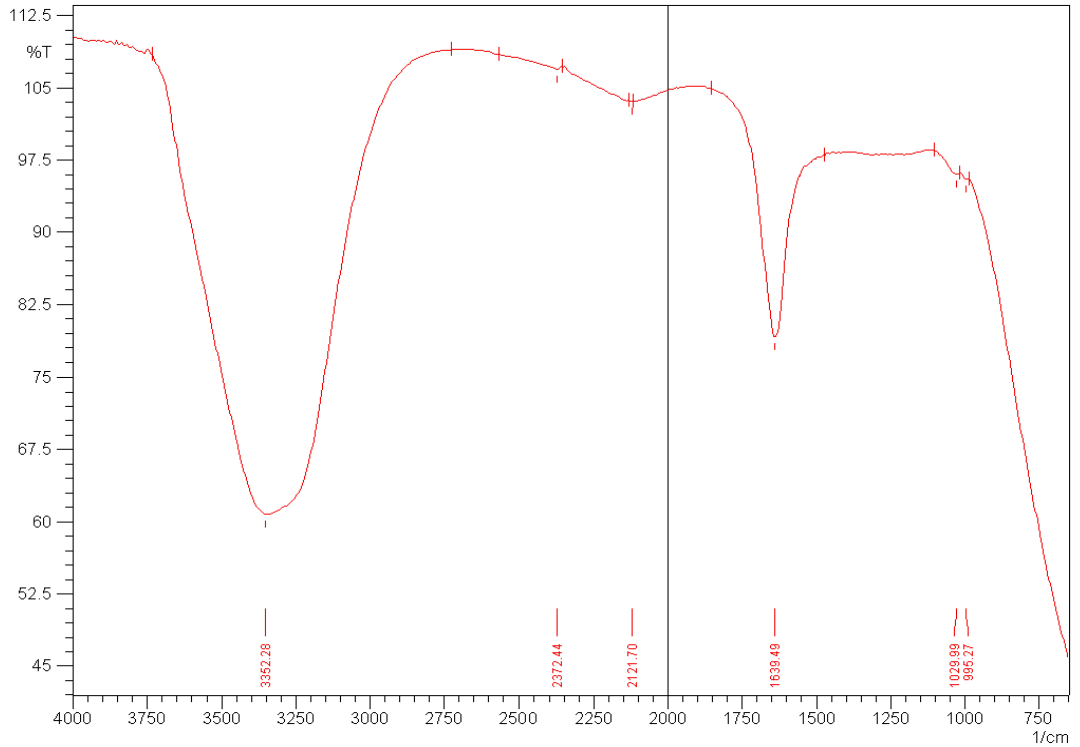
GOD enziminin, PEG-aldehit türevinin ve 1/1 oranlı konjugatın FTIR cihazında alınan spektrumları sırasıyla Şekil 4. 6, 4.7 ve 4.8'de gösterilmektedir.



Şekil 4. 6 GOD enziminin FTIR spektrumu



Şekil 4. 7 PEG aldehit türevinin FTIR spektrumu



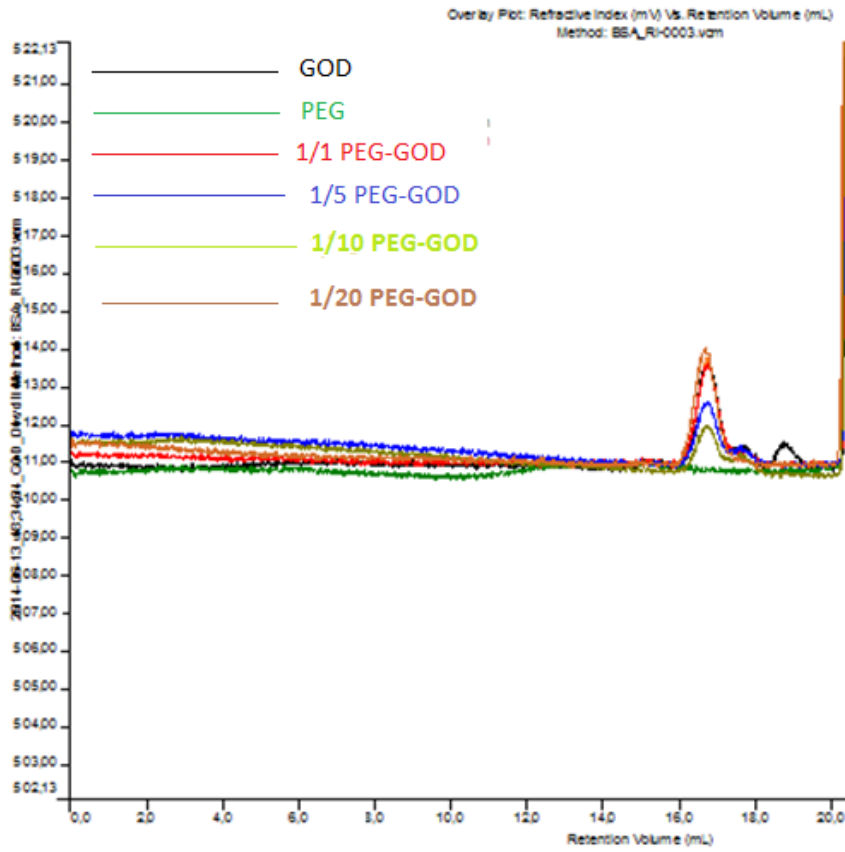
Şekil 4. 8 GOD-PEG Konjugatının FTIR spektrumu

GOD'ın spektrumunda 3262 ve 1647 cm^{-1} dalga boylarında primer amin grubunun bandları, 2386 cm^{-1} dalga boyunda amonyum bandı, 1540 cm^{-1} 'de sekonder amin

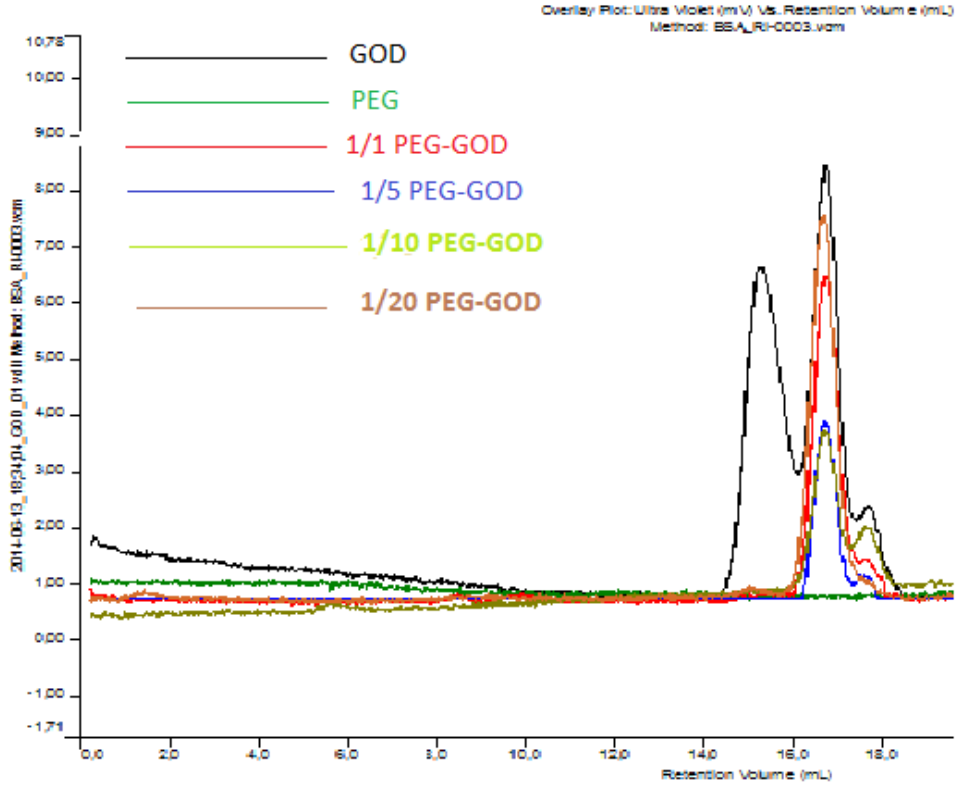
bandı, 1279 cm⁻¹ dalga boyunda aromatik amin bandı görülmüştür. Konjugatlarda ise 1640 cm⁻¹ dalga boylarında amid bandları görülmüştür.

4.3 Dört Dedektörlü HPLC Sisteminde (Viscotek Marka GPC Sistemi) Alınan Kromatogramlar

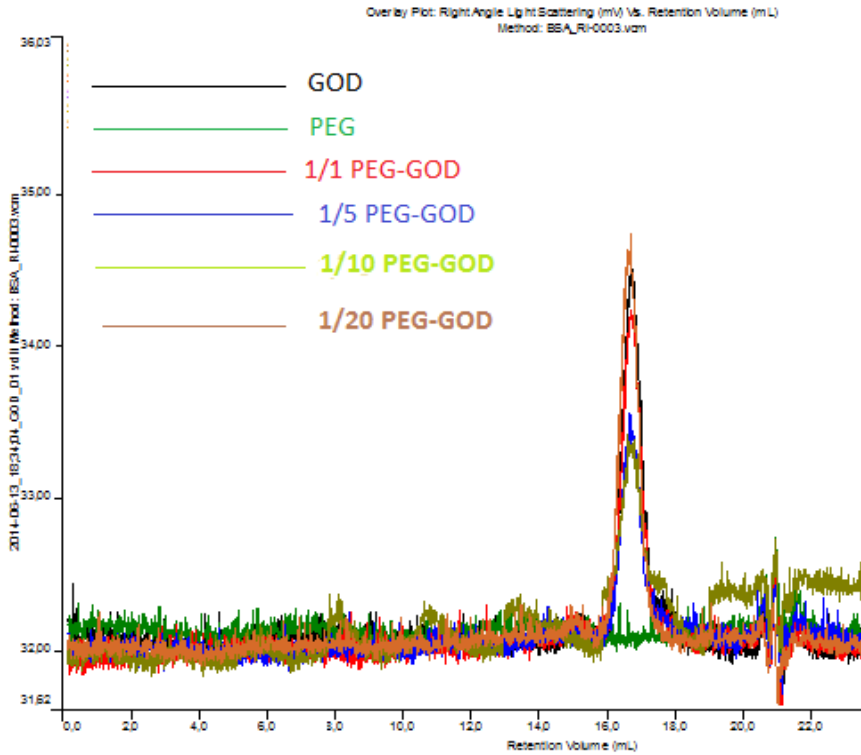
Konjugatların polimer molekül boyutuna ve mol oranına göre değişen moleküler özellikleri hakkında bilgi veren HPLC kromatogramları Şekil 4.9, 4.10, 4.11’de gösterilmektedir.



Şekil 4. 9 Konjugatların, PEG ve GOD enziminin GPC sistemi Viscotek marka cihaz kırılma indisi dedektörü ile alınan kromatogramlar



Şekil 4. 10 Konjugatların, PEG ve GOD enziminin GPC sistemi ile Viscotek marka cihaz UV dedektörü ile alınan kromatogramlar

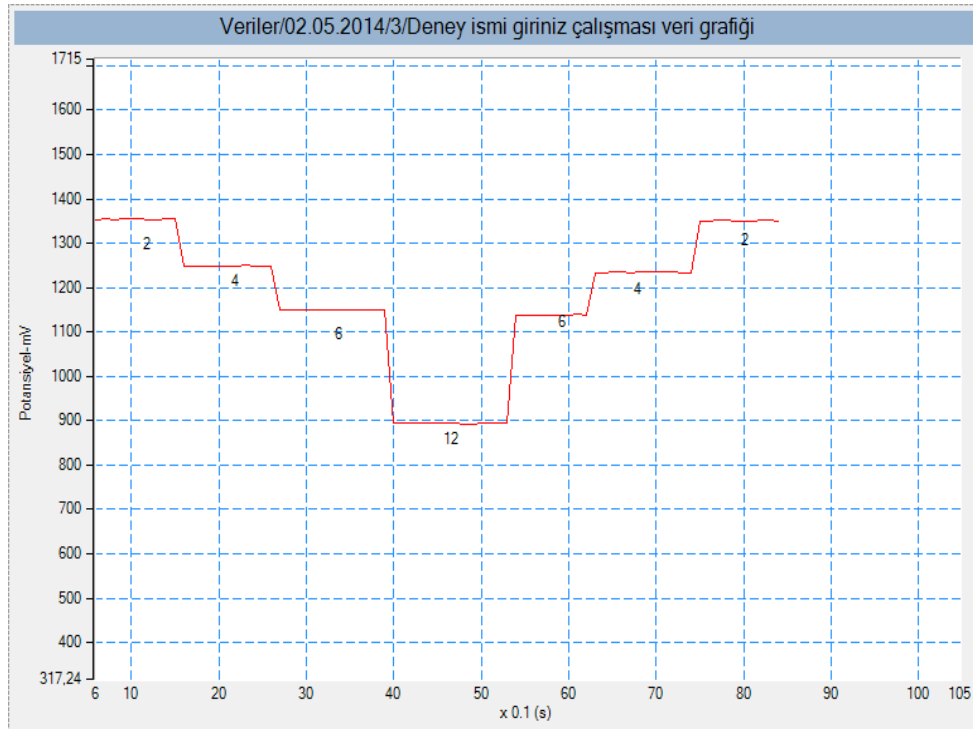


Şekil 4. 11 Konjugatların, PEG ve GOD enziminin GPC sistemi ile Viscotek marka cihaz ışık saçılması dedektörü ile alınan kromatogramlar

GOD-PEG konjugatlarının üç dedektörlü HPLC sisteminde kırılma indisi, UV ve ışık saçılması dedektörlerinden alınan kromatogramlarından elde edilen sonuçlara göre; PEG ile hazırlanan konjugatların kromatogramlarında; 1/1, 1/5, 1/10, 1/20 mol oranlı konjugatlar, enzimin önünde gelen tek pik ile karakterize edilmiştir. Konjugata ait pik, molekül ağırlığındaki artıştan dolayı enzimin önünde yer almıştır. UV dedektörde ise serbest enzimde üç pik, konjugatların kromatogramlarında ise (1/1, 1/5, 1/20) tek pik görülmüştür. 1/10 oranlı konjugatta tek pikin arkasından küçük bir pik geldiği görülmüştür.

4.4 pH Elektrotların Potansiyometrik Davranışı

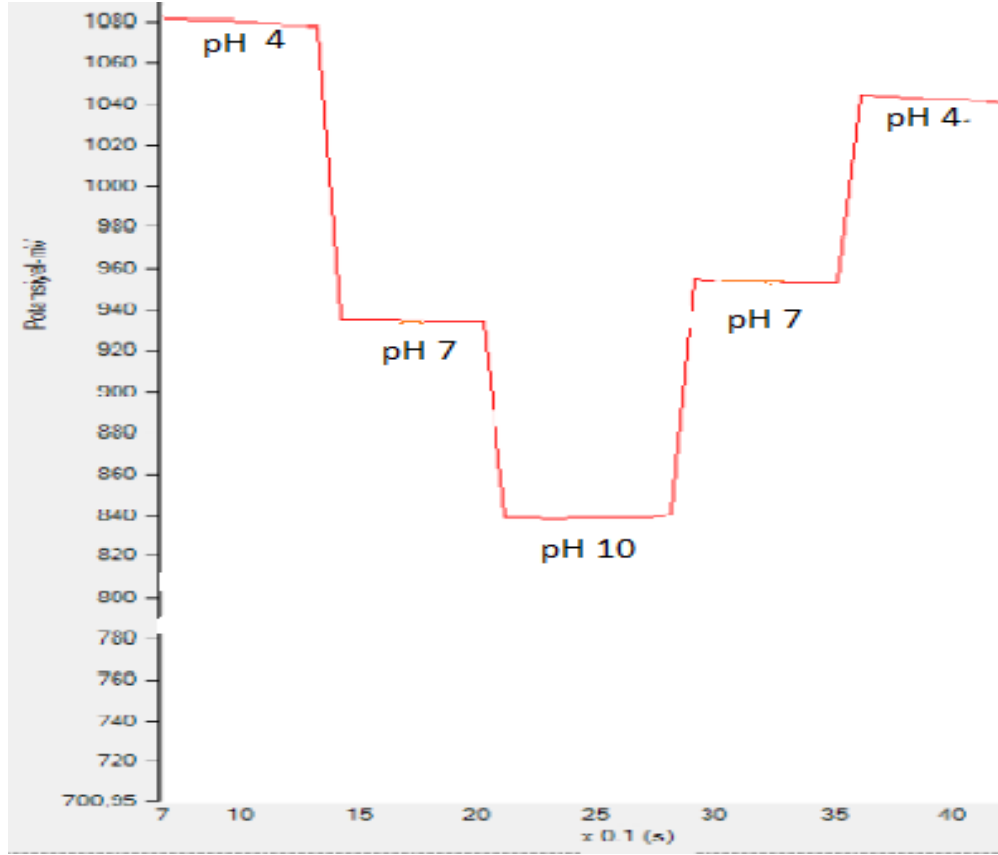
İlk yöntemle hazırlanan kompozit pH elektrotunun potansiyometrik davranışı pH 2, pH 4, pH 6, pH 12 standart pH çözeltilerinde potansiyometrik ölçüm sistemi ile incelendi. pH elektrotun potansiyel-pH değişimlerini gösteren ve ölçüm sisteminden direkt alınan sonuçlar Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 12 Kompozit pH elektrotun potansiyometrik davranışı

Şekil 4.12 'de görüleceği gibi pH 2-10 arası yaklaşık 450 ± 10 mv değerinde bir fark bulunmaktadır. pH 2-4 arası yaklaşık 100 ± 10 mv, pH 4-6 arası yaklaşık 100 ± 10 mv, pH 6-12 arası ise 250 ± 10 mv değerinde fark bulunmaktadır.

İkinci yöntemle hazırlanan pH elektrotunun potansiyometrik davranışı pH 4, pH 7, pH 10 standart pH çözeltilerinde potansiyometrik ölçüm sistemi ile incelendi. pH elektrotun potansiyel-pH değişimlerini gösteren ve ölçüm sisteminden direkt alınan sonuçlar Şekil 4.13’de gösterilmiştir.

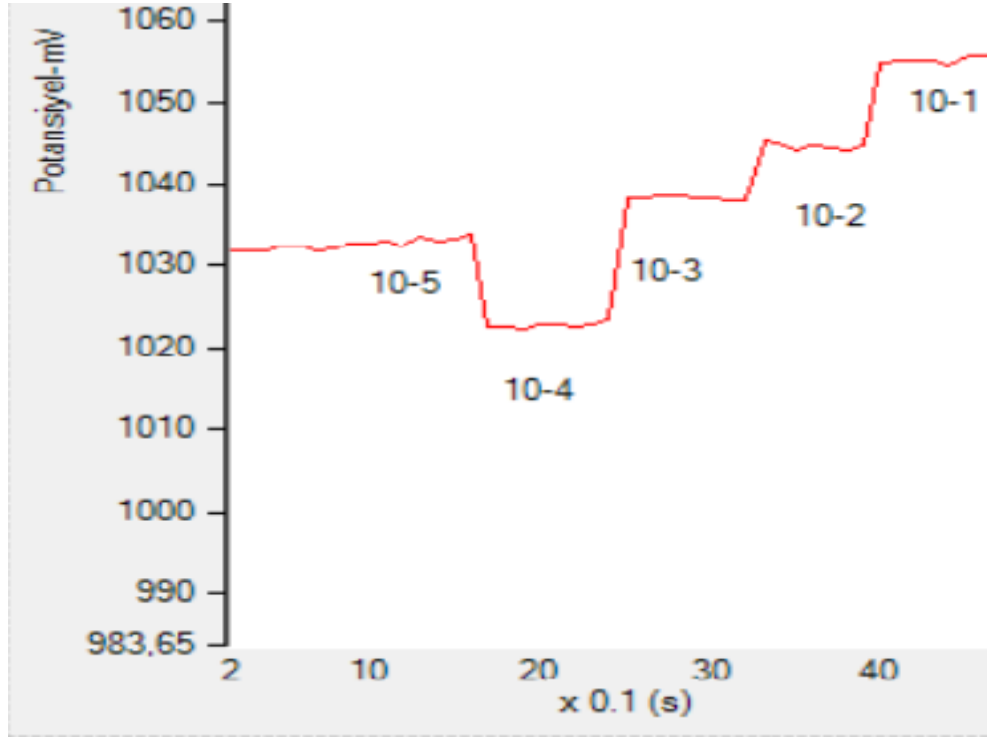


Şekil 4. 13 Polimerik pH elektrodun potansiyometrik davranışı

Şekil 4.13’de görüleceği üzere pH 4-10 arası yaklaşık olarak 250 ± 40 mV değerinde artış gözlenmektedir. pH 4 ile pH 7 arası yaklaşık olarak 150 ± 60 mV artış, pH 7 ile pH 10 arası yaklaşık olarak 100 ± 20 mV artışı gözlenmektedir.

4.5 Glukoz Biyosensörünün Potansiyometrik Davranışı

Glukoz biyosensörünün potansiyometrik davranışı, 1 mM pH 7.2 Tris-HCl tamponuyla hazırlanan 10^{-5} - 10^{-1} M arasında değişen glukoz çözeltilerinde potansiyometrik ölçüm sistemi ile incelendi. Glukoz biyosensörünün derişim-pH değişimlerini gösteren ve ölçüm sisteminden direkt alınan sonuçlar Şekil 4.14’de gösterilmiştir.



Şekil 4. 14 Glukoz Biyosensörünün potansiyometrik değişimi

Şekil 4.14'de görüleceği üzere 10⁻⁵ M – 10⁻¹ M arasındaki glukoz çözeltilerinde 25 ± 5 mv değerinde bir artış gözlenmektedir. Biyosensör 10⁻⁵ M-10⁻⁴ M arası glukoz çözeltilerinde beklenen potansiyel artışı gösterememiştir ve bu derişimler arasındaki glukozu duyarlı değildir. Ancak 10⁻⁴ M ve 10⁻¹ M arasındaki glukoz çözeltilerinde glukozu ölçebilmektedir ve beklenen potansiyel artışlar gözlenebilmektedir.

Elde edilen sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında;

- 4 farklı oranda sentezlenen ($n_{\text{GOD}}/n_{\text{PEG}}$: 1/1, 1/5, 1/10, 1/20) GOD-PEG konjugatlarının farklı pH değerlerindeki gösterdikleri aktiviteler sonucunda konjugatların hepsi pH 5 değerinde en yüksek aktiviteyi gösterdikleri, pH 8 değerinde ise en düşük aktivite gösterdikleri bulunmuştur. GOD enzimi ise en yüksek aktivitesini pH 6 değerinde, en düşük aktivitesini ise pH 8 değerinde göstermiştir. GOD Dekstran ile daha önce yapılan kovalent konjugasyon çalışmasında 1/5 oranlı konjugatın 30 °C'de pH 4 değerinde en yüksek aktiviteyi göstermekte, en düşük aktiviteyi ise pH 7 değerinde göstermektedir. GOD enzimi ise 30 °C'de en yüksek aktivitesini pH 6 değerinde göstermektedir [50].
- 4 farklı oranda sentezlenen ($n_{\text{GOD}}/n_{\text{PEG}}$: 1/1, 1/5, 1/10, 1/20) GOD-PEG konjugatlarının farklı sıcaklık değerlerindeki aktiviteleri sonucunda konjugatların hepsi en yüksek aktiviteyi 30 °C ' de, en düşük aktiviteyi ise 70 °C 'de göstermektedir. GOD enziminin aktivitesinde 50 °C'de çok büyük bir azalma gözlenirken, konjugatlarda bu azalma daha yüksek sıcaklık değerlerinde gözlenmektedir. Elde edilen konjugatların serbest enzime göre yüksek sıcaklık değerlerine karşı daha dirençli oldukları saptanmıştır. GOD Dekstran ile daha önce yapılan kovalent konjugasyon çalışmasında 1/5 ve 1/20 oranlı konjugatlar en yüksek aktivitelerini 30 °C'de, 1/1 ve 1/10 oranı konjugatların ise en yüksek aktivitelerini 40 °C'de göstermektedir. GOD enziminin yine aktivitesinde 50 °C'de çok büyük bir azalma gözlenmektedir [50].
- 50 °C'de yapılan termal aktivite sonuçlarına göre 50 °C'de 240 dakika bekleme sonunda serbest enzim aktivitesini kaybederken, konjugatlar ($n_{\text{GOD}}/n_{\text{PEG}}$: 1/1, 1/5) hala yüksek bir aktivite göstermektedir. Buna göre konjugatlar serbest enzime göre çok yüksek bir termal stabilite göstermektedir.
- +4 °C'de konjugatların ($n_{\text{GOD}}/n_{\text{PEG}}$: 1/1, 1/5) raf ömürlerinin, serbest enzime göre daha iyi olduğu gözlenmiştir. 1/1 oranlı konjugat 15 gün süreyle, 1/5 oranlı konjugat ise 10 gün süreyle sabit kalmıştır. GOD Dekstran ile daha önce yapılan kovalent konjugasyon çalışmasında da bu konjugatların raf ömürlerinin serbest enzime göre daha iyi olduğunu görmekteyiz. 1/1 oranlı konjugat 20 gün ve 1/5

oranlı konjugat 15 gün süreyle sabit kalan, serbest enzime göre daha düşük olmakla birlikte önemsenecek değerlerde aktivite gösterdi [50].

- GPC kromatografisinden alınan GOD-PEG konjugatların kromatogramlarında; 1/1, 1/5, 1/10, 1/20 mol oranlı konjugatlar, enzimin önünde gelen tek pik ile karakterize edilmiştir. Konjugata ait pik, molekül ağırlığındaki artıştan dolayı enzimin önünde yer almıştır. Yapılan çalışmada proteinlerin PEG'le oluşturdukları konjugatlar SEC-RI-UV-LS sistemi ile incelenmiştir. Elde edilen kromatogramda, konjugata ait pikin molekül kütlesinin büyük olması nedeniyle daha önde çıktığı görülmüştür [51]. Ayrıca çeşitli polisakkaritlerle modifiye edilen enzim stabilite çalışmalarında da ve bovin serum albuminin suda çözünen kovalent konjugatlarının çalışmalarında da konjugatlara ait pikin molekül ağırlığındaki artıştan dolayı enzimin önünde yer almıştır [50], [52], [53].
- FTIR spektroskopisinden alınan sonuçlara göre, konjugatların 1640 cm⁻¹ dalga boylarında amid bandları görülmüştür.
- GOD enziminin polimerik pH elektrodu yüzeyine immobilize edilmesiyle elde edilen glukoz biyosensörü 10⁻⁴ M ve 10⁻¹ M arasındaki glukoz çözeltilerinde glukozu ölçebilmektedir ve beklenen potansiyel artışlar gözlenebilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Telefoncu, A., (1999). Biyosensörler (Telefoncu A., Ed.) Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir
- [2] Grieshaber, D. MacKenzie, R. Vörös, J. ve Reimhult, E., (2008). "Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures", Sensors, 8: 1400-1458.
- [3] Otlu, B., (2011). "Biyosensörler: Biyoreseptör Moleküller", 6th International Advanced Technologies Symposium (IATS'11), 16-18 Mayıs, Elazığ.
- [4] Chauhan, S. Rai, V. ve Singh, H., (2004). "Biosensors", Resonance, 9: 33-44.
- [5] Reyes De Corcuera, J.I. ve Cavalieri R.P., (2003). "Biosensors", Encyclopedia of Agricultural, Food and Biological Engineering, Edited by: Heldman, D.R
- [6] SİReBİ, Introduction to Biosensing, www.sirebi.org, 7 Haziran 2012.
- [7] Bağrıyanık, B.D., (2011). Potansiyometrik Esaslı Glutamin Biyosensörü Tasarlanması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [8] Mello, L.D. ve Kubota, L.T., (2002). "Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries", Food chemistry, 77: 237-256.
- [9] Scribd, Biyosensörler-2, <https://tr.scribd.com/>, 19 Ekim 2014.
- [10] Turkmen, E. Bas, S.Z. Gulce, H. ve Yildiz, S., (2014). "Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in electropolymerized poly (o-phenylenediamine) film on platinum nanoparticles-polyvinylferrocenium modified electrode", Electrochimica Acta, 123: 93-102.
- [11] You, X. ve Pak, J.J., (2014). "Graphene-based field effect transistor enzymatic glucose biosensor using silk protein for enzyme immobilization and device substrate", Sensors and Actuators B: Chemical.
- [12] Abasıyanık, M.F., Şakalar, E., Şenel M., Biyosensörlere Genel Bir Bakış ve Biyosavunmada Kullanılan Biyosensörler, <http://www.cilginbiyologlar.com> 19 Ekim 2014.
- [13] Keha, E.E. ve Kührevioğlu, İ., (2004). Biyokimya, 8. Baskı, Aktif Yayınevi, Erzurum.

- [14] Silverman, R.B. ve Holladay, M.W., (1992). The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action 165-202, Third Edition, San Diego.
- [15] Nelson, D.L. and Cox, M.M., (2005). Lehninger Principles of Biochemistry, Third Edition, Worth Publishers, Madison.
- [16] Chemistry Courses, Chapter 24 Enzymes, <http://courses.chem.psu.edu> ,28 Ekim 2014.
- [17] Avemiel, R., Gytha, A.K., Iree A., Carlos C., Enzymes:Biological Catalysts, <https://tr.scribd.com/doc/209108782/ENZYMES-BIOLOGICAL-CATALYSTS> , 21 Ekim 2014.
- [18] Worthington Biochemical Corporation, Introduction to Enzymes, <http://www.worthington-biochem.com/introbiochem/Enzymes.pdf> , 28 Ekim 2014.
- [19] Wiseman, A., (1985). Handbook of Enzyme Biotechnology, Ellis Harwood Limited, 456s, England.
- [20] Bankar, S.B. Bule, M.V. Singhal, R.S. ve Ananthanarayan, L., (2009). "Glucose oxidase—an overview", Biotechnology advances, 27: 489-501.
- [21] Leskovac, V. Trivić, S. Wohlfahrt, G. Kandrač, J. ve Peričin, D., (2005). "Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors", The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 37: 731-750.
- [22] Raba, J. ve Mottola, H.A., (1995). "Glucose oxidase as an analytical reagent", Critical reviews in Analytical chemistry, 25: 1-42.
- [23] Hermanson, G.T., (2013). Chapter 22 - Enzyme Modification and Conjugation, G.T. Hermanson, ed. Bioconjugate Techniques (Third edition). Boston: Academic Press, 951-957.
- [24] European Patent Application, Stabilized Composition and Test Device for Detecting the Presence of a Sugar in a Test Sample, <https://data.epo.org/publicationserver/rest/v1.0/publication-dates/19810527/patents/EP0029155NWA1/document.html> , 1 Kasım 2014.
- [25] Altıkatoğlu, M., (2007). Enzim-Dekstran Konjugatları, Doktora Tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [26] Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği, Enzimlerin ve Mikroorganizmaların Gıda Muhafazasında Kullanılması, http://www.food.hacettepe.edu.tr/turkish/ouyeleri/gmu809/enzim_ve_mikroorganizma.pdf , 1 Kasım 2014.
- [27] İçli, N., (2008). İmmobilize Glukoz Oksidaz Enzimin Özellikleri ve Enzim Aktifliğinin Artırılması, Yüksek Lisans Tezi, G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [28] Betancor, L. López-Gallego, F. Hidalgo, A. Alonso-Morales, N. Fuentes, M. Fernández-Lafuente, R. ve Guisán, J.M., (2004). "Prevention of interfacial inactivation of enzymes by coating the enzyme surface with dextran-aldehyde", Journal of Biotechnology, 110: 201-207.

- [29] Balcão, V.M. ve Vila, M.M.D.C., (2014). "Structural and functional stabilization of protein entities: state-of-the-art", *Advanced Drug Delivery Reviews*.
- [30] Iyer, P.V. ve Ananthanarayan, L., (2008). "Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment", *Process Biochemistry*, 43: 1019-1032.
- [31] Costa, S.A. Tzanov, T. Filipa Carneiro, A. Paar, A. Gübitz, G.M. ve Cavaco-Paulo, A., (2002). "Studies of stabilization of native catalase using additives", *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 387-391.
- [32] Sawant, R.M., (2008). *Poluethylene Glycol (PEG) As A Key Component Of Long Circulating Delivery Systems For Therapy And Imaging*, ed^{eds}. Pharmaceutical Science Dissertations. Boston: Northeastern University.
- [33] Pasut, G., (2014). "Polymers for Protein Conjugation", *Polymers*, 6: 160-178.
- [34] Ak, G., (2010). *Folat-PEG-doxorubicin Türevinin Sentezlenerek Teknesyumla İşaretlenmesi ve Kanser Görüntüleme Ajanı Olarak Kullanım Olanaklarının Araştırılması*, ed^{eds}. Fen Bilimleri Enstitüsü. İzmir: Ege Üniversitesi.
- [35] Kodera, Y. Matsushima, A. Hiroto, M. Nishimura, H. Ishii, A. Ueno, T. ve Inada, Y., (1998). "Pegylation of proteins and bioactive substances for medical and technical applications", *Progress in Polymer Science*, 23: 1233-1271.
- [36] Veronese, F.M. ve Pasut, G., (2005). "PEGylation, successful approach to drug delivery", *Drug discovery today*, 10: 1451-1458.
- [37] Mehvar, R., (2000). "Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents", *Journal of Controlled Release*, 69: 1-25.
- [38] Arslan, A., (2007). *Selülaz- Dekstran Konjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul*.
- [39] Gianfreda, L. ve Scarfi, M.R., (1991). "Enzyme stabilization: state of the art", *Molecular and cellular biochemistry*, 100: 97-128.
- [40] Zhu, X. Zhou, T. Wu, X. Cai, Y. Yao, D. Xie, C. ve Liu, D., (2011). "Covalent immobilization of enzymes within micro-aqueous organic media", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72: 145-149.
- [41] Dutta, R., (2008). *Immobilized Enzyme*, ed. *Fundamentals of Biochemical Engineering*, Springer, New York.
- [42] Bayındır, Z.S. ve Yüksel, N., (2007). "Pegilasyon: PEG Konjugatlarının Hazırlanması ve Uygulamaları", *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 36 (4) 249-266
- [43] Park, E.-H. Shin, Y.-M. Lim, Y.-Y. Kwon, T.-H. Kim, D.-H. ve Yang, M.-S., (2000). "Expression of glucose oxidase by using recombinant yeast", *Journal of Biotechnology*, 81: 35-44.
- [44] Simpson, C. Jordaan, J. Gardiner, N.S. ve Whiteley, C., (2007). "Isolation, purification and characterization of a novel glucose oxidase from *Penicillium* sp. CBS 120262 optimally active at neutral pH", *Protein Expression and Purification*, 51: 260-266.

- [45] Sacco, D. Bonneaux, F. ve Dellacherie, E., (1988). "Interaction of haemoglobin with dextran sulphates and the oxygen-binding properties of the covalent conjugates", *International Journal of Biological Macromolecules*, 10: 305-310.
- [46] Çubuk, O., (2007). Bütünöyle Katı-Hal Mikro Enzim Sensörler ve Uygulamaları, Yüksek Lisans Tezi, 19 Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi, Samsun.
- [47] Genç, S., (2006). Trioktil Amin ve Tridodesil Amin Temel Teşkil Eden Bütünöyle Katı Hal PVC Membran Potansiyometrik pH Sensörler, Yüksek Lisans Tezi, On Dokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- [48] Tinkilic, N. Cubuk, O. ve Isildak, I., (2002). "Glucose and urea biosensors based on all solid-state PVC–NH₂ membrane electrodes", *Analytica chimica acta*, 452: 29-34.
- [49] Türkmen, F., (2010). Kompozit pH Sensör Geliştirilmesi ve Asit-Baz Titrasyonlarında Uygulanması, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun
- [50] Altikatoglu, M. Basaran, Y. Arioç, C. Ogan, A. ve Kuzu, H., (2010). "Glucose oxidase-dextran conjugates with enhanced stabilities against temperature and pH", *Applied biochemistry and biotechnology*, 160: 2187-2197.
- [51] Kendrick, B.S. Kerwin, B.A. Chang, B.S. ve Philo, J.S., (2001). "Online size-exclusion high-performance liquid chromatography light scattering and differential refractometry methods to determine degree of polymer conjugation to proteins and protein–protein or protein–ligand association states", *Analytical biochemistry*, 299: 136-146.
- [52] Mislovičová, D. Masárová, J. Bučko, M. ve Gemeiner, P., (2006). "Stability of penicillin G acylase modified with various polysaccharides", *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 579-585.
- [53] Dilgimen, A.S. Mustafaeva, Z. Demchenko, M. Kaneko, T. Osada, Y. ve Mustafaev, M., (2001). "Water-soluble covalent conjugates of bovine serum albumin with anionic poly (N-isopropyl-acrylamide) and their immunogenicity", *Biomaterials*, 22: 2383-2392.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Gökay VARDAR
Doğum Tarihi ve Yeri : 17.07.1990
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : vardargokay@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Kimya	Balıkesir Üniversitesi	2012
Lise	Fen	İhsan Mermerci Y.D.A. Lisesi	2008

YAYINLARI

Makale

1. Vardar, G. Altikatoglu, M. Onat, D. Cemek, M. ve Isildak, I., (2014). "Calcium, potassium and nitrate in plant nutrient solutions by measuring of with ion-selective electrodes in hydroponic green house of some vegetables", Biotechnol Appl Biochem

Bildiri

1. Işıldak, İ., Ağır, İ., Yıldırım, R., Vardar, G., Özer, T., Erkal, S.D., Attar, A., Altıkatoğlu M., Development of the Real-Time PH Measurement System for Hydroponic Nutrient Solutions Using Wireless Technology, 10th International Electrochemistry Meeting, pp. 149, Konya (2013).
2. Vardar, G., Altıkatoğlu, M., Işıldak, İ., Thermal Stabilization of Glucose Oxidase by Covalent Conjugation with Peg, 1st Bioenginerring Conference, İstanbul (2014).
3. Vardar, G., Altıkatoğlu, M., Onat, D., Cemek, M., Işıldak, İ., Calcium, Potassium and Nitrate in Plant Nutrient Solutions by Measuring of with Ion-Selective Electrodes in Hydroponic Green House of Some Vegetables, 1st Bioenginerring Conference, İstanbul (2014).
4. Işıldak, İ., Altıkatoğlu, M., Attar, A., Vardar, G., Erkal, S.D., Yenilerbilir Biyoenerji Biyokütle, Biyomühendislik Günleri, (2013).

Proje

1. Dekstran ile Stabilize Edilmiş Üreaz Enzimi ve Kompozit Amonyum Sensör Kullanılarak Mikro Büyüklükte Yeni Tip Potansiyometrik Üre Biyosensör Geliştirilmesi, Tübitak Projesi
2. Propofol Tayini İçin Elektrokimyasal Biyosensör Hazırlanması ve Karakterizasyonu, YTÜ BAPK Projesi