

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LİPİD TAYİNİ İÇİN ENZİM ESASLI
BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ**

Tuba AYDIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU

2012, Edirne

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİPİD TAYİNİ İÇİN ENZİM ESASLI BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ


TUBA AYDIN

Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı

Bu tez 18 / 01 / 2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Selçuk YURTSEVER


Doç. Dr. Hülya YAĞAR


Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU
(Danışman)

1. GİRİŞ

Son yıllarda dünya genelinde obezite denilen aşırı şişmanlığın artması, insanın kan ve idrar gibi vücut sıvılarında lipid miktarı tayininin pratik olarak yapılmasını çok önemli hale getirmiştir. Lipidlerin alt sınıfından olan trigliseridler (TG) (nötral yağlar), kan lipidlerinin çoğunluğunu oluşturur. TG'ler, üç mol yağ asiti ve gliserinin esterleşme reaksiyonu ile oluşurlar. Vücutta fazla TG'ler adipoz yağ dokularında depolanır. TG seviyesi sağlıklı insanda 150–190 mg/dl arasındadır. Yüksek trigliserid seviyesi: 200–499 mg/dl ve aşırı yüksek seviyede >500 mg/dl dir. Kandaki TG yüksekliğinin sebepleri arasında; kronik hepatit, ikincil hipolipoproteinemia, arteroskleroz, böbrek sendromu ve şeker hastalığı (*Diabetes mellitus*) (Haim vd., 1999) vardır.

Lipazlar (Triaçilgliserol hidrolaz; EC. 3.1.1.3) canlılarda, fizyolojik koşullarda, hayvansal ve bitkisel yağların hidrolizlerini katalizleyen enzimlerdir. Yağların enzimatik hidrolizi tersinirdir, su varlığında hidroliz yönünde, su azlığında ya da yokluğunda esterifikasyon yönünde reaksiyonları katalizlenmektedir (Paiva vd., 2000).

Lipazlar; serin hidrolazları sınıfı içinde yer alır ve bu nedenle kofaktöre ihtiyaç duymazlar. Geniş substrat spektrumları, yüksek sıcaklık, pH ve organik çözücülere karşı kararlılıkları gibi nedenlerle lipazlar, günümüzde en önemli endüstriyel biyokatalizörler arasında yer almaktadır. Lipazlar; hem sulu hem de susuz ortamda çalışabildiklerinden gerçekleştirilmesi güç reaksiyonların başarılmasını sağlarlar (Villeneuve vd., 2000).

Bugün lipaz aktivitesinin ve triaçilgliserol düzeyinin belirlenmesi için çok farklı biyokimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan başlıcaları; titrimetrik, spektrofotometrik, kolorimetrik, fluorimetrik, türbidometrik, kromatografik, radyometrik, enzimatik, fiziksel ve immünolojik yöntemlerdir. Deeth vd., (2000) çalışmalarında bu yöntemler karşılaştırılmış ve bu çalışmalarda daha ekonomik, uygulama kolaylığı olan titrimetrik ve kolorimetrik metotları önerilmekle birlikte günümüzde, planlanan lipaz katalizli organik reaksiyon türü ve işlem hacmi bakımından düşünüldüğünde önerilen yöntemler de yetersiz kaldığından, yeni yöntem geliştirme araştırmaları bu alanın çalışanları tarafından sürdürülmektedir.

Lipaz aktivitesini kontrol etmek için mevcut yöntemlerin çoğunun maliyet ve zaman gerektirdiği açıktır. Mevcut yöntemler saflaştırılmış örnekler ve büyük ölçekli analizler için henüz yeterince uygun değildir. Bu büyük ölçekli endüstriyel lipaz teknolojileri üzerine daha hızlı bir gelişmeyi engelleyen temel sebep, bu enzimlerde bazen karşılaşılan, düşük aktivite, düşük kararlılık ya da seçicilik ve doğal enzimin maliyetleri olmuştur. Dolayısıyla bu dezavantajlardan kurtulmak için, lipazların çeşitli desteklere fiziksel ve kimyasal immobilizasyonları gerçekleştirilmiştir (Villeneuve vd., 2000). Bununla birlikte, bütün pratik taleplerin eksiksiz yerine getirilmesi biyosensör ilkelerine dayalı enstrümental yaklaşımların uygulanmasıyla yapılabilir. Bunlar arasında, değişik ölçüm esaslı lipaz biyosensörleri geliştirme çalışmaları dikkati çekmektedir. pH metreye dayalı potansiyometrik biyosensör (Kartal vd., 2007), iyon hassas alan etkili transistöre (ISFET) dayalı potansiyometrik biyosensör (Pijanowska vd., 2001), oksijenmetreye dayalı amperometrik biyosensör (Bhambi vd., 2006) bunlardan bazılarıdır. Potansiyometrik biyosensörler, biyolojik reaksiyonu bir elektrik sinyaline dönüştürmek için iyon seçici elektrotlardan yararlanırlar. En basit biyosensör, kataliz reaksiyonun olduğu veya hidrojen iyonlarının absorbe edildiği pH metre elektrodunu çevreleyen immobilize bir enzim membranı bulundurur. Böylece pH metrenin ince cam membranında değişiklik algılanır ve meydana gelen reaksiyona bağlı pH değişikliği, pH metre ekranında doğrudan okunabilir. Bu elektrotların tipik kullanımında, oluşan potansiyel farkı, reaksiyon ile herhangi bir girişime neden olmadan, çok yüksek iç dirençte, etkin sıfır akımı sağlayacak şekilde tespit edilir. Ardından lipaz katalizörlüğünde H^+ iyonları alınması veya verilmesini içeren reaksiyonlar önerilen potansiyometrik lipaz biyosensörü ile algılanabilir (Chaplin M., 2004). Huang ve arkadaşları (2001) cam elektrod esaslı lipaz biyosensör geliştirirken, cam elektrot üzerine lipaz immobilizasyonu için jelatin membranın kullanıldığı prosedürü tarif etmişlerdir. H^+ iyonları algılanırken diğer katyonlarla arasında özel bağlanma yerleri için derişime bağlı rekabete girerler. Bu nedenle potansiyeli oluşturan H^+ iyon farkı cam pH elektrotlarında algılanır (Huang vd., 2001).

Gliseridlerin lipaz katalizörlüğünde hidroliz reaksiyonları çözeltide pH değişimine neden olur (Reddy vd., 2001) ve hidroliz sırasında kapasitans-voltaj (C-V) özelliklerindeki değişimle pH değişikliklerini tespit etmek için kullanılır. Biyosensörün ölçüm prensibi milivolt olarak ölçülebilen pH değişimine dayanır.

Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği; biyosensörü, bir elektronik dönüştürücü ile temas halinde olan biyolojik bir algılayıcı (biyokimyasal reseptör) kullanarak ortamdaki analitlerin miktarları hakkında bilgi elde etmek için tasarlanan aygıtlar olarak tanımlanır (Starodub N.F., 2006). Bir örneğe ek araçlar eklemek gerektiğinde, biyosensörün biyoanalitik sistemden kolayca uzaklaştırılabilmesi gerekir. Biyosensörlerin, ekonomik oluşu, uygulama kolaylığı yanında, kararlılığı, depolanabilirliği ve tekrar kullanılabilirliği temel özellikleridir. Biyosensörler, sadece tek bir analiz için kullanılabilen biyotestlerden bu yönleriyle üstündür.

Lipaz aktivitesi ve substratlarının miktarını belirlemek için farklı biyosensörler geliştirilmiştir. Ancak elektrokimyasal biyosensörler uygun saklama koşullarında çevresel faktörlerden etkilenmeden çalışma kolaylığı sağladığından daha yaygın kullanılabilmesi öngörülmektedir. Lipaz kaynağı, elektrot cinsi, ölçüm esası ve immobilizasyon maddelerinin cinsi ve miktarlarının reaksiyon cinsine göre optimize edilmeleri gerekir. Bazı biyosensör çalışmalarında lipazlar, elektrotlara çeşitli immobilizasyon materyalleri kullanılarak immobilize edilmişlerdir. Bu materyallerden bazıları; kollajen membran (Winartasaputra vd., 1982), Prusya mavisi modifiye screen-printed elektrot (Rejeb vd., 2007), gözenekli silikon (Setzu vd., 2007), selüloz asetat (CA) (Minakshi ve Pundir, 2008) ve polivinil klorür (PVC) (Narang vd., 2010a) olarak sayılabilir.

Bu tez çalışması kapsamında; kanda lipid tayini için ekonomik bir enzim olan lipaz kolay temin edilen pH elektrodu üzerine immobilize edilerek, pH ölçüm esası, karmaşık olmayan bir biyosensör geliştirilmesi amaçlandı. Ticari olarak temin edilen enzimler, jelatin ve glutaraldehid yardımıyla, cam pH elektroduna immobilize edildi. Lipid tayini için enzim cinsi ve miktarı, biyoaktif tabaka bileşenlerinin miktarları optimize edildi. Böylece hazırlanan pH biyosensörünün çalışma koşullarının optimizasyonu ve katalitik karakterizasyon çalışmaları da yapıldı. Son olarak geliştirilen biyosensörün optimize koşullarda kan örneklerinde lipid tayini için uygulanabilirliği gösterildi.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Enzimler

Enzimler canlı organizmalarda meydana gelen tüm reaksiyonların, ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bu reaksiyonları düzenleyen protein yapılı spesifik biyolojik katalizörlerdir. Bir biyolojik sisteme ait genetik bilgi, protein zincirinde yer alacak aminoasitlerin diziliş sırasını belirler. Genetik bilgi tarafından kodlanan proteinlerin çoğu biyokimyasal reaksiyonları katalizleyebilme yeteneğine sahiptirler (Telefoncu, A. 1997).

Enzimlerin katalizledikleri tepkimelerde tepkimeye giren bileşenler 'substrat' olarak adlandırılır. Enzimlerin üç boyutlu katlanmış protein moleküllerinden oluşan yapısında ancak özgün substrat moleküllerinin bağlanabildiği, katalizden sorumlu bir bölge vardır. Bu bölgeye enzimin aktif bölgesi denir. Bunlar, aminoasit kalıntılarından oluşmuş ve özel geometrisi olan yerlerdir. Bu nedenle enzimler özgünlüğü oldukça fazla olan katalizörlerdir. Her enzim, gösterdiği aktivite ile değerlendirilir. Enzim aktivitesi; tanımlanmış koşullarda, birim zamanda gerçekleşen kataliz ya da katalitik tepkimenin hızı olarak tanımlanır (Tüzün, C. 1997).

Enzimler spesifik oluşları ve çok düşük derişimlerde bile substrat reaksiyonlarını katalizlemelerinden dolayı sanayide önemli kullanım alanlarına sahiptirler. Enzimler gıda ve kimya endüstrisinde; tıp, eczacılık, ziraat gibi alanlarda teşhis, tedavi ve biyolojik savaş gibi amaçlarla kullanılırlar (Park ve Hoffman, 1993).

2.1.1. Enzimatik bir tepkimenin hızını etkileyen faktörler

Sıcaklık: Diğer kimyasal tepkimelerde olduğu gibi, enzimatik tepkimelerde de sıcaklığın artması ile moleküller arası çarpışmanın artmasına bağlı olarak genellikle tepkimenin hızı artmaktadır. Ancak, maksimum bir hıza ulaşıldıktan sonra sıcaklığın artışı ile hızda tekrar bir azalma gözlenmektedir. Maksimum hıza ulaşıldığındaki sıcaklığa optimum sıcaklık adı verilmektedir. Enzimler protein yapısında olduğu için bu

sıcaklığın üzerinde denatürasyona uğramaktadırlar. Bundan, önce enzimin molekül yapısı etkilenir. Daha sonra enzimin aktif merkezinde etkilenerek, tepkime hızı düşer.

pH: Enzimlerin aktiviteleri, ortamın hidrojen iyon derişimine bağlı olarak değişmektedir. Enzimatik tepkimenin hızının en yüksek olduğu ve her enzim için değişik olan bir optimum pH değeri bulunmaktadır. pH değişikliği ile aminoasit zincirinin iyonik özelliği değiştii için denatüre olan enzimin katalitik aktivitesi kaybolmaktadır.

Enzim derişimi: Enzimatik bir tepkime ortamında diğer koşullar sabitken, fazla miktarda substrat bulunması halinde tepkimenin hızı, enzim derişimi ile orantılı olarak artar. Denge halinde enzim derişiminin denge sabiti üzerine etkisi yoktur. Enzimler tepkime hızını etkilerken, hız ve denge sabitleri üzerine etkisizlerdir.

Substrat derişimi: Ortamda bulunan enzim derişimi ve diğer koşullar değişmediğinde tepkimenin hızı, başlangıçta substrat derişiminin artırılması ile doğrusal bir artış göstermektedir. Fakat substrat arttırıldıkça hız giderek daha az artmakta ve belirli bir substrat derişiminde maksimum hıza (V_{max}) ulaşarak sabit kalmaktadır. Substrat derişiminin daha fazla artmasına rağmen tepkime hızı değişmemektedir (Erarslan A., 2002).

2.1.2 Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler katalizledikleri reaksiyonun tipine bağlı olarak altı sınıfa ayrılırlar. İsimlendirilmeleri; katalizledikleri reaksiyon adının sonuna –az eki getirilerek yapılır. Örneğin; hidroliz reaksiyonlarını katalizleyenler hidrolazlar, izomerizasyon reaksiyonlarını katalizleyenler izomerazlar olarak isimlendirilir.

Ayrıca her enzimin Uluslararası 4 rakamlı bir kod numarası vardır, kod numaralarının ilki enzimin ana sınıfını gösterir. Bu yüzden enzim sınıflamasında sıra kesinlikle değiştirilemez. Enzim kodu E.C. X.X.X.X şeklinde gösterilir. E.C. enzim sınıfının (Enzyme Classification) göstergesidir. Örneğin, 3.6.1.3. "ATP fosfohidrolaz" da birinci numara sınıfını, ikinci numara alt sınıfını, üçüncü numara grubunu, dördüncü numara da kendine özgü sıra numarasını verir.

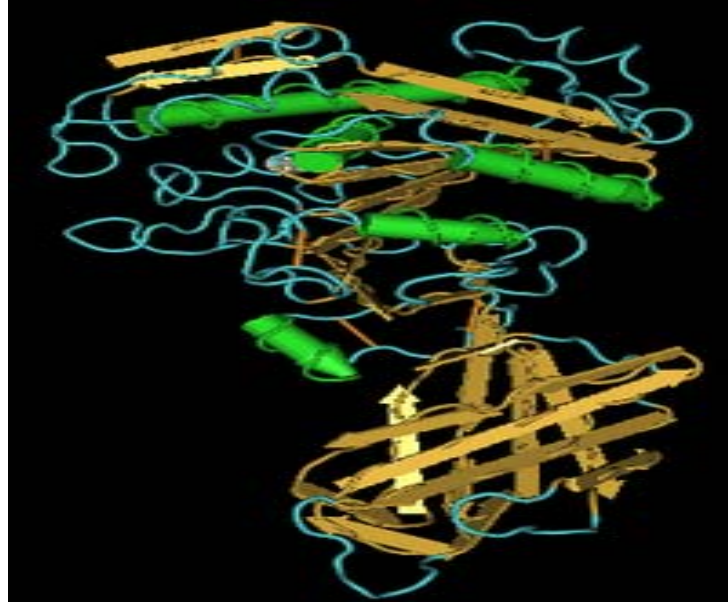
Enzim sınıfları

1. Oksidoredüktazlar: Redoks tepkimelerini katalizler.
2. Transferazlar: Hidrojenin dışında bir atomun veya atom grubunun (metil, karboksil, glikozil, amino, fosfat grupları) bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlarlar.
3. Hidrolazlar: Bir molekül su sokmak suretiyle ya da su molekülü aracılığıyla moleküllerin yıkılmasını sağlayan enzimlerdir. Ester, peptit, asitanhidrit ve glikozidik bağlarına etki ederler.
4. Liyazlar: Su molekülü çıkarmadan molekülleri yıkan enzimlerdir, örneğin C-C bağı, aldolaz ve dekarboksilazla yıkılır. Keza C-O ve C-N bağım yıkanlar da vardır.
5. İzomerazlar: Molekül içinde değişiklik yaparak onun uzayda dizilişini değiştiren enzimlerdir. Örneğin razemaz, epimeraz.
6. Ligazlar: Enerji kullanarak substrat moleküllerinin birbirine bağlanmasını; örneğin aminoasitlerin ve yağ asitlerinin aktifleşmesini sağlarlar. (<http://www.genetikbilimi.com/genbilim/enzimler.htm>)

2.2. Lipaz Enzimleri

Lipazlar normal şartlar altında bitkisel ve hayvansal yağların; C-N, C-O, C-C bağlarını su yardımıyla tersinir olarak hidrolizleyen hidrolaz sınıfı enzimlerdir. Adlandırması; Triaçilgliserol Açıl Hidrolaz (E.C. 3.1.1.3) şeklindedir.

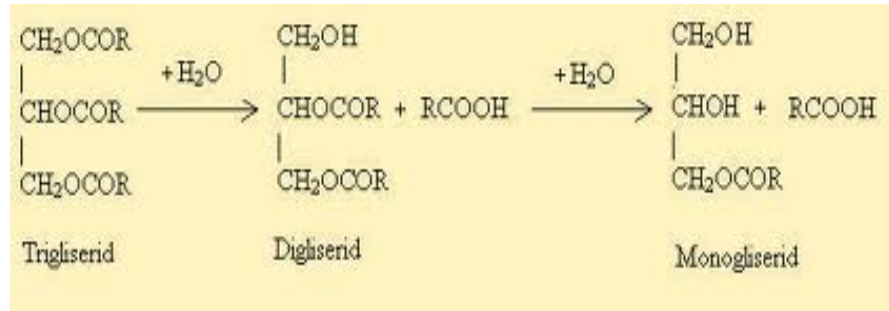
Lipaz yapıları; aminoasit dizisi bakımından birbirinden çok çeşitli olabilir. Lipazlar protein zinciri ve katalitik merkez bakımından incelendiğinde birkaç tipten oluşurlar. Çoğu **Şekil 2.1**'de gösterilen kobay pankreatik lipazının şematik yapısında görüldüğü gibi alfa/beta hidrolaz katlanmasına sahiptirler. Kullandıkları hidroliz mekanizması kısmen bir proteaz enzimi olan kimotripsininkine benzer. Lipazların aktif merkezi genelde bir serin nükleofili, bir aspartik asit kalıntısı ve bir histidinden oluşur (<http://www.msxlab.org/>).



Şekil 2.1. Kobay pankreatik lipazının şematik yapısı
(<http://tr.wikipedia.org/wiki/Lipaz>)

Son yıllarda lipaz enzimi araştırmalarına olan ilgi artmıştır. Bunun sebepleri; lipazların çok çeşitli substratları kullanabilme yeteneği, yüksek-düşük sıcaklık ve pH değerlerinde ve organik çözücülere karşı yüksek kararlılıkları, muhtemel ürünlerine karşı yüksek seçiciliğe sahip olmaları ve ekonomik oluşları sayılabilir. Bu özellikler lipaz enzimlerine geniş bir sıcaklık ve basınç aralığında reaksiyonları katalizleme olanağı sağlamaktadır (Wiseman, A., 1986; Türk B., 2008).

Lipazların genel katalitik hidroliz reaksiyonu **Şekil 2.2**'de verilmiştir.



Şekil 2.2. Lipazların genel katalitik hidroliz reaksiyonu

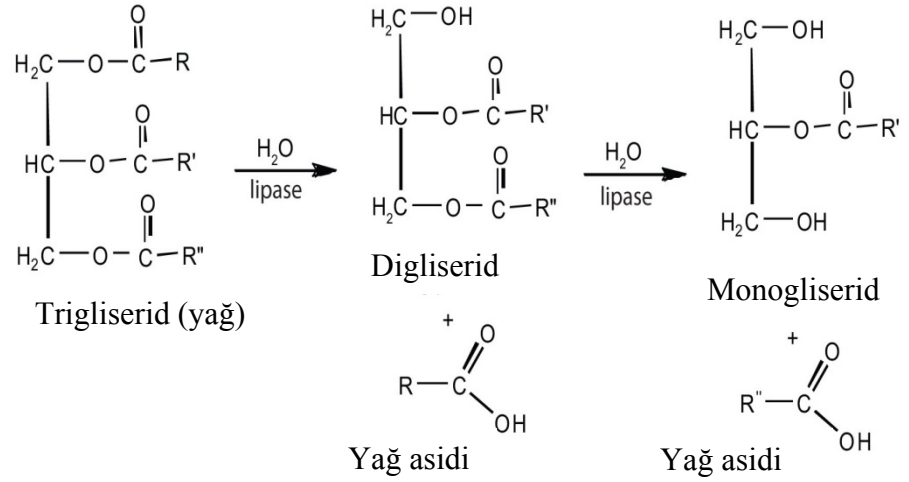
Lipazlar serin hidrolazları sınıfı içinde yer alır ve bu nedenle hiçbir kofaktöre ihtiyaç duymazlar. Lipazlar; hem sulu hem de susuz ortamda gerçekleştirilmesi güç reaksiyonların başarılmasını sağlayabilen biyokatalizörlerdir.

Bitkisel, hayvansal ve doğal veya genetik olarak iyileştirilmiş mikrobiyal kaynaklardan izole edilebilirler. Bu kaynaklar arasında en geniş uygulama alanı bulan lipazlar; mikrobiyal lipazlardır. Bunun sebebi; mikroorganizmaların kolay yetiştirilebilmeleri, üretim ve genetiklerine kolaylıkla müdahale edilebilmeleridir (Türk B., 2008).

Günümüzde enzimlerin kullanıldığı pek çok alanda lipazların önemi giderek artmaktadır. Lipazların enzim pazarındaki payının büyümesinde, bu enzimlerin enantioseçicilik, bölgesel seçiciliği ve geniş substrat özgüllüğü gibi özellikleri etkili olmuştur (Jaeger ve Eggert, 2002).

Lipazlar, aktif konumu koruyan sarmal bir oligopeptid birimine sahiptirler. Bu birim tıpkı bir yağ damlacığı gibi hidrofobik ara yüzeylerle etkileşime geçmekte, böylece aktif merkez ile substrat daha kolay bir araya gelmektedir (Paiva vd., 2000).

Katalitik serin aminoasidine ilave olarak çoğu lipazın aktif merkezi histidin ve başka bir aminoasit (Asp veya Glu) daha içerir. Nükleofilik serin bir β -bandı ile α -heliksinin arasında yer alırken histidin, aspartik asit veya glutamik asit ise serinin diğer yanlarında yer alır. Katalitik bölgeyi içeren aminoasitler çoğu lipaz yapısında korunur. Lipazlar için tahmin edilen katalitik mekanizma aktif merkezde bulunan serin aminoasidi üzerinde yoğunlaşmıştır. Serinin nükleofilik oksijeni trigliserid ile tetrahedral hemiasetal bir ortam oluşturur. Hemi asetalin ester bağı hidroliz olur ve diaçilgliserid serbest kalır. **Şekil 2.3'** te lipaz katalizörlü trigliserid hidrolizi aşamaları verilmiştir. Aktif merkezdeki serin açil esterinin bir su molekülü ile tepkimeye girdiği, daha sonra açil enzimin bölündüğü ve yağ asidinin ayrıldığı tahmin edilmektedir. Katalitik prosesin bu aşamasında ürünün aktif merkezden ayrılması özellikle önem taşımaktadır (Petersen vd., 2001).



Şekil 2.3. Lipaz katalizörlü trigliserid hidrolizi

Lipazlar katalitik aktivitelerini substrat emülsiyonunun yağ-su ara yüzeyinde gerçekleştirir ve enzimatik reaksiyonun hızı, oluşan yüzey alanına bağlıdır. Lipazlar; yağ asitlerinin zincir uzunluğu, doymuşluk derecesi, yağ asidinin pozisyonu ve substratın fiziksel durumuna uygun spesifikite gösterirler. 4-10 karbonlu yağ asitleri daha uzun karbonlu yağ asitlerine göre daha hızlı bir şekilde hidroliz olarak yağın yapısından ayrılır ve serbest hale geçerler (Öztürk B., 2006).

Bazı lipazlar yağ asitleri ve gliserin arasındaki bağları rastgele parçalar; gliserin molekülünün yerleşimi önemli değildir. *C.rugosa*, *Chromobacterium* spp. ve *Staphylococcus aureus* gibi mikroorganizmalardan elde edilen lipazlar bunlara örnek verilebilir. Pozisyon seçiciliği olan lipazlar ise sadece *sn*-1,3 pozisyonundaki ester bağlarını parçalar. Bu gruba örnek olarak ise *Aspergillus niger*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus* ve *Rhizopus delemar* gibi organizmalardan elde edilen lipazlar verilebilir. Bazı lipazlar ise yağ asidinin zincir uzunluğuna göre seçicidir, yani bazıları uzun zincirli yağ asitlerini parçalarken bazıları kısa zincirli yağ asitlerini parçalar. *Penicillium cyclopium* lipazı uzun zincirli yağ asitlerini parçalarken *Aspergillus niger* ve *Aspergillus delemar* lipazları ise kısa zincirli yağ asitlerine seçicilik gösterir. Son grup lipazlar ise yağ asidi seçici lipazlardır, bunlar ise *cis*-9 pozisyonundaki çift bağa duyarlıdır. *Geotrichum candidum* lipazı *cis*-9 pozisyonunda çift bağ içeren uzun yağ asitlerine seçicidir (Öztürk B., 2006).

Lipid karakterli substrat suda çözünmemesine rağmen lipaz suda çözünür. Kataliz reaksiyonu lipid-su ara yüzeyinde gerçekleşir. Lipazın aktif merkezinin girişinde yer alan, sarmal oligopeptid birimi, lipid-su arayüzeyinde katalizin etkili olmasını sağlar. Sözü edilen birim lipid damlacıklarının hidrofobik aktif merkeze erişimini kolaylaştırır (Alberchina ve Lotti, 1998).

2.2.1. Lipazların özellikleri

Lipazın aktivasyon ve inhibisyonu

İyonların ve reaktiflerin lipaz aktivitesine olan etkilerinin incelenmesi sonucu, ağır metal iyonlarının lipaz aktivitesini inhibe ettiği bunun tersi olarak alkali metal iyonlarının ise arttırdığı görülmüştür. Lipaz aktifliği üzerine en etkili iyon Ca^{2+} dur. Lipaz aktivitesini inhibe eden iyonlara Co^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Sn^{2+} , borasitleri ve dietil-p-dinitrofenil fosfat örnek olarak verilebilir. **Tablo 2.1**'de bazı lipazlara ait özellikler verilmiştir (Akoh ve Min, 1998).

Tablo 2.1. Bazı lipazlar ve özellikleri

Kaynak	Spesifik pozisyonu	pI	İnhibitörler	Aktivatörler
Domuz Pankreası	1,3 Spesifik	-	Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+}	Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , İyodin, PCMB
<i>Phycomyces nitens</i>	-	5.9	Ag^+ , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , $KmnO_4$, NBS	Memeli safrası
<i>Aspergillus niger</i>	1,3 Spesifik	4.1	Ag^+ , İyodasetamit	-
<i>Candida rugosa</i>	Non-Spesifik	4.5	Hg^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+}	-
<i>Candida cylindracea</i>	Non-Spesifik	4.0	-	-

Optimum pH

Lipazlar belli pH değerlerinde katalitik olarak aktiftir. Lipazların çoğu için optimum pH 7-8 arası değişir. Mikrobiyolojik kaynaklı lipazların pH kararlılık aralığı 6.0-7.5 civarındadır.

Optimum sıcaklık ve termal kararlılık

Genel olarak lipazların maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık aralığı 30-40°C dır. Genellikle hayvan ve bitki lipazlarının, mikrobiyal hücre dışı lipazlara göre termal kararlılığı daha düşüktür. Pankreatik lipazlar ise genelde 40°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda aktivitelerini kaybederler.

İzoelektrik nokta (pI)

Proteinlerin bulunduğu çözeltide net yükünün sıfır olduğu pH noktasına izoelektrik nokta (pI) denir. pI civarında proteinler daha çok çökerken, pI' dan uzaklaştıkça daha fazla çözünürler. **Tablo 2.1'**de bazı lipazların izoelektrik noktaları verilmiştir (Fadiloğlu S., 1996; Petersen vd., 2001).

2.2.2. Lipazların sınıflandırılması

Lipazları spesifisite özelliklerine göre üç grupta incelenir.

2.2.2.1. Spesifik olmayan (Non-spesifik) lipazlar

Bu gruba giren enzimler trigliseridlerin tüm pozisyonlarındaki açıl gruplarını hidrolizleme yeteneğine sahiptirler. Reaksiyonda ara ürünler diaçil ve monoaçil gliseridlerdir. Reaksiyon sonucunda; trigliseridlerin tamamı dengeye göre gliserin ve yağ asitlerine ayrılırlar. Bu çalışmada **Tablo 2.1.**'de çeşitli özellikleri açıklanan Sigma Firmasından temin edilen spesifik olmayanlar grubuna giren *Candida rugosa* lipazı (E.C. 3.1.1.3) biyosensör biyobileşeni olarak kullanıldı.

2.2.2.2. Gliserinin 1,3 yerine spesifik lipazlar

Bu gruba giren lipazlar nötral yağları eşdeğer konuma sahip olan 1 ve 3 pozisyonlarından spesifik olarak hidrolizlerler. Reaksiyon sonunda triaçil gliseridlerden yağ asitleri, 1,2 (2,3)-diaçil gliseridler ve 2-monoaçilgliseridler oluşur. 1,2 (2,3)-diaçil gliseridler ve özellikle 2-monoaçilgliseridler kimyasal olarak kararsız olup sırasıyla 1,3-diaçil gliseridlere ve 1(3)-monoaçil gliseridlere izomerleşirler. Böylece oluşan izomerler enzim tarafından tekrar substrat olarak kullanılabilirler ve sonuçta 1,3-spesifik lipazlarda spesifik olmayan lipazlar gibi trigliseridleri gliserin ve serbest yağ asitlerine kadar parçalarlar. Pankreatik lipaz bu gruba girmektedir.

2.2.2.3. Yağ asiti spesifik lipazlar

Bu grup lipazlar açil gliseridlerdeki bazı yağ asitlerine spesifik olup bu yağ asitlerinin oluşturduğu ester bağlarını hidrolizlerler.

2.3. Enzim İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon kelime anlamı olarak, tutuklanmış, hareketi sınırlandırılmış, çözünmez hale getirilmiş demektir (Zaborsky O., 1974). Genel anlamda ise, enzim moleküllerinin suda çözünmeyen katı destek maddelerine bağlanması veya hapsedilmesidir. Enzimler polimer veya gözenekli taşıyıcılara bağlanarak, yine suda çözünmeyen yüzey aktif taşıyıcılarda adsorplanarak, biyofonksiyonel reaktiflerle çapraz bağlanarak ve polimer matrikste, yarı geçirgen membran veya mikrokapsüllerde hapsedilerek immobilize edilirler (Akoh ve Min, 1998).

Enzim immobilizasyonunun başlıca avantajları şunlardır:

- * Defalarca kullanılabilmekte ve bu da üretim maliyetini düşürmektedir.
- * İstenildiği anda ortamdaki uzaklaştırılabilir.
- * Serbest enzime göre kararlılığı yüksektir.
- * Sürekli yöntemlerde kullanılabilir.

Son yıllarda immobilize enzim sistemlerinin tedavi amacıyla yapay hücre ve organ yapımında kullanılmaya başlanması bu alanda çok büyük bir aşamadır. Tıp ve eczacılık gibi sağlık alanlarının yanı sıra immobilize enzim sistemleri gıda, çevre ve kimya endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle enzim elektrotlarının yapımı, analitik amaçlı kullanımını yaygınlaştırmıştır. Immobilize enzimler organik sentezler gibi çok daha spesifik alanlarda da kullanılmaktadır (Bickerstaff G.F., 1997).

Bununla birlikte immobilizasyonun dezavantajları da vardır.

1. Immobilizasyon sırasında sıcaklık, pH değişimi, serbest radikaller oluşması gibi etkenler enzimin denatüre olmasına, dolayısı ile aktivitesini kaybetmesine sebep olur. Bu nedenle enzim immobilizasyonu sırasında aktif gruplar korunmalı ve immobilizasyon çok ılımlı koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleştirilmelidir.
2. Çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzim kararlılığı sınırlıdır.
3. Enzim taşıyıcılarının maliyeti bazen yüksektir.
4. Immobilizasyon sırasında enzim molekülleri konformasyonel değişikliğe uğrayabilir.

Bunlardan başka; immobilize enzimlerde, enzim cinsine, destek materyaline ve immobilizasyon metoduna bağlı olarak bazı yeni özellikler de ortaya çıkabilir. Bunlar aktiviteyi olumlu ya da olumsuz olarak etkileyebilirler. Aşağıda genel olarak bu olasılıklara değinilmiştir.

İmmobilize enzimlerin aktivitelerine etkileyen çeşitli faktörler vardır. Bunlar, immobilizasyonda kullanılan kimyasalların tipi, destekle enzimin karşılıklı etkileşmesi, aktifleştirici veya çapraz bağlayıcı kimyasallar ile enzimin etkileşmesi olarak belirtilebilir. Enzimler içinde buldukları çevre tarafından etkilenirler. Enzimin katı destek üzerinde immobilizasyonu enzimin etrafındaki mikro çevreyi etkiler, bu da enzimin görünen davranışları üzerinde aşağıda belirtildiği gibi bazı değişiklikler oluşturur (Gloger ve Tischer, 1981).

Bölme etkisi: İyonik yapıya sahip bir substrat, poliiyonik destekli tepkime ortamında homojen olarak dağılamayabilir. Bu durumda immobilize enzim çevresinde farklı derişimler de bulunabilir. Ölçülen derişim değerleri de doğal olarak farklı

olacaktır. Bölme etkisi denilen bu durum sık gözlenir. Buna ilaveten, çözünen madde ile polimerik destek arasında hidrofobik etkileşmeler de olabilir.

Difüzyon Sınırlaması: Substratın ve destek materyalinin gözeneklerinin fiziksel büyüklüğü ile ilgilidir. Eğer polimer desteğinin gözenek çapı substrat molekülünden küçük ise substratın destek içine difüzlenerak enzime ulaşması engellenir ve bunun sonucu olarak katalitik tepkime meydana gelmez.

Yapısal değişiklikler: İmmobilize enzimin belli bir pozisyonda uzun süre kullanılması sırasında enzim ve destek materyali arasında daha çok sayıda bağlanma olabilir. Bu enzimin katalitik aktifliğinde, K_m ve V_{max} değerlerinde de değişmelere sebep olabilir.

Sterik sınırlamalar: Eğer immobilize enzimin aktif uçları substrat molekülünün yaklaşmasına elverişli pozisyonda değil ise sterik problemler ortaya çıkar. Örneğin enzimin aktif grupları destek maddesine dönük ise substratın aktif merkeze yaklaşması engellenir. Enzim polimerik kafeste hapsedildiğinde, substrat moleküllerinin enzime yaklaşış direk temasa geçmesi matriks tarafından engellenebilir.

İnaktivasyon: İmmobilizasyon işlemi sırasında olabilecek keskin pH değişimleri ve serbest radikallerin oluşumu gibi zor tepkime şartlarında gerçekleşen immobilizasyon işlemleri, enzimin kısmen veya tamamen aktifliğini yitirmesine sebep olabilir. Böylece immobilize enzimin aktivitesi, serbest enzimin aktivitesinden daha düşük olabilir.

2.3.1. Taşıyıcı destek materyali

Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik destek materyali kullanılmaktadır. İdeal bir destekten beklenen özellikler şunlardır: mekanik, kimyasal ve ısıl dayanıklılık, yüksek immobilizasyon kapasitesi, ürün inhibisyonunu azaltması, pH'ı değiştirmemesi, tekrar kullanıma uygun olması, hidrofilik karakteri, suda çözünmeme, gözenekli yapı, zehirsizlik, ekonomik olmasıdır.

Enzim immobilizasyonunda genellikle sentetik kimyasal maddeler ve sentetik makromoleküller destek materyali olarak kullanılmaktadır. Destek materyalinde

hidroksil, karboksil ve amino grupları gibi aktif gruplar bulunmaktadır. Enzimlerin immobilizasyonu sırasında bu gruplar korunmalı ve enzim aktifliğini yitirmemelidir. Bununla birlikte, destek için kullanılan kimyasallar, bazı durumlarda enzimleri kısmen veya tamamen çalışamaz hale getirebilir. Enzim immobilizasyonunda kullanılan malzemelere akrilamit ve akrilat esaslı polimerler, polipeptitler; doğal malzemelere ise agaroz, dekstran, selüloz, kollajen ve cam örnek olarak verilebilir (Yahşi A., 2005).

Organik destekler; doğal polimerler, proteinler, aktif karbon ve sentetik polimerler olmak üzere sınıflandırılabilir. Organik desteklere oldukça fazla sayıda ve çeşitli fonksiyonel gruplar katılabildiği için ticari olarak kullanılan pek çok immobilize enzim sistemi bu desteklerle hazırlanır (Chen vd., 1996). Yaygın olarak kullanılan polisakkarit desteklerinden olan agaroz, dekstran, selüloz türevleri enzimleri bağlamada ve aljinat ile karregenana ise hapsedme amacıyla kullanılır (Bachman vd., 2006; Cabral, vd., 1991). Enzimlerin immobilizasyonunda kullanılan polisakkarit türevlerinin en büyük avantajı hidroksil gruplarına sahip olmasıdır. Polisakkarit desteklerde hidroksil grupları enzimlerin elektrofilik grupları ile etkileşerek enzim immobilizasyonu sağlar. Bununla birlikte polisakkarit desteklerin nükleofilik özelliklerinin zayıf olması nedeni ile aktivasyonu alifatik veya aromatik, karboksil veya tiyol grupları ilavesi ile sağlanır.

Sentetik polimerler; fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı enzim immobilizasyonunda destek materyali olarak çok kullanılırlar. Sentetik polimerler mikroorganizmaların saldırılarına karşı dirençlidirler ve saflıklarını korurlar. Yaygın olarak kullanılan sentetik taşıyıcılar polistiren, vinil ve allil polimerler, poliamitler, poliakrilatlar, polimetakrilatlar ve bunların türevleridir. **Tablo 2.2'**de enzim immobilizasyonunda kullanılan bazı destek materyaller verilmiştir. Akrilik polimerleri enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan asidik sentetik polimerlerdir. Bu polimerler, enzim hapsedme veya kovalent bağlama amacıyla kullanılmıştır (Kennedy ve Cabral, 1985).

Tablo 2.2. Enzim immobilizasyonunda kullanılan destek materyalleri

Doğal Polimer	Sentetik Polimer	Anorganik
Selüloz	Stiren esaslı polimerler	Kil
Nişasta	Akrilamit esaslı polimerler	Cam
Aljinat	Naylon	Silikajel
Karragenan	Vinil ve allil polimerler	Ponza taşı
Kollagen	Akrilat esaslı polimerler	Aktif karbon
Jelatin	İyon değiştirici reçineler	Metaller
Albümin	Maleik anhidrit polimerleri	Metal oksitler
İpek		Bentonit

2.4. Lipid Tayin Yöntemleri

Lipazlar hidrolazlar sınıfından triaçilgliseridler başta olmak üzere benzer esterleri tersinir olarak hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Yağ asidi esterlerini gliserin ve yağ asitlerine ayırırlar ve serbest kalan asit derişimine bağılı olarak lipaz aktivitesi tayin edilir. Lipaz aktiviteleri; serbest kalan yağ asitlerinin kalitatif olarak Jel-difüzyon testi ve kantitatif olarak titrimetrik, spektrofotometrik, kolorimetrik, türbidimetrik, kromotografik (TLC- GC- HPLC) ve immünolojik yöntemlerle belirlenir.

Jel-difüzyon yöntemi: Geniş ölçüde çeşitli mikroorganizmaların kültür süpernatantlarında lipazları taramak için kullanılır. Triaçilgliseridlerin lipolizi ile oluşan asitler, fenolfitaleyin, mavi nil sülfatı veya victoria mavisi gibi indikatörlerle renklendirilerek tayin edilir. Bu testler agar plaklarında büyüyen lipolitik mikroorganizmaların hızlı taranması için uygundur (Lawrence vd., 1967).

Titrimetrik yöntem: Bu kantitatif yöntem, lipaz aktivitesi tayininde kolaylığı, güvenilirliği, doğruluğu ve tekrarlanabilirliği nedenleriyle en eski ve yaygın kullanılan bir tekniktir (Ferrato vd., 1997).

Uluslararası kabul gören lipaz substratları triolein ya da % 70 triolein içeren zeytinyağıdır (Jensen R.G., 1983). Bunlara ilaveten tercih edilen diğer substratlar tribütirin, triasetin ve tripropiyonindir (Staubmann vd.,1999; Lanz ve Williams, 1973). pH-stat yöntemi 1 dakikada açığa çıkan 1 mol serbest yağ asidini ölçebilen oldukça hassas bir yöntemdir (Jaeger vd., 1994). Ancak, serbest yağ asitleri tamamen iyonize olmadığı için, 7'den düşük pH değerinde, bir düzeltme faktörü tanımlamak gerekebilir (Gargouri vd., 1986). Bu yöntem, ham ve rafine yağlarda serbest yağ asitlerini belirlemek için sık kullanılır (Ghosh vd., 1996).

Spektrofotometrik yöntem: Maddelerin kantitatif ölçümünde basit fotometre her zaman laboratuvarın vazgeçilmez bir aygıtı olmuştur. Işık dalga formunda ışıyan bir enerji formudur. Renkli bir çözeltinin rengi bazı dalga boylarındaki ışığı emip diğerlerini geçirmesinden kaynaklanmaktadır. Tüm spektrofotometrelerde monokromatik ışık (tek dalga boyu) belli derinlikteki emici bir kolondan ya da renkli bir çözeltiden geçtiğinde ölçülen absorbans yalnızca ölçülen maddeye değil sıvının içindeki diğer maddelere de aittir. Bu yüzden kör deneyle diğer maddelerin absorbansı belirlenmeli ve sıfırlanmalıdır. Fotometrede ölçümü etkileyen iki faktör maddenin rengi ve rengin şiddetidir. Absorbansa bağlı hesap işlemi Beer Kanunu ($A = \epsilon \cdot l \cdot c$) ile yapılır. Burada A: absorbans, ϵ : renkli bileşiğin absorbtivite katsayısı, l: çözeltideki ışığın ışık yolu ve c de konsantrasyondur. Klinik Biyokimya Laboratuarlarında trigliserid tayininde rutin kullanılan bir yöntemdir.

Ölçüm Prensipleri: Trigliserid, lipoprotein lipaz tarafından gliserol ve yağ asitlerine hidrolize edilir. Daha sonra gliserol, gliserol kinaz tarafından katalize edilen bir reaksiyonla adenzin trifosfat tarafından gliserol-3-fosfata ve adenzin difosfata fosforile edilir. Gliserol-3-fosfat daha sonra gliserolfosfat oksidaz tarafından dihidroksiaseton fosfat ve hidrojen peroksite dönüştürülür. Daha sonra hidrojen peroksit, peroksidaz tarafından katalize edilen bir reaksiyonla kırmızı renkli kinonimin boyası üretmek üzere 4-aminoantipirin ve p-klorofenol ile reaksiyona girer. Bu dört reaksiyon sonucunda oluşan renkli kompleksin renk şiddeti, fotometrede ölçülür. Standart değeri kullanılarak trigliserit miktarı hesaplanır (Adam ve Ardiçoğlu, 2002).

Kolorimetrik yöntem: Toplam lipid tayininde “sülfo-fosfo-vanillin” reaksiyonu kullanılır. Ayrıca hızlı, güvenilir ve kolay bir yöntem olduğu için tercih edilir. Serum

içerisindeki toplam lipid miktarının kantitatif olarak saptanması için üretilmiş olmakla birlikte uygun kalibrasyon grafiği çizilmesi durumunda lipid içerikli diğer örneklerin lipid derişimlerinin saptanması içinde kullanılmaktadır. Hazır test kitleri ile de uygulanabilir (Jacobs ve Henry, 1962). Sülfö-fosfo-vanillin yönteminde lipid sülfürik asit ile reaksiyona girmekte ve karbonyum iyonları oluşturmaktadır. Karbonyum iyonları ise vanillin fosfat esterleri ile reaksiyona girerek renkli kompleksler meydana getirir. Fosfovanilin metodu ile total lipid tayinin prensibini, lipidin sülfürik ve fosforik asitli ortamda vanilin ile pembe renkli kompleks meydana getirmesi oluşturur. Renk yoğunluğu takip edilerek ortamdaki toplam lipid miktarı ölçülebilmektedir (Knight vd., 1972).

Türbidimetrik yöntem: Kolloidal parçacıklar içeren bulanık bir çözeltinin ışığı saçma özelliğini temel alır. Çözeltinin bulanıklığı ile bu bulanıklığı yaratan maddenin derişimi arasında bir ilişki vardır. Bu ilişki kalibrasyon eğrilerinin hazırlanması ile belirlenir.

Kromatografik yöntem: Kromatografi doğrudan enzim katalizli lipid substratının hidroliziyle açığa çıkan yağ asitlerinin belirlenmesi yöntemlerini kapsar. Başlıcaları; TLC, GC ve HPLC'dir. Bunlar aşağıda kısaca açıklanmıştır.

TLC: Triaçilgliseridlerden açığa çıkan serbest yağ asitlerinin kantitatif analizi radyoaktif triaçilgliseridler ile dansitometrik veya otoradyografik yöntemleri kullanılarak yapılabilir. Bu yöntemler çok hassastır ve birkaç pikomol yağ asidini tespit edebilir. Bu işlemlerin ana dezavantajı ise çok zaman alıcı ve kesintili olmasıdır (Ruiz ve Rodriguez-Fernandez, 1982). TLC daha yüksek performans gösterir.

GC: Resmi Amerikan Kimyagerler Derneği yönteminde; yağ asitleri, metil esterlerine dönüştürülür. Hazırlanan metil esterinin GC analizinin ardından yağ asitleri tayin edilmektedir. Ayrıca, lipaz aktivitesi ve seçiciliğini çeşitli reaksiyon koşullarını test etmek için sıcaklığa bağlı GC prosedürü de geliştirilmiştir (Bereuter ve Lorbeer, 1995).

HPLC: Lipazın hidroliz ürünleri kolayca HPLC cihazı kullanılarak tayin edilebilir. Önemli olan uygun çözücü sistemin bulunmasıdır. *Pseudomonas sp.*, *C.rugosa*, *Rhizopus arrhizus*, *Geotrichum candidum* (Brune ve Gotz, 1992) ve

Penicillium sp. (Gulomova vd.,1996) lipazlarının hidroliz ürünlerinin analizinde kullanılmıştır.

2.5. Biyosensörler

Tüm canlılar yaşadıkları ortamdaki değişimleri derhal algılayıp yaşamlarını sürdürebilmek için değişimlere uymaya çalışırlar. İşte bu algılama mekanizması biyosensörlerin *in vitro* kullanımı için temel oluşturmuştur (Telefoncu A., 1999). Canlılarda ilgili mesajları algılamayı sağlayan sistemlerin elektriksel analiz sistemleri ile birleştirilmesi biyosensörleri meydana getirir (Timur vd., 2003).

Klasik elektrokimya ile sadece anyonları ve katyonları belirleyen sensör hazırlanabilirken sisteme biyobileşenin de katılması ile diğer birçok maddenin tayini mümkündür. Böylece hazırlanan analiz sistemlerine “Biyosensörler” adı verilir (Telefoncu A., 1999a).

2.5.1. Biyosensörlerin bileşenleri

Biyosensörler; biyobileşenler (reseptör) ile fiziksel bileşenlerden (transdüser) oluşurlar. Biyosensörlerin görevi, biyolojik bir değişimin elektriksel bir sinyale dönüştürülmesidir. Biyosensörler, spesifik bir analit ya da analitler grubunun derişimine bağlı olarak sinyal oluştururlar (Telefoncu A., 1999b). Aşağıda **Şekil 2.4'** de biyosensör şeması, biyobileşenleri (biyoreseptör) ve fiziksel bileşenler (dönüştürücü) gösterilmiştir. **Tablo 2.3** ' de ise biyosensörlerde kullanımı muhtemel biyobileşenler verilmiştir.



Şekil 2.4. Biyosensörlerin biyoreseptör ve dönüştürücü çeşitliliği

Tablo 2.3. Biyosensörlerdeki kullanımı muhtemel biyobileşenler

Biyoreseptör Çeşitleri	Yapısal bütünlük için gerekli olan ana ihtiyaç	Üretilen sinyal çeşidi
Organ parçası	Bozulmamış doku	Aksiyon potansiyeli
Doku	Besin ve oksijen temini	Metabolik son ürün
Hücrenin kendisi		
Hücre organeli (örn.:mitokondri)	Ozmotik ve asidik kararlılık	Elektron zincir ürünleri
Biyomembran (örn.:reseptörler)	Mekanik koruma	Salınan içerikler
Enzim	pH ve elektrolit kararlılık	Reaksiyon ürünü
Antikor	pH kararlılığı	Antijen tutumu/ kütle farkı

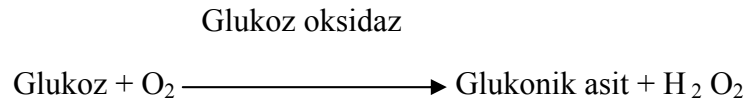
Biyosensörlerin **biyolojik bileşeni**; katalitik olan ve olmayan biyobileşenler olarak iki önemli gruba ayrılırlar. Katalitik özellikteki grup; enzim, mikroorganizma ve dokuları içerirken, katalitik olmayan özellikteki grup; antibadiler, reseptör ve nükleik asitlerden oluşur (Sharma vd., 2003). Bu biyomoleküllerden en çok kullanılan enzimlerdir. Enzimler hedef moleküllere karşı oldukça özgüdür. Binlerce farklı analit içinden hedef analiti seçip reaksiyon oluşturabilen bu biyokatalizörlerin dönüştürücülere bir şekilde immobilize edilmesi yani yapılandırılması gerekmektedir.

Biyomoleküllerin dönüştürücülere immobilizasyonunda amaca bağlı olarak çeşitli yöntemler kullanılır. **Dönüştürücüler**, biyobileşenin analiti tanıdıktan sonra ortamda oluşan fiziksel veya kimyasal değişimi algılayıp bunu ölçülebilir dijital sinyallere dönüştüren aletlerdir (Shah ve Wilkins, 2003). Biyosensörlerin, analitlerin tayini için gerekli olan fiziksel bileşeni amperometrik, potansiyometrik ve kondüktometrik gibi elektrokimyasal ölçümler, optik, termometrik, piezoelektrik ölçümler ya da manyetik ölçümlerden oluşabilir (Sharma vd., 2003).

2.5.2. Biyosensörlerde dönüştürücü tipleri

Başlıca tipleri; piezoelektrik, elektrik kapasitans, iletkensel, termometrik, iyon derişimi değişimi (FET) tipi ve geleneksel dönüştürücülerdir.

Örneğin; glukoz biyosensörü verilebilir. Kandaki glukoz tayininde glukoz biyosensörü kullanıldığında analit glukoz iken glukozoksidaz enzimi biyobileşendir. Aşağıdaki reaksiyona göre glukoz yükseltgendiğinde iki ürün oluştuğu görülür.



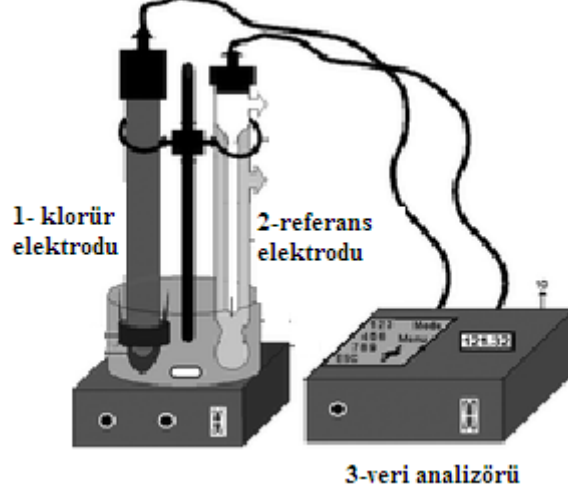
Ürünlerden biri asit, diğeri H₂O₂ iken reaktif olarak da O₂ harcanır. Buna göre kullanılacak dönüştürücüler, bu 3 farklı bileşiği ölçebilen 3 farklı dönüştürücüden herhangi biri olabilir.

1. Oksijen sensörü: Ortamda kullanılan oksijen miktarına bağlı değişen bir sinyal olan elektrik akımına dönüştürür.

2. pH sensörü: Glukonik asit ortamın pH'ını düşürür. Bir pH sensörü yardımıyla, ortamın pH'ı bulunur ve bağlı olarak yıkılan glukoz miktarını tayin edilir. Dönüştürücü ile pH değişimi voltaj değişimine de sebep olur.

3. H₂O₂ sensörü: Dönüştürücü ortamdaki H₂O₂ derişimini ölçer ve elektrik akımına dönüştürür (Shah ve Wilkins, 2003).

Bu tez çalışmasında; elektrokimyasal dönüştürücülerden biri olan potansiyometrik temele dayalı pH elektrodu kullanıldı. Potansiyometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi Şekil 2.5 'de gösterilmektedir (Murthy vd., 2010).



Şekil 2.5. Potansiyometrik biyosensör sistemi (Murthy vd., 2010)

2.5.3. Biyosensörlerde aranan özellikler

Biyosensörler sekiz parametreye göre nitelendirilirler:

Duyarlılık: Cihazın analitteki değişime birebir cevap vermesi demektir. Duyarlılık yüksekse analitteki birim değişim sensörün ekranında aynen gözükür.

Seçicilik: Cihazın sadece analite özgünlüğünü gösterir. Cihaz başka reaktiflere ilgi göstermez ve hatalı sonuç vermez.

Ölçüm aralığı: Cihazın ölçebildiği analit derişiminin aralığıdır. Analit belli bir derişimden az veya çoksa cihaz iyi bir duyarlılıkta sonuç vermeyebilir.

Ölçüm süresi: Analit derişimindeki bir basamak değişime karşı cihazın vereceği son yanıtın sadece % 63'lük kısmını ölçmek için gösterdiği ölçüm süresidir.

Tutarlılık: Cihazın sonuçlarındaki tutarlılığı ifade eder.

Tesbit sınırı: Cihazın tesbit edebileceği en düşük analit derişimidir.

Ömrü: Cihazın, performansında gözle görülür azalma olmadan verdiği hizmet ömrünü ifade eder.

Kararlılık: Belirli bir süre içinde cihazın duyarlılığındaki değişimleri dikkate alan bir kalite ölçüm değeridir.

2.5.4. Biyosensör tasarımı

Biyosensör tasarımlarında önce biyosensörün hangi analiti tanıyacağı tesbit edilmelidir. Sonrasında ise;

1. Analite uygun biyobileşenin seçimi,
2. Biyobileşenin dönüştürücüye sabitlemede kullanılacak uygun ve verimli immobilizasyon metodunun seçimi,
3. Biyobileşenin analiti tanınmasıyla oluşan kimyasal veya fiziksel sinyali anlaşılabilir sinyal formuna dönüştürecek olan dönüştürücünün seçimi ve tasarımı,
4. Ölçüm aralığının, duyarlılığın dikkate alınması olarak sıralanabilir (Gooding J.J., 2006).

2.6. Biyoaktif tabakanın hazırlanması

Analitlerin tayini için kullanılan biyoajanlar; tüm hücre (bakteri, fungus, hayvan ya da bitki), enzimler, dokular, mikroorganizmalar, hücre reseptörleri, antibadiler, nükleik asitler ya da olabilir (Sharma vd., 2003).

Genel olarak biyolojik komponent uygun bir şekilde immobilizasyonla transdüserine bağlanır. İmmobilizasyon metodu immobilize edilecek biyokomponentin yapısına göre belirlenir. Beş yaygın metot bulunmaktadır (Mehrvar vd., 2000).

1-Adsorbsiyon: Selüloz, silikajel, cam ve kollagen; enzimleri adsorplamak için kullanılan başlıca yapılardır. Hidrojen bağları, multiple tuz köprüleri, Van der Waals

bağları ve elektron transisyon kompleksleri oluşumu sayesinde bağlanma gerçekleşir. Kararlılığı az olduğundan biyosensörlerde pek tercih edilmez.

2- Mikroenkapsülasyon: Aktif bir maddenin çevresinin bir veya daha fazla kaplama maddesi olan nişasta, sakkaroz, maltoz gibi karbonhidratlar veya jelatin, peynir altı suyu proteinleri, kazein, gam arabik ile sarılıp kaplanmasını sağlayan bir teknolojidir (Koç vd.,2010).

3-Tutuklama: Biyomolekülü içeren çözelti içinde poliakrilamid, nişasta, naylon gibi polimerik yapılarla hazırlanan jel donarak biyomolekülü matriks içinde tutuklar.

4-Çapraz bağlama: Glutaraldehid, heksametilen di-izosiyanat, 1,5-difloro.-2,4-nitrobenzen gibi bifonksiyonel ve multifonksiyonel reaktiflerin kullanılmasıyla biyomoleküllerinin katı desteklere moleküler çapraz bağlanması sağlanır.

5-Kovalent bağlama: Enzimde katalitik aktivite için gerekli olmayan fonksiyonel grupların bağlanması yoluyla gerçekleştirilir. Aminoasit yan zincirlerinde bulunan amino, karboksil, imidazol, tiyol, hidroksil gibi nükleofilik fonksiyonel gruplarla kovalent bağlama yapılır (Sharma vd., 2003).

2.7. Elektrokimyasal Dedektör Olarak Biyosensörler

Uygun dedektör ve etkili bir örnek hazırlama tekniği; her bir yüksek performanslı ayırma metodu için gerekli olan kompleks örneklerin analizinde matriks etkilerinin eliminasyonunu sağlar. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ve kapiler elektroforezde (CE) biyosensörlerin uygulanması genel metodlarla analizlenemeyen diğer bileşiklerin analizlenmesine izin verir.

Kromatografik metodlar ya da kapiler elektroforezde kompleks matrikslerde tayin sıklıkla zor olmaktadır; çünkü sinyal üreten çok fazla bileşik vardır ya da bazı analitler için dedeksiyon limiti (LODs) çok düşüktür. Bu gibi durumlarda analitlerin uygun bir yöntemle türevlendirilmesine ihtiyaç duyulur. Bu tip durumlar yüksek performans ayırma metodları (HPLC, GC ve CE) ve uygun biyokimyasal reaksiyonların birlikte kullanımıyla azaltılabilir veya tamamen ortadan kaldırılabilir. Biyodedeksiyonun yüksek performans ayırma teknikleriyle birleştirilmesi ile

kromatografi ve migrasyon teknikleri için temel olan genel fizikokimyasal özelliklerden çok moleküler tanıma mekanizmalarına dayalı analit tayini yapılır.

2.7.1. Enzim Biyosensörleri

Biyosensör teknolojisinin tarihsel gelişimine bakıldığında bu alandaki ilk çalışmaların enzim sensörleriyle başladığı görülmektedir. 1962’de Clark ve Lyons ve 1967’de Updike ve Hick tarafından rapor edilen glukoz tayinine yönelik glukoz oksidaz enzim elektrodları bu konudaki ilk örnekleri oluşturmaktadır

Temel bilimlerdeki ilerlemeler enzimlerin yanısıra diğer biyolojik materyallerin fonksiyonlarının da çok daha ayrıntılı bir şekilde ortaya çıkarılmasına imkân vermiştir. Bu ilerlemelerin doğal bir sonucu olarak farklı biyolojik materyallerin ve iletim sistemlerinin birleştirilmesiyle çok çeşitli biyosensörler geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam etmektedir. Bugünkü sonuca bakıldığında hangi temel iletim sistemi söz konusu olursa olsun ki elektrokimyasal esaslı olanların tartışılmaz bir ağırlığı söz konusudur, pratik ve ticari uygulamalarda enzim elektrodlarının büyük bir üstünlüğü göze çarpmaktadır.

Bu sonuçtaki en büyük etmen canlı sistemlerle ilgili hemen hemen her türlü maddenin doğrudan veya dolaylı olarak analizinde kullanılacak binlerce enzimin varlığıdır. Bilinen enzimlerin yanısıra bilinmeyenlerin potansiyel varlığı, piyasada yüzlerce enzim preparatının bulunabilirliği ve bu sayının her geçen gün yükselmesi enzim sensörlerinin tartışılmaz üstünlüğünün devam edeceğinin bir göstergesidir (Dinçkaya E., 1999).

2.7.2. Doku biyosensörleri

1981’de ilk defa bitki dokusu temelli elektrot hazırlanmasından itibaren, birçok bitki dokusu temelli biyosensör geliştirilmiştir. Bitki doku materyalleri kullanılarak oluşturulan biyosensörler, izole enzimlerle oluşturulan biyosensörlere bir alternatiftir (Sidwell ve Rechnitz, 1986). Hayvansal ve bitkisel dokuların ve organellerin kimi enzimlerce özellikle zengin olduğu bilinmektedir. İşte bu enzimlerin izole edilmiş

preparatları yerine doğrudan yoğun buldukları bu kaynaklar biyosensör hazırlanmasında kullanılır (Telefoncu A., 1999a).

Doku biyosensörlerinde enzimin saflaştırılması gerekliliği ortadan kalkar, ayrıca doku biyosensörleri bazı enzimler için doğal ortamda artan kararlılık ve düşük maliyet gibi avantajlara sahiptirler (Macholan, 1987).

2.7.3. Mikrobiyal biyosensörler

Geniş bir pH ve sıcaklık aralığında çalışabilir olması, uzun ömürlü olması yanında ilave kofaktörlere ve pahalı saflaştırma proseslerine gerek duymaması bakımından mikroorganizmaların kantitatif tayinler amacıyla biyosensör çalışmalarında uygulanabilir olabileceği anlaşılmıştır.

Mikrobiyal biyosensörlerde iki temel faktörü baz alarak ölçüm yapmak mümkündür. Bunlar, substrat yok iken mikroorganizmaların solunum hızıyla doğru orantılı olarak başlangıçta elde edilen akımın; substrat ilavesi ile başlayıp substratın tamamen dönüşüme uğratıldığı ana kadar geçen zaman dilimindeki değişimin izlendiği son nokta ölçümü ve yine substratın tamamen dönüşümüne kadar ki solunum hızının zamanla değişiminin tespitine dayanan kinetik ölçümlerdir (Akyılmaz E., 2002).

2.8. Biyosensörün Uygulama Alanları

Kısa sürede sonuca ulaştırması ve uygulama kolaylığı biyosensörlerin en önemli avantajlarındanıdır. Uygulama alanlarını şu başlıklar altında sıralayabiliriz;

Tıp: Metabolitlerin ölçülmesi, insülin eksikliği belirtilerinin ölçülmesi, hastane koşullarının gözlenmesi, yapay pankreasın çalışma koşullarının kontrolü, vb.

Endüstri: Endüstriyel üretim izlenmesinde gereklidir. Biyoreaktörlerin kontrolü, giren hammadde ve çıkan ürünlerin ölçülmesi, vb.

Çevresel Denetim: Çevre Koruma Ajansı tarafından hava ve su düzenli olarak izlenmektedir. Ayrıca yerel idari yönetimlerin de bölgesel izleme birimleri bulunmaktadır. Bu birimler düzenli olarak hava ve suyu tahlil etmektedirler.

Savunma (askeri ve sivil): Askeri ve sivil savunma alanında kullanılmak üzere birçok sensör ve biyosensör imalatına, Irak'ta 1990 körfez krizi ve Amerika'da ki 11 Eylül 2001 saldırısı sonrasında hız verilmiştir (Gooding J.J., 2006).

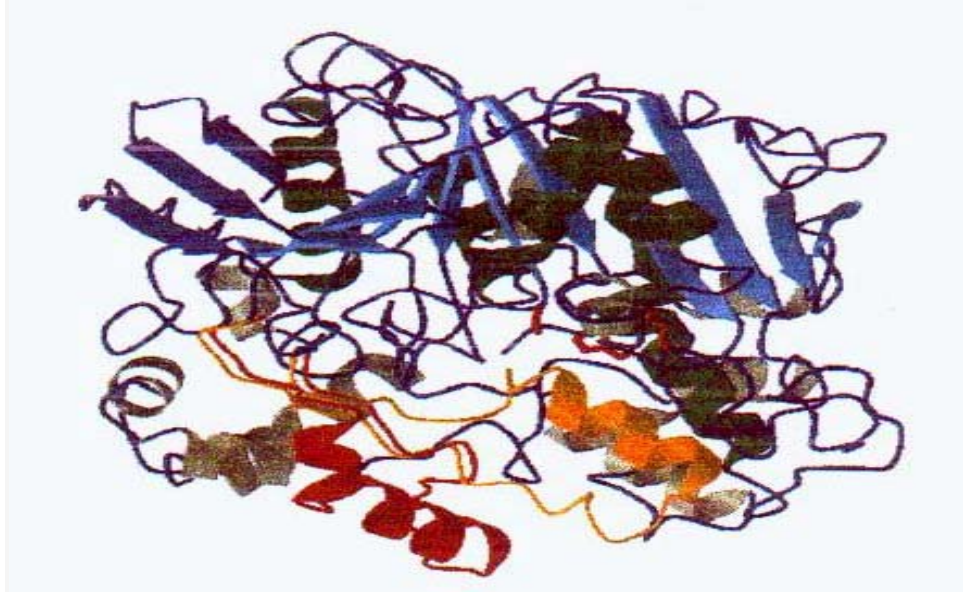
2.9. Tezde kullanılan biyobileşenlere genel bakış

Biyosensörde biyobileşen kaynağı olarak kullanılan enzim *Candida rugosa* lipazı, lipazın substratı olarak tribütirin, enzim immobilizasyonunda kullanılan jelatin ve çapraz bağlayıcı glutaraldehid hakkında bilgiler aşağıda verilmiştir.

2.9.1. *Candida rugosa* lipazı

C. rugosa lipaz enzimi bitkisel, hayvansal ya da mikrobiyal kaynaklı olabilir. Bu kaynaklar arasında en geniş uygulama alanı bulan lipazlar; mikrobiyal lipazlardır. Bunun sebebi; mikroorganizmaların kolay yetiştirilebilmeleri, üretim ve genetiklerine kolaylıkla müdahale edilebilmeleridir. *C. rugosa* lipaz enzimi lipidlerin biyolojik dönüşümünde anahtar role sahiptir. Lipazlar, lipidlerin biyolojik membranda bulunmalarından dolayı hücre içi metabolizmada da görev alırlar (Schmidt ve Verger, 1998).

Günümüzde lipazın ve özellikle *C. rugosa* lipazının biyotransformasyonlarda potansiyel uygulamaları iyi belirlenmiştir. Hem sulu ortam ve hem organik ortamda gerçekleştirilen reaksiyonlarda kataliz performansı yüksektir (Schmid ve Verger, 1998; Bornscheuer ve Kazlauskas, 1999; Drauz ve Waldmann, 2002; Faber K., 2004). *C. rugosa* yaklaşık 154 cins içeren *Candida* ailesi içindedir. *C. rugosa*'nin belirlenen üç boyutlu yapısı **Şekil 2.6'** da görülmektedir.



Şekil 2.6. *C. rugosa*'nın üç boyutlu yapısı. Açık mavi; merkezde her iki taraftan alfa heliksler ile kaplanan hidrofobik beta-düzlemini, koyu yeşil; merkez beta-düzlemini kaplayan heliksleri, sarı; kapalı konformasyonu, kırmızı; açık konformasyonu göstermektedir (Cygler ve Schrag, 1999)

Birçok lipaz üreten maya arasında; *C. rugosa* ticari lipaz kaynağı olarak en sık kullanılan mayadır (Vakhlu J., 2006). Bu kullanımının nedeni hem hidroliz hem sentez gibi çeşitli proseslerdeki yüksek aktivitesinden dolayıdır (Redondo vd., 1995).

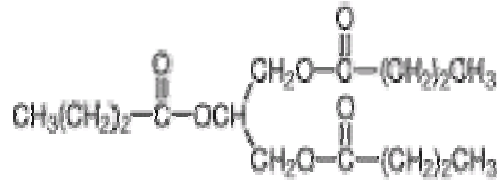
Non-spesifik lipaz enzimleri, özellikle yüksek spesifik aktivitesiyle *C. rugosa* gliserinin hızlı hidrolizini sağlamak üzere seçilmiş olup hidroliz, alkoliz, esterleşme ve triaçilgliseridlerin ve diğer hidrofobik esterlerin transesterifikasyonu katalizleyen çok yönlü bir biyokatalizördür (Pandey vd., 1999).

2.9.2. Lipaz substratı tribütirin

Lipaz cinsine bağlı olarak spesifik substratları değişmektedir. *Candida rugosa* lipazı spesifitesi keskin olmadığından triolein, tribütirin gibi substratları benzer şekilde hidrolizini katalizler. Bu tez çalışmasında, tribütirinin substrat olarak kullanıldığı deneylerde diğerlerine göre daha yüksek aktivite ile hidrolizi katalizlendiği için substrat

olarak seçildi. Tribütirin bütirik asit ve gliserolden oluşan bir triesterdir. Pankreatik lipaz, *Candida rugosa* gibi olası diğer lipazlar tarafından hidrolizlendiğinde bütirik asitler ve gliserin serbest hale geçer. Tribütirin, süt ve süt ürünlerinin özellikle tereyağı gibi çeşitli gıda maddelerinin ana bileşenidir. Genellikle tereyağındaki özel tadı veren sıvı yağ olarak tarif edilebilir, adı da tereyağından (butter oil) gelir. Margarin yapımında da katkı maddesi olarak kullanılır. Karaciğer hasarı ve bazı kritik hastalıklara bütirat mekanizmasının nasıl bir etkisi olduğu henüz tam olarak aydınlatılmadığı belirtilmiştir (Miyoshi vd. 2011).

Ayrıca tribütirin; literatürlerde yaygınlıkla mikrobiyoloji laboratuvarında *Moraxella catarrhalis* bakterisini tanımlamada kullanılmaktadır (Pérez vd., 1990). **Şekil 2.7**'de yapısı verilmiştir.

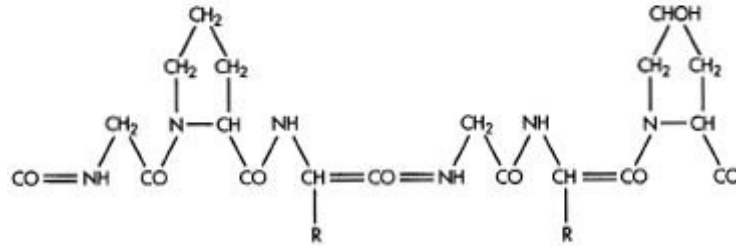


Şekil 2.7. Tribütirin yapısı

2.9.3. Jelatin

Jelatin, sığır, koyun ve domuz gibi hayvanların deri, kemik ve tendonlarındaki kolajenin hidrolizi ile elde edilen düşük maliyetli bir üründür (Ribéreau-Gayon vd., 2000). Kollajen ile biyolojik özellikleri benzer olan jelatin çeşitli biyomedikal uygulamalarda, enzim immobilizasyonunda ve biyosensörlerde çok kullanılır (Meyer ve Morgenstern, 2003).

Jelatin yapısında; yüksek oranda glisin, prolin ve hidroksiprolin aminoasitlerini içerir. Bu aminoasitler jelatinin üçlü heliks bir yapı oluşturmasında ve jelleşme özelliği kazanmasında oldukça etkilidir (Rose vd., 1987). **Şekil 2.8**'de jelatinin yapı formülü görülmektedir.



Şekil 2.8. Jelatinin yapı formülü

Jelatinin, ucuz ve kolay bulunur olması yanında, jel oluşumu için herhangi bir moleküle, iyon, tuza ya da pH ayarlanmasına gerek duymaması immobilizasyonda sık kullanılan bazı polisakkaritlere göre üstünlükleridir. Bu sebeplerle jelatin enzim, hücre ve doku immobilizasyonunda sıklıkla tercih edilir.

Jelatin biyomedikal alanın yanı sıra ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılır; sert ve yumuşak kapsül, mikroküreler, vasküler protezler için sızdırmazlık ürünleri, cerrahi kullanım için yara ve emici ped en sık uygulamaları arasındadır (Rose vd., 1987; Hastings ve Ducheyne, 1984; Digenis vd., 1994; Otani vd., 1998)

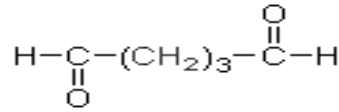
Jelatin sulu çözeltide çözünür olduğundan jelatin materyalleri uzun vadeli biyomedikal uygulamalar için biyopolimerin termal ve mekanik kararlılığını arttırdığı için çapraz bağlamaya maruz bırakılır. Termal ve mekanik kararlılığının artırılması amacıyla immobilizasyonda çoğunlukla çapraz bağlayıcı ajan olan glutaraldehid ile birlikte kullanılır (Scardi V., 1987; Esposito vd., 1995).

2.9.4. Glutaraldehid

Glutaraldehid, özellikle enzimlerin kovalent immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan bifonksiyonel bir reaktiftir. Biyosensör geliştirilmesinde kullanılan enzim, hücre doku vb. biyoaktif materyallerin, jelatin, kollajen, kitosan gibi biyolojik moleküllerle birlikte glutaraldehid ile çapraz bağlar oluşturması esasına dayalı immobilizasyon yöntemi oldukça yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Guilbault ve Kauffmann, 1987).

Jelatin sulu çözeltide çözünür olduğundan, jelatin uzun vadeli biyomedikal uygulamalar için biyopolimerin termal ve mekanik stabilitesini arttıran çapraz bağlamaya maruz bırakılmalıdır. Kimyasal çapraz bağlayıcı ajanlar arasında glutaraldehid kollajenöz malzemelerin stabilitesinin yüksek verimliliği nedeniyle açık farkla en yaygın kullanılanıdır.

Glutaraldehid kolay hazırlanan, ucuz ve nispeten kısa bir sürede sulu çözeltileri etkili bir şekilde kollajenöz dokuları çapraz bağlayabilir (Khor E., 1997). Kollajenöz örneklerinin glutaraldehid ile çapraz bağlanması; lizin veya hidroksilizin polipeptid zinciri aminoasit artıklarının serbest amino gruplarının, glutaraldehidin aldehit grupları ile reaksiyonlarını içerir (Olde Damink vd., 1995). Yöntem kolay uygulanabilir olması yanında immobilize sistemin termal ve operasyonel aynı zamanda da depo kararlılığını arttırması bakımından tercih edilmektedir. **Şekil 2.9**'da glutaraldehidin formülü verilmiştir.



Şekil 2.9. Glutaraldehid formülü

Glutaraldehid mikroorganizmalar için kısmen toksik etki göstermesine rağmen biyoaktif sisteme kazandırdığı avantajlardan dolayı, % 1'in altındaki konsantrasyonlarda glutaraldehid kullanılarak toksik etkisi en aza indirilip hücre immobilizasyonları da gerçekleştirilmektedir (Hemachander vd., 2001).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyaller

3.1.1. Kimyasallar

Denemelerde substrat olarak kullanılan trigliseridlerden triasetin, triolein Sigma-Aldrich Chemical Co. (USA)'den ve tristearin, tribütirin, trikaprilin ve çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan glutaraldehid (% 25 v/v) Merck (Almanya) firmasından temin edildi.

Enzim olarak kullanılan *Candida rugosa* lipazı, Domuz pankreatik lipazı ve biyoaktif tabakanın elektroda immobilizasyonu için kullanılan jelatin Sigma-Aldrich Chemical Co. (ABD)'den satın alındı.

Tamponların ve diğer çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan tüm kimyasallar Merck (Almanya) firmasından alındı.

3.1.2. Cihazlar

Aktivite ölçümleri için WTW 330i pH metre ve bu pH metreye ait cam pH elektrodu biyosensörün hazırlanmasında kullanıldı.

Tampon çözeltileri hazırlamak için de aynı pH metreden yararlanıldı. Eppendorf otomatik pipetler, hassas çözelti hacimlerinin hazırlanmasında kullanıldı.

Düzenli karışımlar IKA RH Basic 2 manyetik karıştırıcıyla ve hassas tartımlar da Precisa marka analitik teraziyle yapıldı.

Biyoaktif tabaka materyalinin hazırlanması için ve biyosensörün çalışmaları süresince, su ceketli reaksiyon hücresinin istenilen sıcaklıkta tutulabilmesi için sabit sıcaklığa ayarlanabilen Nüve BM 302 model sirkülasyonlu bir su banyosu kullanıldı.

3.2. Metodlar

3.2.1. pH'ın ölçüm metodu

Elektrik sinyali üreten bir araç (elektrot) kullanılarak, pH metre cihazı sayesinde bu elektriksel sinyali, pH birimine çeviren potansiyometrik bir ölçümdür. Üretilen ve ölçülen sinyal bir voltajdır. pH ölçümünü yapabilmek için iki gerilime ihtiyaç vardır, pH ölçümü için gerekli olan elektriksel sinyal bu iki gerilim arasındaki fark ile oluşur. Bu iki gerilim şunlardır:

1. Algılama elektrodu ürün içindeki hidrojen iyon aktivitesinin logaritmasına oransal bir gerilim sağlar.
2. Referans elektrod ideal olarak ürünün aktivitesinden bağımsız sabit ve sürekli bir gerilim sağlar.

Referans ve algılama elektrodu arasındaki bu gerilim farkı pH metre tarafından ölçülür ve pH değerine çevrilir. pH ölçümü üç parçadan oluşur. Bunlar; pH ölçüm elektrodu, referans elektrodu ve verilerin alındığı bir cihazdır. Bu cihaz elektrodla pH 'ı ölçülen çözeltinin pH'ına göre potansiyel farkı oluşturan bir pil gibi düşünülebilir. pH ölçüm elektrodu hidrojen iyonuna hassas bir cam haznedir. Haznenin içinde ve dışındaki bağıl hidrojen derişimi değişimine göre farklı milivolt çıktısı verir.

Referans elektrodu çıktısı hidrojen iyonu aktivitesi ile değişmez. pH elektrodunun iç direnci çok yüksektir. pH değişimine göre ortaya çıkan potansiyel fark değişimini voltaj olarak ölçmede zorluk çıkarır. pH metre temel olarak yüksek öz dirence sahip bir yükseltici olup anlık elektrod voltajlarını ölçüp sonuçları analog veya dijital bir göstergede pH birimi cinsinden gösterir. Bazı hallerde, özel kullanım alanları veya iyon-seçici ya da yükseltgeme-indirgeme potansiyeli elektrodlar için voltaj da okunabilir (ph metre.com.tr).

3.2.2. pH elektrodunun ve biyosensörün hazırlanması

Kullanım için seçilen pH elektrodu temizlendi. Elektrodun küresel yapılı cam ucunda enzimin immobilize edilebilmesi ve reaksiyon sırasında yerinde sağlam kalabilmesi için elektrod ucu hazırlandı. Bunun için; cama zarar vermeyen, kullanılan reaksiyon materyallerinden etkilenmeyen bir malzeme olan ependorf mikro pipet uçları uygun ölçülerde kesildi, elektrodun cam ucuna dikkatle geçirilerek yerleştirildi. Böylece biyobileşenlerin elektrot ucunda yerleştirilebileceği bir boşluk elde edildi. Elektrodun bu durumu **Şekil 3.1**'de görülmektedir.



Şekil 3.1. Hazırlanan mikropipet ucu takılı elektrot

Biyosensörün hazırlanması için; seçilen lipaz enzimi (9 mg) ve jelatin (200 mg) tartılarak bir flakonun içine alındı ve 150 μ L fosfat tamponu (pH: 7.5; 50 mM) ilave edilerek çalkalandı ve bu karışım 35 °C'deki su banyosunda 10 dk jelatin çözününceye kadar bekletildi. Su banyosunda akışkan hale gelen enzim-jelatin karışımının 100 μ L'si elektrot ucunda oluşturulan silindirik boşluğa düzgün şekilde mikro pipetler vasıtasıyla hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi. Elektrot bu halde +4 °C'deki buzdolabında 30 dk jelatinin katılaşması için bekletildi. Bu sürede katılaştıran tabakanın pH:7.5, 50 mM fosfat tamponunda hazırlanan % 2.5'lik (v/v) glutaraldehid çözeltisi içine daldırılıp içinde 5 dk bekletilerek glutaraldehitle çapraz bağlanması gerçekleştirildi. Sonra biyosensör distile su ile pek çok kez yıkanarak kullanıma hazırlandı. Kullanılmadığında buzdolabında nemli olarak muhafaza edildi.

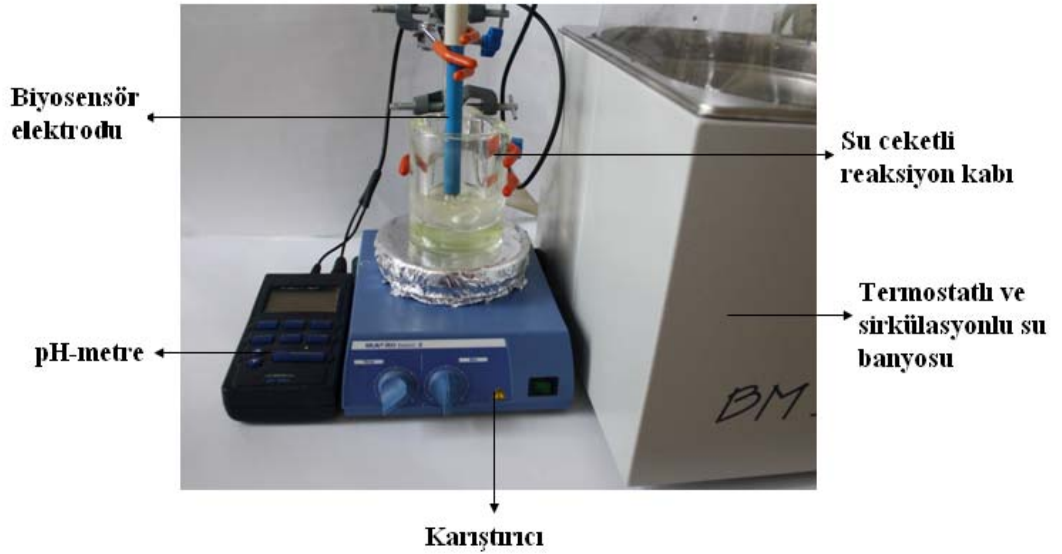
3.2.3. pH biyosensörünün ölçüm ilkesi

Hazırlanan biyosensör, pH metre cihazına bağlanır. Belirlenen çalışma koşullarında, tampon çözelti bulunduran reaksiyon kabına yerleştirilir. Sabitlenen pH kaydedilir. Belirlenen substrat ilavesinin ardından, biyoaktif tabakadaki enzimin katalizörlüğünde enzimatik hidroliz reaksiyonu başlar. Bu sırada reaksiyon kabında aşağıdaki reaksiyon gerçekleşirken açığa çıkan yağ asidi derişimine bağlı olarak meydana gelen ortam pH'ındaki düşme pH biyosensöründen algılanır.



Dolayısıyla biyosensörün ölçüm ilkesi; reaksiyon ortamındaki hidrojen derişiminin artışına bağlı olarak enzimin aktivite ölçümü esasına dayanır. Biyosensörün aktivite birimi: Hazırlanan biyosensöre immobilize edilen enzimin mg başına, sabit zaman aralığında substratın hidrolizi ile açığa çıkan yağ asidinin oluşturduğu pH düşmesi (ΔpH) miktarı olarak tanımlandı. Biyosensörün bağıl aktivitesi: Maksimum ΔpH değişimi % 100 alınıp diğer pH farkları buna göre hesaplanarak bulundu.

Hazırlanan biyosensör ile ölçüm çalışmalarının yapıldığı düzeneğin fotoğrafı Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Kullanılan pH esaslı biyosensör düzeneği

Su ceketli reaksiyon hücresine 10 ml gum arabik (%10 luk), 0.5 ml substrat eklendi. Sürekli karışması sağlanarak substrattan gelebilecek serbest asitlerin meydana getirdiği pH düşmesini nötralleştirinceye kadar 0.01 N NaOH çözeltisinden eklendi. Üzerine hücredeki toplam hacmi 20 ml'ye tamamlamak için 4 ml Tris- HCl tamponu (pH:7.5, 200 mM) konuldu.

Manyetik karıştırıcı ile sabit bir hızda karışan reaksiyon hücresine hazırlanan biyosensör daldırıldı. Ölçümü almak için; daldırıldığı andan itibaren çalışma tamponu ve elektrot arasındaki difüzyondan dolayı hidrojen derişiminin dengelenmesi beklendi (yaklaşık 2dk). Okunan pH değeri kaydedildi. Biyosensörün biyoaktif tabakasındaki enzim ile ortamdaki substrat arasındaki enzimatik reaksiyon ön çalışmalarda belirlendiği gibi 30 dakikada denge durumuna ulaşıldı. Bu durumda ortam pH'ındaki düşüş kaydedildi. Enzimatik reaksiyonun başlangıcında ve sonundaki denge durumları arasındaki azalan pH değerleri farkı kaydedildi. Substratın farklı derişimlerinde benzer şekilde ölçülen pH farkı değerleri belirlendi.

3.2.4. pH biyosensörü için uygun enzimin seçilmesi

Biyosensörde biyobileşen olarak kullanılacak olan enzimi belirlemek amacıyla; literatür bilgileri değerlendirilerek domuz pankreatik lipazı ve *C. rugosa* lipaz enzimleri kullanıldı. Triaçilgliserol hidrolaz aktiviteleri titrasyon yöntemi ile karşılaştırıldı. Titrasyon yönteminde, substrat emülsiyonu için; 30 ml %10 luk Gum arabik ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Santrifüjlenerek berrak çözelti elde edildi. Bunun üzerine kullanılacak substrattan 3.5 ml, ve saf sudan dondurulmuş 2.5 gr buz eklendi. 15 dakika 30 °C'nin altında karıştırıcıyla homojenize edildi. Substrat karışımındaki olabilecek asiditeyi gidermek için 0.1 N NaOH ile pH:7'e nötrlendi. Bu substrat karışımının 10 ml'si, 6 ml Tris-HCl tamponu eklendi ortam pH'ı tekrar 37 °C'de 0.01 N NaOH ile 7.7'e ayarlandı. Sonra aktivite tayini için 1 ml (0.1 mg/ml) lipaz çözeltisi ortama eklendi. 30 dakika boyunca azalan pH 0.01N NaOH ile titre edilerek 7.7'de sabit tutuldu. Harcanan NaOH hacmi kullanılarak enzimlerin hacimsel ve spesifik aktiviteleri hesaplandı. Sonuçlar değerlendirilerek *C. rugosa* lipazının biyosensörde biyobileşen olarak kullanılmasına karar verildi.

3.2.5. Substrat spesifitesi

pH biyosensörü geliştirilmesinde optimizasyon çalışmalarına geçmeden önce standart grafiği elde etmek için en uygun substratın seçimi yapıldı. Bunun için aynı derişimde (82.5 mM) triasetin, trikaprilin, triolein, tristearin, tribütirin gibi lipaz substratları ortama eklenerek, hazırlanan biyosensör ile reaksiyon ortamındaki pH değişimleri ölçüldü. Sonuçlar karşılaştırıldığında en iyi biyosensör cevabı tribütirin ile elde edildiğinden bundan sonraki çalışmalarda standart substrat olarak tribütirin kullanıldı.

3.2.6. pH biyosensörünün çalışma koşullarının optimizasyonu

Biyosensörün çalışma koşullarını optimize ederek en iyi biyosensör cevabını verdiği koşulların bulunması için ortam tampon pH'ı, tampon derişimi ve ortam sıcaklığının biyosensör cevabına etkileri incelendi. Her bir değişkene ait % biyosensör cevapları grafiklerle gösterildi.

3.2.6.1. pH optimizasyonu

pH: 6.0, 6.5, 7.0 olan 50 mM Fosfat tamponları ve pH: 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 olan 50 mM Tris-HCl tamponları hazırlandı. Bu tamponlar kullanılarak daha önce belirlenen enzim ve substrat miktarları ile reaksiyonlar gerçekleştirildi. En iyi biyosensör cevabının hangi pH değeri ile alındığı grafik vasıtasıyla belirlendi.

3.2.6.2. Uygun tampon derişimi

Geliştirilen biyosensörün optimum pH değeri ve bu pH değerindeki uygun tampon sisteminin belirlenmesinden sonra tampon derişimlerinin biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla, hazırlanan biyosensörler için Tris-HCl tamponunun (pH: 7.5) 25, 50, 75, 150, 200, 250 mM derişimlerinde ölçümler gerçekleştirildi ve bağıl aktiviteye karşı grafiklendirildi.

3.2.6.3. Optimum sıcaklık

Optimum sıcaklığın belirlenmesi için diğer optimum değerler kullanılarak 25, 30, 35, 40, 45, 50 °C sıcaklıklarda ölçümler gerçekleştirilerek geliştirilen biyosensör için biyosensör cevapları belirlendi ve bağıl aktiviteye karşı grafiği elde edildi.

3.2.7. Biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonu

Enzim esaslı biyosensör ile optimum biyosensör cevabının alınacağı en uygun immobilizasyon koşullarının belirlenmesi için biyoaktif tabakayı oluşturan enzim miktarının, jelatin miktarının ve çapraz bağlayıcı ajan olan glutaraldehidin biyosensör cevabı üzerine etkileri araştırıldı.

Hazırlanan biyosensörler ile yapılan ölçümlerle elde edilen standart grafiklerden yararlanarak enzim miktarının, jelatin miktarının ve glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine ne gibi etkileri olduğu incelendi.

3.2.7.1. Enzim miktarının etkisi

Biyoaktif tabakadaki enzim miktarının optimizasyonu için jelatin miktarı ve glutaraldehid oranı sabit tutularak enzimin farklı miktarlarının biyosensör cevabı üzerine etkisi incelendi. Bunun için 150 µl fosfat tamponu (50 mM; pH: 7.5) için 20mg jelatin, % 2.5'lik glutaraldehid sabit olmak şartıyla 6, 8, 9, 12, 15, 18 mg olarak değişen enzim içeren biyosensörler hazırlandı. Reaksiyonlar gerçekleştirilerek biyosensör cevapları kaydedildi.

3.2.7.2. Jelatin miktarının etkisi

Geliştirilen biyosensör için en uygun enzim miktarı 9 mg olarak belirlendikten sonra, yine glutaraldehid oranı sabit tutularak jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi incelendi. Bunun için 9 mg enzim, % 2.5'lik glutaraldehit sabit tutularak 5, 7.5, 10, 20, 30 mg jelatin içeren biyosensörler hazırlandı. Her biyosensör ile belirlenen koşullarda reaksiyonlar gerçekleştirildi ve sonuçlar kaydedildi.

3.2.7.3. Glutaraldehid yüzdesinin etkisi

Biyosensör için en uygun enzim ve jelatin miktarı belirlendikten sonra kullanılan glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla 150 µl fosfat tamponu (50 mM; pH: 7.5) için belirlenen optimum enzim (9 mg) ve jelatin miktarı (20 mg) sabit tutularak sadece glutaraldehid yüzdeleri 1, 2.5, 3, 3.5, 4 oranında değiştirilerek her biriyle yeni biyosensörler hazırlandı. Bu biyosensörlerle trigliserid hidroliz reaksiyonları gerçekleştirildi. Elde edilen veriler grafiklendirildi.

3.2.8. Biyosensörün karakterizasyon çalışmaları

3.2.8.1. Doğrusal ölçüm aralığının belirlenmesi

Geliştirilen biyosensörün çalışma koşulları ve biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonlarından sonra belirlenen optimum koşullarda bir biyosensör hazırlandı. Tribütirinin farklı derişimleri için ölçümler alınarak belirlenen biyosensör cevapları ile standart grafik elde edildi. Bu grafikte doğrusal bir artışın gözleendiği substrat derişimi aralığı, belirlenmiş koşullarda biyosensörün doğru ölçüm aralığı olarak belirlendi.

Buraya kadar yapılan çalışmalar ile bulunan optimum değerler; enzim 9 mg, jelatin 20 mg (150 µl 50 mM pH: 7.5 fosfat tamponu içinde), % 2.5'lik glutaraldehid olarak belirlenmiştir. Bu miktarlarla biyoaktif tabakası hazırlanan biyosensörün optimum tampon derişimi 200 mM, pH'ı 7.5 olan Tris-HCl tamponu ve optimum sıcaklığı 35 °C olarak bulunmuştur. Bu değerler kullanılarak aşağıdaki karakterizasyon çalışmaları yapıldı.

3.2.8.2. Analizlerin tekrarlanabilirliği

Geliştirilen biyosensörle yapılan analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği denemelerinde, belirlenen optimum koşullarda, tribütirinin 82.5 mM derişiminde hazırlanan biyosensör ile ara vermeksizin yeni ölçümler alındı. Bulunan değerlerin standart sapma ve varyasyon katsayıları hesaplanarak biyosensörün tekrar kullanılabilirliği incelendi.

3.2.8.3. İşlem kararlılığı

Belirlenen optimum koşullarda hazırlanan biyosensör ile tribütirinin 82.5 mM derişimi için arka arkaya ölçümler alınarak işlem kararlılığı incelendi. Başlangıçta elde edilen biyosensör cevabı % 100 kabul edilerek tekrarlanan ölçümler ile bağıl aktivitedeki değişim incelendi ve hazırlanan biyosensörün işlem kararlılığı belirlendi.

3.2.8.4. Depo kararlılığı

Geliştirilen enzim esaslı biyosensör ile aktivitesini kaybetmeden ne kadar süre boyunca ölçüm alabileceğini belirlemek için optimum koşullarda bir biyosensör hazırlandı. Bu biyosensör ile değişik saatler boyunca tribütirinin 82.5 mM derişimi için ölçümler alındı. Ölçüm aralarında biyosensör Tris-HCl tamponunun buharında +4 °C’de buzdolabında bekletildi. Ölçüm alınacağı zaman buzdolabından çıkarılıp 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Biyosensör ile ilk alınan ölçümün aktivitesi % 100 olarak kabul edilerek, devam eden zamanlardaki ölçümlerin biyosensör cevapları ilk ölçüme göre % bağıl aktivite cinsinden ifade edildi.

3.2.9. Geliştirilen biyosensörün lipid tayinlerinde uygulanabilirlik testleri

Kandaki trigliseridlerin tayini

Edirne Tıp Fakültesi Hastanesi, Merkez Biyokimya Laboratuvarı’ndan trigliserid içeriği belirlenmiş (düşük–normal–yüksek trigliserid olacak şekilde) üç farklı hastanın kan serumu örnekleri, geliştirilen pH biyosensörü kullanılarak trigliserid içerikleri ölçüldü. Örneklerin standart substratın doğrusal ölçüm aralığına girecek şekilde trigliserid derişimleri ayarlandı. Sonra örnekler substrat gibi kullanılarak optimize koşullar altında ölçümler yapılarak, sonuçlar kaydedildi.

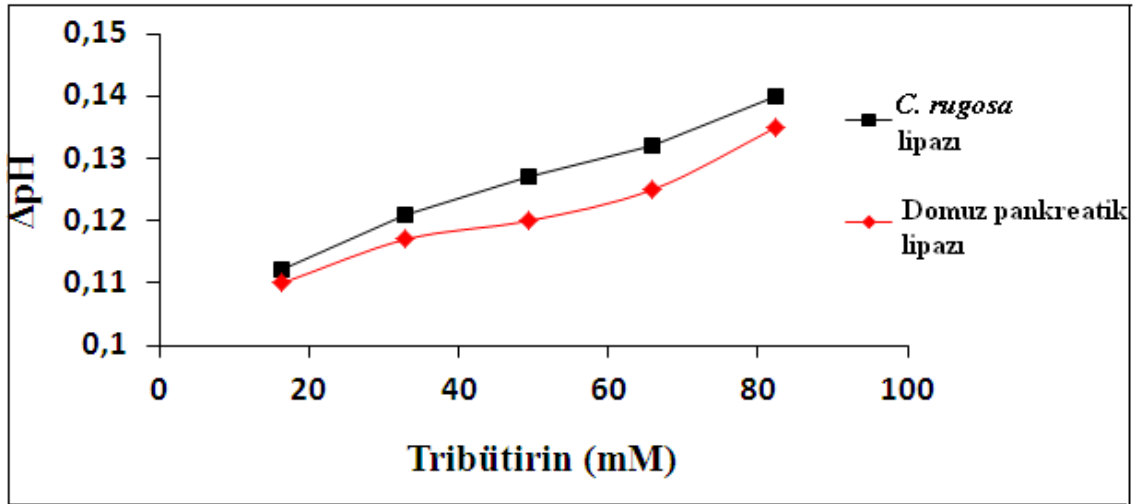
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Uygun Enzimin Seçilmesi

Trigliseridlerin tayini için denenen enzimlerden; domuz pankreatik lipazı ve *C.rugosa* lipazı, titrasyon yöntemi ile tribütirin substratına karşı elde edilen üç tekrarlı aktiviteleri **Tablo 4.1**'de verilmiştir. **Şekil 4.1**'de ise bu iki enzimin tribütirinin farklı derişimlerine karşı Δ pH değerleri görülmektedir.

Tablo 4.1. Titrasyon yöntemiyle enzim aktiviteleri

Lipazı cinsi	Titrasyon yöntemi	
	Hacimsel aktivite ($\mu\text{mol}/\text{ml}_{\text{enzim}}\cdot\text{dk}$)	Spesifik aktivite ($\mu\text{mol}/\text{mg}_{\text{enzim}}\cdot\text{dk}$)
Domuz pankreatik lipazı	2,05	10,25
<i>Candida rugosa</i> lipazı	2,36	11,8



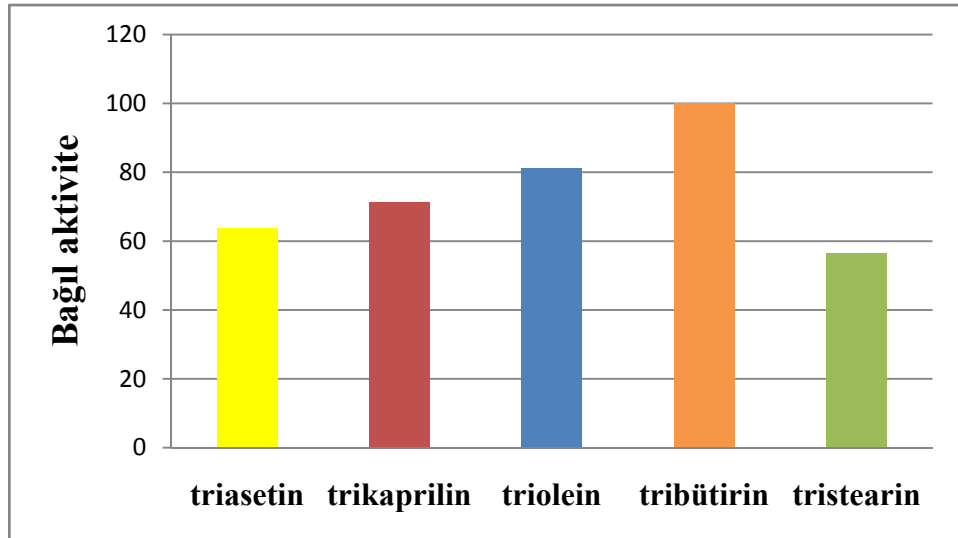
Şekil 4.1. Enzim cinsinin biyosensör cevaplarına etkisi

Görüldüğü gibi titrasyon yöntemiyle *C. rugosa* lipazına ait aktivite domuz pankreatik lipaza göre daha yüksektir. Biyosensör cevapları sonucunda ise grafikten

anlaşılabileceği gibi *C.rugosa* lipazı için alınan değerlerde daha doğrusal bir grafik elde edilmiştir.

4.2. pH biyosensörünün substrat spesifitesi

pH biyosensöründe kullanılacak standart trigliserid substratın seçimi için; 82.5 mM derişimdeki triasetin, trikapriline, triolein, tribütirin ve tristearin trigliseridleriyle pH değişimi ölçümleri alındı. Bunun için hazırlanan pH biyosensörü 35 °C’de, Tris-HCl tamponunda (200 mM; pH: 7.5) azalan pH ölçümleri yapıldı. **Şekil 4.2**’de biyosensörün değişen substratlara karşı spesifitesi bağlı aktivite cinsinden verildi. Görüldüğü gibi en yüksek biyosensör cevabı % 100 olarak kabul edildi. En düşük bağlı aktivite tristearinin, en yüksek ise tribütirinin bulundu. *Candida rugosa* lipazı substrat spesifikliği keskin olmadığından diğer substratlara değişen oranda aktivite göstermiştir. Sonuç olarak tribütirin trigliserid standart substratı olarak belirlenmiştir.



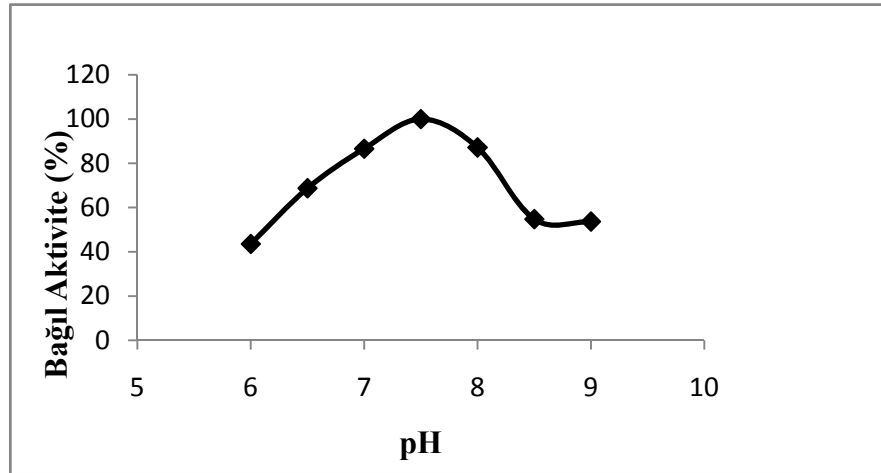
Şekil 4.2. pH biyosensörünün bağlı substrat spesifitesi

4.3. pH Biyosensörünün Çalışma Koşullarının Optimizasyonuna İlişkin Bulguları

4.3.1. Optimum pH

Belirlenen şartlarda hazırlanan pH biyosensörüyle optimum pH'ı belirlemek için 50 mM fosfat tamponunun 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 ve Tris-HCl tamponunun 8.5, 9.0 pH'ında ölçümler alındı.

Optimum biyosensör cevabı pH: 7.5 (Tris-HCl tamponu 50 mM) olarak belirlendi. pH: 7.5'deki biyosensör cevabı % 100 olarak kabul edildi. pH:7.5 ile karşılaştırıldığında pH: 7 ve pH: 8'deki pH değişim oranı sırasıyla % 86.6 ve % 87.15 olarak belirlendi. Daha düşük ve daha yüksek pH'larda ise daha düşük biyosensör cevapları alındı. Bundan sonraki denemelerde pH: 7.5 Tris-HCl tamponu (50 mM) kullanıldı. Biyosensör cevabı üzerine pH'ın etkisi **Şekil 4.3'** te görülmektedir.

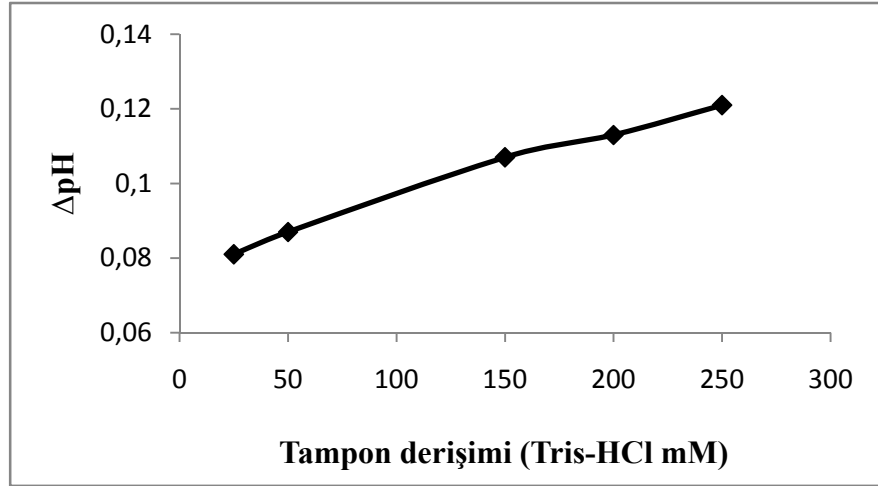


Şekil 4.3. Biyosensör cevabı üzerine pH'ın etkisi

4.3.2. Optimum tampon derişimi

pH optimizasyonu çalışmalarından uygun tampon cinsi ve pH'ı Tris-HCl tamponu 7.5 olduğu belirlendikten sonra bu tampon sisteminin hangi derişimleri ile çalışıldığında en iyi biyosensör cevaplarının belirlenmesine yönelik çalışmalara geçildi.

Bu amaç doğrultusunda 25, 50, 75, 150, 200, 250 mM pH: 7.5 Tris-HCl tamponları hazırlandı. Hazırlanan derişimlerdeki tamponların subsrat derişimlerine karşı biyosensör cevapları **Şekil 4.4** 'te gösterildi.



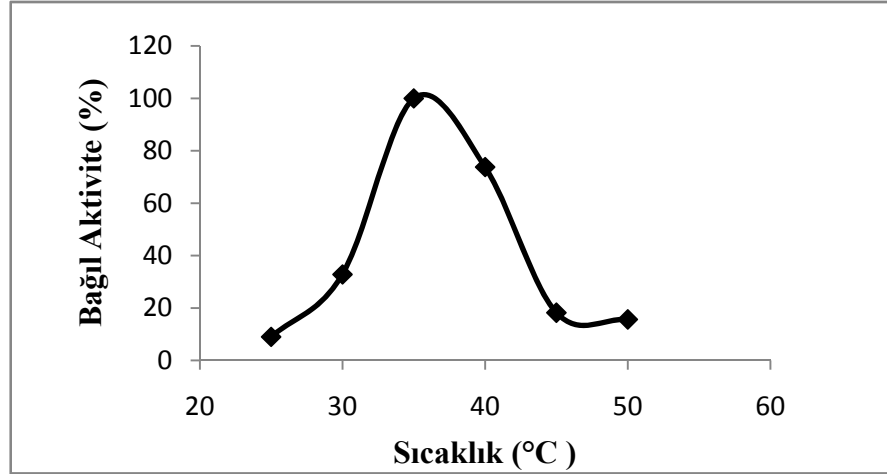
Şekil 4.4. Biyosensör cevabı üzerine tampon derişiminin etkisi

Optimum tampon derişimi **Şekil 4.4**'ten de görüleceği gibi ilk ölçümü doğrusal biyosensör cevabı veren 200 mM pH: 7.5 Tris-HCl tamponu olarak belirlendi ve bundan sonraki çalışmalarda çalışma tamponu olarak 200 mM pH: 7.5 Tris-HCl tamponu kullanıldı.

4.3.3. Optimum sıcaklık

Şekil 4.5 'te biyosensör cevabı üzerine sıcaklığın etkisi gösterilmektedir. En iyi biyosensör cevabı 35 °C ölçüldü ve grafikte biyosensör cevabı %100 olarak kabul edilerek diğer sıcaklıklar içinde biyosensör cevapları % bağıl aktivite cinsinden verildi.

Ölçümler 150 µl 50 mM pH: 7.5 fosfat tamponu içinde 9 mg enzim, 20 mg jelatin olacak şekilde ve % 2.5'lik glutaraldehid ile hazırlanmış biyosensörle tribütirinin 82.5 mM derişimi için gerçekleştirildi.



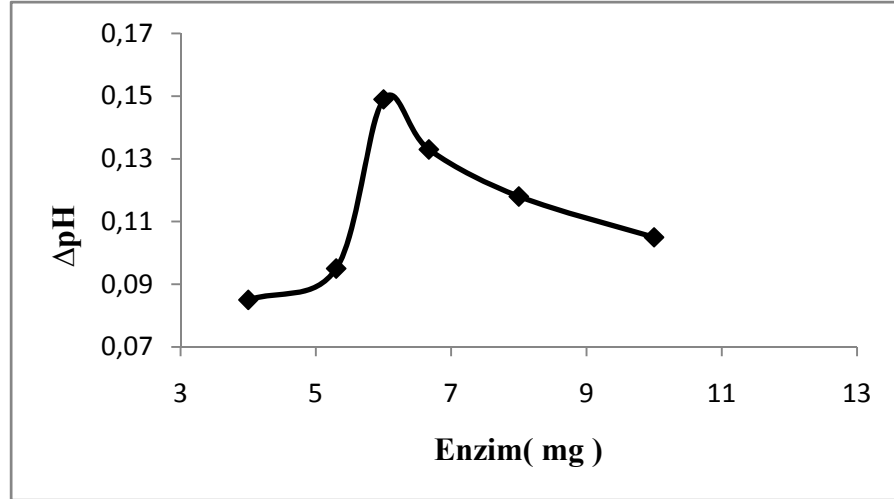
Şekil 4.5. Biyosensör cevabı üzerine sıcaklığın etkisi

Şekil 4.5'te de görüldüğü gibi sıcaklığın 35 °C'ye artmasıyla biyosensör cevabının da arttığı ve bu dereceden sonra düştüğü gözlemlendi. Bu, sonuç olarak enzim aktivitesi ve sıcaklık ilişkisinin önemli bir prensibidir. Sıcaklık artışına paralel olarak aktivite artışı gözlemlendi. Optimum sıcaklığın aşılmasıyla birlikte enzim aktivitesinde düşüş gözlemlendi.

4.4. Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyonu

4.4.1. Enzim miktarının etkisi

Enzim miktarı optimizasyonu için 150 µl 50 mM; pH: 7.5 fosfat tamponu içinde 6, 8, 9, 12, 15, 18 mg enzim içeren biyosensörler hazırlandı. Ölçümler belirlenen optimum pH, optimum sıcaklık ve optimum tampon derişiminde gerçekleştirildi. Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi **Şekil 4.6'**da gösterilmektedir.

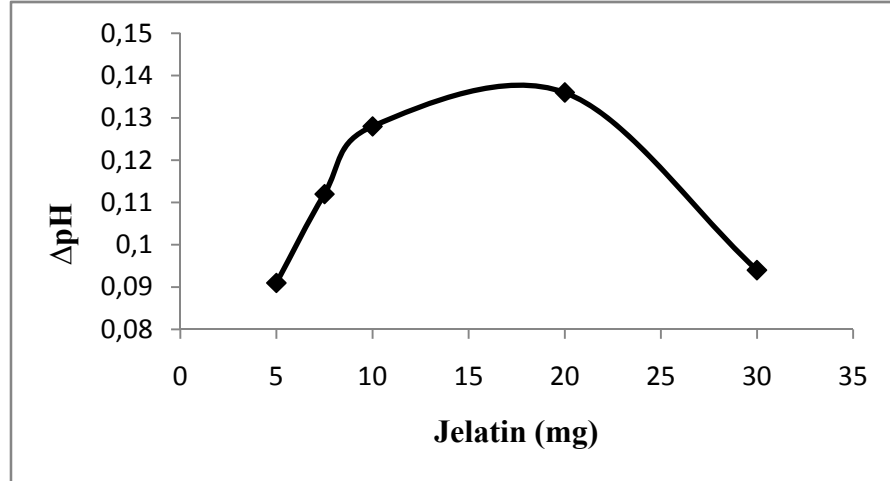


Şekil 4.6. Biyosensör cevabı üzerine enzim miktarının etkisi

Enzim miktarının optimizasyonu için alınan ölçümlerde 8 ve 10 mg enzim ile hazırlanan biyosensörde difüzyon engelinden dolayı düşük biyosensör cevapları elde edildi. 4 ve 6 mg enzim ile hazırlanan biyosensörlerde ise başlangıçta yakın cevaplar alındı ama substrat derişimi arttıkça 8 mg enzim içeren biyosensör substrata doyduğundan sabit değerler vermeye başladı. 9 mg enzim içeren biyosensörle ise substrat derişimi artışıyla doğru orantılı bir grafik elde edildi. En iyi biyosensör cevabını veren 9 mg enzim optimum enzim miktarı olarak belirlendi.

4.4.2. Jelatin miktarının etkisi

Jelatin miktarının optimizasyonu için 150 µl 50 mM; pH: 7,5 fosfat tamponu içinde optimum enzim miktarı olarak belirlenen 9 mg enzim ve 5, 7.5, 10, 20, 30 mg jelatin içeren biyosensörler % 2.5'lik glutaraldehid çözeltisi kullanılarak hazırlandı. Ölçümler belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirildi ve elde edilen sonuçlar **Şekil 4.7**'de grafik olarak verildi.



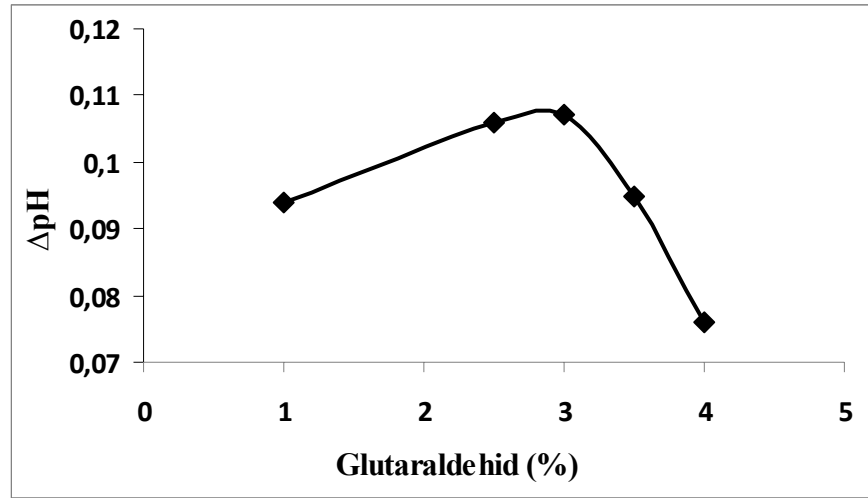
Şekil 4.7. Biyosensör cevabı üzerine jelatin miktarının etkisi

Jelatin miktarının optimizasyonunda 10 mg jelatin ile hazırlanan biyosensörde difüzyon engeli diğerlerine göre daha az olduğundan daha düşük derişimler için yüksek biyosensör cevabı verdi ama derişim artışıyla doğru orantılı bir artış gözlenmedi. Jelatin miktarı çok düşük olduğu için de fiziksel olarak dayanıklı bir biyoaktif tabaka hazırlanamadı.

30 mg jelatin ile hazırlanan biyosensörün biyoaktif tabakası daha dayanıklıydı ama 20 mg ile hazırlanan biyosensör substrat derişimiyle doğru orantılı ve daha yüksek biyosensör cevabı verdi. Bu nedenle optimum jelatin miktarı 20 mg olarak belirlendi.

4.4.3. Glutaraldehyd yüzdesinin etkisi

Glutaraldehyd yüzdesinin optimizasyonu için 150 µl 50 mM; pH: 7.5 fosfat tamponu içinde optimum olarak belirlenen 9 mg enzim ve 20 mg jelatin içeren biyosensörler farklı yüzdelerdeki glutaraldehyd çözeltileri ile hazırlandı. Bu amaçla 1, 2.5, 3, 3.5 ve % 4'lük glutaraldehyd çözeltileri kullanıldı. Ölçümler belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirildi ve elde edilen sonuçlar **Şekil 4.8'**de grafik olarak verildi.



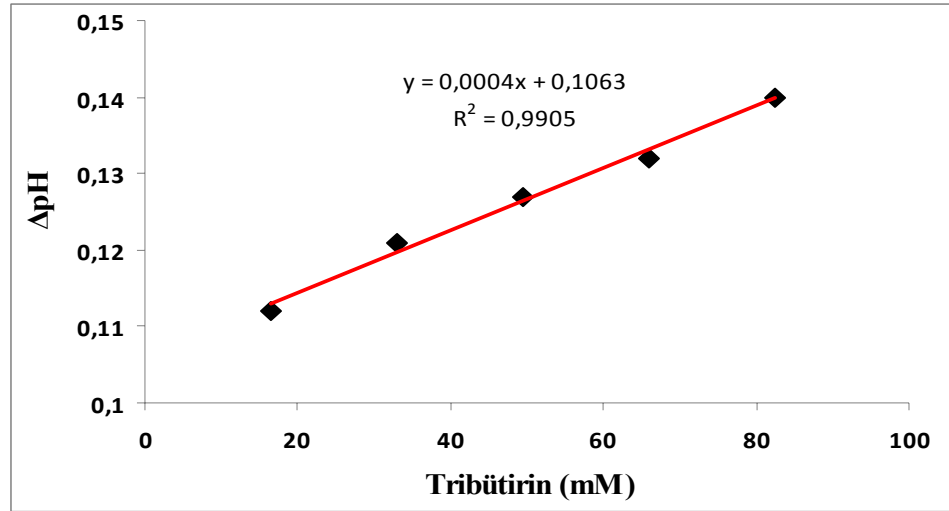
Şekil 4.8. Biyosensör cevabı üzerine glutaraldehid yüzdesinin etkisi

Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisini belirlemek için alınan ölçümlerde % 1'lik glutaraldehidle hazırlanan biyoaktif tabaka fiziksel olarak dayanıksızdı. % 4'lük glutaraldehid ile hazırlanan biyosensörde çapraz bağlanma oranının fazla olmasından dolayı difüzyon engeli nedeniyle daha düşük biyosensör cevapları verdi. Daha doğrusal biyosensör cevapları veren % 2,5'lik glutaraldehid optimum olarak belirlendi. Bundan sonraki denemelerde çapraz bağlayıcı ajan olarak % 2,5'lik glutaraldehid çözeltisi kullanıldı.

4.5. Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları

4.5.1. pH biyosensörünün doğrusal ölçüm aralığı

Belirlenen optimum koşullarda hazırlanan pH biyosensörü ile lipidlerin doğrusal tayin aralığının tespit edilmesi için standart olarak kullanılan tribütirinin farklı derişimlerinde ölçümler alındı. Bu ölçümler arasında doğrusal bir eğri veren 16,5- 82,5 mM tribütirin derişim aralığı lipidlerin doğrusal tayin aralığı olarak belirlendi. Geliştirilen pH biyosensörünün doğrusal tayin aralığını gösteren grafik aşağıda **Şekil 4.9'**da verildi.



Şekil 4.9. pH biyosensörünün doğrusal ölçüm aralığı

4.5.2. Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği

Geliştirilen pH biyosensörüyle yapılan tekrarlanabilirlik çalışmalarında tribütirin derişimi 82.5 mM kullanılarak ardışık ölçümler alındı ve **Tablo 4.2'de** verildiği gibi tribütirin tayini için alınan tekrarlanabilirlik sonuçlarında ortalama değer (X_{ort}) 91.25 mM; standart sapma (S.D) ± 4.732 ve varyasyon katsayısı (C.V) % 10.97 olarak hesaplandı.

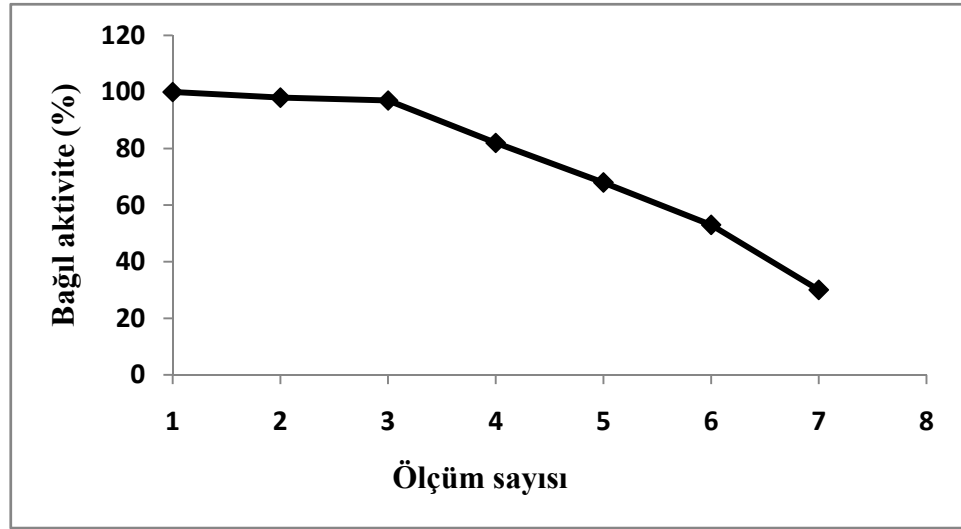
Tablo 4.2. Tribütirin tayini için alınan tekrarlanabilirlik sonuçları

Standart tribütirin derişimi	Ölçülen derişim ortalaması	Standart sapma	% Varyasyon katsayısı
82.5 mM	91.25 mM	± 4.732	10.97

Bir biyosensör sisteminin tekrarlanabilirliğinde standart sapma ve varyasyon katsayıları önemlidir. Bir biyosensör sisteminin arka arkaya kaç kez kullanılabilir olduğunu gösterir. Bu sayı göreceli olarak ne kadar yüksek ise aynı sensörle daha çok sayıda örnekte lipid analizi yapılabilir. Bunun için varyasyon katsayısının % 5'ten küçük olması istenir.

4.5.3. İşlem kararlılığı

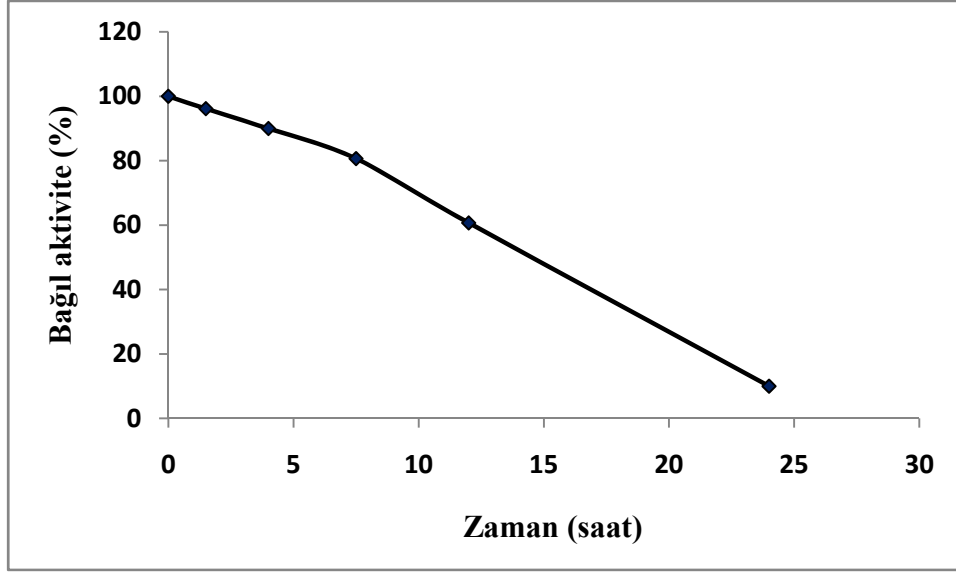
Belirlenen optimum koşullarda hazırlanan pH biyosensörle sabit tribütirin için ara vermeksizin ölçümler alındı. Biyosensör ile alınan ilk ölçümün aktivitesi % 100 kabul edilerek, her ölçüm için bulunan bağıl aktivite Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. İşlem kararlılığı

4.5.4. Depo kararlılığı

pH biyosensörünün depo kararlılığını belirlemek için önce optimum koşullarda biyosensör hazırlandı. Bu biyosensör ile değişik saatler boyunca tribütirinin substratının sabit derişimi için ölçümler alındı. Bu ölçümlerde ilk saat alınan biyosensör cevabı %100 kabul edilerek diğer biyosensör cevapları buna göre hesaplandı. Son veriler ölçüm saatlerine göre % bağıl aktivite Şekil 4.11'de verildi.

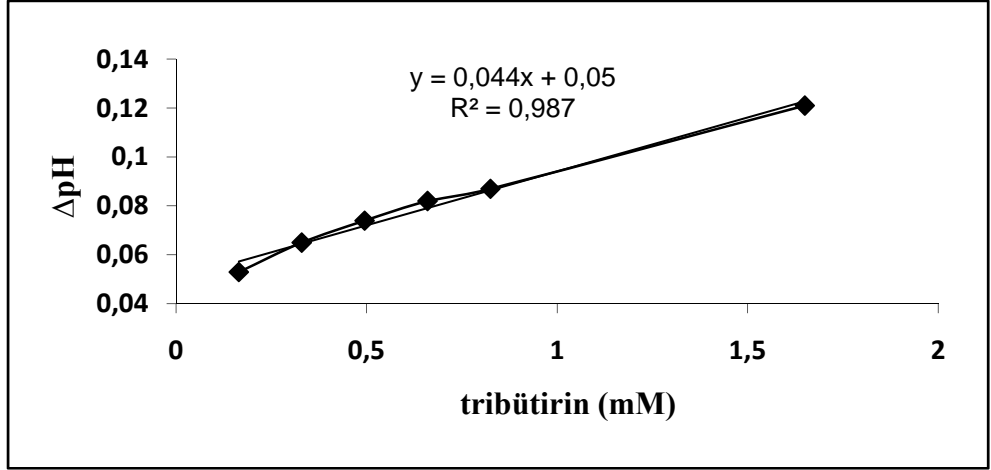


Şekil 4.11. Depo kararlılığı

Şekilden görüldüğü gibi yaklaşık ilk 8 saatte başlangıç aktivitesinin % 80'ini korumuştur. İlk 12 saatteki aktivitenin, başlangıcın % 60'ını koruduğu görülmektedir. Yaklaşık 24 saatin sonunda aktivite tamamen düşmüştür.

4.6.Örneklere Trigliserid Tayininde Uygulanabilirlik Testleri

Temin edilen kan örneklerinin spektrofotometre metoduyla mg/ml cinsinden trigliserid miktarları çalışmada tribütirin standardı ile belirlenen biyosensörün doğrusal tayin aralığının altında bulunmuştur. Bu yüzden daha düşük trigliserid derişimleri kullanılarak yeni doğrusal tayin aralığı belirlendi (Şekil 4.12). Kan örneklerinin geliştirilen pH biyosensörü ile örnekler, substrat gibi kullanılarak optimize koşullar altında, trigliserid içerikleri, daha önce anlatılan şekilde tayin edildi. Sonuçlar **Tablo 4.3**'de verildi.



Şekil 4.12. Örnek tayinde kullanılan doğrusal ölçüm aralığı

Tablo 4.3. Örneklerde Trigliserid Tayini

Kan Örnekleri	Spektrofotometrik yöntem ile trigliserid miktarı (mg/ml)	Biyosensör ile ölçülen trigliserid miktarı	
		ΔpH	mg/ml
1	0,58	0,054	0,39
2	1,55	0,116	1,49
3	3,03	0,152	2,31

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

pH biyosensörü hazırlanmasında **enzim** olarak; domuz pankreatik lipazı ve *C.rugosa* lipazı denendi. Her iki lipaz kullanılarak hazırlanan biyosensörler ile denemeleri yapıldığında, her iki enzim için, tribütirinin artan derişimiyle orantılı olarak azalan pH değişimi elde edildi. Ancak *C. rugosa* lipazlı biyosensörle gözlenen pH değişimi, pankreatik lipazlı sensöre göre daha doğrusal ve biraz daha fazla bulundu. Bununla birlikte aralarında anlamlı bir fark bulunmadı. *C. rugosa* lipazlı sensör çalışmalarında, bu enzimin klinik ve gıda uygulamalarında yaygın şekilde kullanıldığı ve kısmi aktivite fazlalığından dolayı *C. rugosa* lipazı biyosensör biyobileşeni olarak seçildi. Tribütirin substratı kullanılarak *C. rugosa* lipaz enziminin gözenekli silikonla immobilizasyonu ile potansiyometrik bir biyosensör geliştirilmiştir (S. Setzu vd., 2007). pH biyosensörü olmamasına karşın oluşan ve ölçülen potansiyel fark pH değişiminin sonucu olduğundan bu tez çalışması *C. rugosa* lipazının, klinik ve gıda uygulamaları yanında yüksek aktivitesi, enantioseçici reaksiyonlardaki performansı gibi özellikleriyle yaygın şekilde kullanıldığı belirtilmiştir. Diğer bir çalışma da; lipazların spesifik substratlarını belirlemede 2-aril propiyonik asit alkil esterleri, steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçların bir sınıfı *C. rugosa* lipazı ile hidrolizlenmiştir. (Vakhlı J., 2006)

Substrat spesifitesi çalışmasında; trigliseridlerden triasetin, triolein, tribütirin, trikapriline, tristearin substratları hazırlanan pH biyosensörü ile verdiği biyosensör cevapları incelendi. En yüksek spesifiteyi tribütirine karşı gösterdi. Vijayalakshmi A. vd.'nin (2008) trigliseridin belirlenmesi için pH esaslı enzim biyosensörü olarak hazırlanan çalışmasında tribütirin, triolein, trioktonat substratları denenerek trioleine spesifik *Bacillus subtilis* lipazı ile yapılmış olan manyetik nanopartikül kullanılarak hazırlanan enzim alan etkili (ENFET) biyosensörü geliştirilmiştir. Bir diğer çalışma olan tribütirin ve pestisid tayini için hazırlanan pH esaslı enzim biyosensöründe de *C. rugosa* lipazının tribütirine karşı aktivitesi en yüksek bulunmuştur (Kartal vd., 2007). Amperometik enzim esaslı diğer bir çalışmada *C.rugosa* lipazının en yüksek substrat spesifikliği trioleine karşı bulunmuştur (Tkáč vd., 2000).

Biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyon çalışmalarında;

pH optimizasyonu için; Fosfat tamponunun (50 mM) pH 'ı 6.0, 6.5, 7.0 ve Tris-HCl tamponunun (50 mM) pH'ı 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 olan tamponlar hazırlandı. Bu tamponlarda hazırlanan biyosensörle ölçümler yapıldı. Sonuçta; değişen pH'a karşı bağlı aktivite grafiği elde edildi. Şekil 4.3'ten optimum biyosensör cevabı pH: 7.5 olarak bulundu. Setzu vd.'nin (2007) geliştirdiği *C. rugosa* lipazının immobilizasyonu için gözenekli silikonun kullanıldığı potansiyometrik biyosensörde optimum pH:7 fosfat tamponu bulunmuştur. Tribütirin ve pestisid tayini için geliştirilen *C. rugosa* lipazının biyobileşen olarak kullanıldığı pH biyosensöründe ise optimum pH:7.5 fosfat tamponu olarak belirtilmiştir (Kartal vd., 2007). Mikroemülsiyon esaslı jelle cam elektroda immobilize edilen *C. rugosa* lipazının biyobileşen olarak kullanıldığı bir çalışmada optimum pH Tris-HCl tamponunda 8.5'tur (Huang vd., 2001).

Tampon derişiminin belirlenmesi çalışmasında; 25, 50, 75, 150, 200, 250 mM derişimlerinde pH: 7.5 Tris-HCl tamponları hazırlandı. Geliştirilen biyosensör ile alınan ölçümlerde en iyi biyosensör cevabı 200 mM'lık tamponu ile (pH: 7.5) sağlandı. Kartal vd., (2007) çalışmasında aynı enzimli pH biyosensöründe en iyi biyosensör cevabı pH 7.5, 50 mM fosfat tamponu ile alınmıştır. *C. rugosa* lipazı ile hazırlanan nanoyapılı seryum oksit film kaplı trigliserid biyosensöründe optimum tampon derişimi fosfat tamponunda 50 mM, (pH 6.5 % 0.9 NaCl)'dir (Solanki vd., 2009).

Optimum sıcaklığın denemelerinde; sırasıyla 25, 30, 35, 40, 45, 50 °C sıcaklıklarda reaksiyonlar gerçekleştirildi. Hazırlanan biyosensör ile alınan biyosensör cevapları bağlı aktiviteye karşı grafiklendirildi. Şekil 4.5'ten optimum sıcaklık en yüksek biyosensör cevabının görüldüğü 35 °C olarak bulundu. Kartal vd.'nin (2007) geliştirdiği pH esaslı enzim biyosensörde en iyi biyosensör cevabı 30 °C'dir. *C. rugosa* lipazının cam elektroda mikroemülsiyon esaslı jelle immobilize edildiği çalışmada optimum sıcaklık 37 °C olarak belirlenmiştir (Huang vd., 2001).

Biyosensörün biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyon çalışmalarında;

Enzim miktarının belirlenmesi; denemelerinde diğer bileşenlerden jelatin ve glutaraldehid miktarları sabit tutularak, elektroda sırasıyla 6, 8, 9, 12, 15, 18 mg

enzimin immobilizasyonu ile biyosensör hazırlandı. Alınan ölçümlerde 15 ve 18 mg enzim ile hazırlanan biyosensörde muhtemelen difüzyon engelinden dolayı düşük biyosensör cevapları elde edildi. En iyi biyosensör cevabını veren 9 mg enzim optimum enzim miktarı olarak belirlendi. Kartal vd.'nin (2007) geliştirdiği pH esaslı enzim biyosensöründe 0.5, 1, 2 mg *C. rugosa* lipazı immobilize edilerek alınan ölçümler sonucunda en yüksek biyosensör cevabı 1 mg enzim olarak bulunmuştur. Domuz pankreatik lipazının gözenekli silikonla immobilize edilmesiyle trigliseridlerin belirlenmesi için oluşturulan bir potansiyometrik biyosensör çalışmasında en yüksek biyosensör cevabı 30 mg olarak bulunmuştur (Reddy vd., 2003). Farklı bir biyobiyosensör olan probiyotik bakteri (*Lactobacillus acidiphilus*) ile hazırlanan biyosensör ile yapılan çalışmada 2.5, 5, 10 mg bakteri miktarları denenmiştir. Optimum 5 mg bakteri bulunmuştur (Sagiroglu vd., 2011).

Jelatin miktarının optimizasyonunda daha önce metodlarda belirtilen jelatin miktarlarını içeren biyosensörler hazırlandı. Hazırlanan biyosensörlerde jelatin miktarının azlığı veya fazlalığı biyoaktif tabakanın fiziksel dayanıklılığını etkiler (Yahşi, A., 2005). Dayanıklı ancak substrat difüzyonunu engellemeyen jelatin miktarı Şekil 4.7'den görüldüğü gibi 20 mg olarak belirlendi. Kartal vd.'nin (2007) geliştirdiği pH esaslı enzim biyosensöründe *C. rugosa* lipazı immobilize edilebilmesi için gereken jelatin miktarı 20 mg bulunmuştur. H. Palüzar'ın (2009) mikrobiyal esaslı biyosensöründe jelatin miktarı optimizasyonu için 2.5, 5, 10 mg jelatinle biyosensör cevapları karşılaştırılmış ve en yüksek biyosensör cevabı 5 mg olarak bulunmuştur.

Glutaraldehid yüzdesinin belirlenmesinde; % 1, 2.5, 3, 3.5 ve 4'lük glutaraldehid çözeltileri kullanıldı. Verilere bağlı olarak hazırlanan şekil 4.8'de görüldüğü gibi optimum glutaraldehid yüzdesi 2.5 olarak bulundu. Kartal vd.'nin (2007) geliştirdiği *Candida rugosa* lipazı immobilize pH biyosensöründe optimum glutaraldehid % 2.5 olarak bulunmuştur. Aynı immobilizasyon yönteminin kullanıldığı bitkisel doku esaslı bir biyosensör çalışmasında optimum glutaraldehid % 1.25 bulunduğu belirtilmiştir (Özcan ve Sagiroglu, 2010).

pH biyosensörünün karakterizasyon çalışmalarında; yukarıda belirlenen tüm optimum değer ve koşullar kullanılarak karakterizasyon çalışmaları yapıldı.

Trigliseridlerin doğrusal ölçüm aralığının; ilk karakterizasyon çalışması olarak, değişen tribütirin derişimlerine karşılık gelen ΔpH 'lar ile Şekil 4.9 grafiğı elde edildi. Doğrusal ölçüm aralığı 16.5–82.5 mM tribütirin olarak belirlendi. Domuz pankreatik lipazının gözenekli silikonla immobilize edilmesiyle trigliseridlerin belirlenmesi için oluşturulan potansiyometrik biyosensör çalışmasında tribütirin substratının 10-25 mM derişimleri aralığı bulunmuştur (Reddy vd., 2003). Tribütirin tayini için geliştirilen pH biyosensöründe doğrusal tayin aralığı 65-455 μM olarak belirlenmiştir (Kartal vd., 2007). *C. rugosa* lipazının cam elektroda mikroemülsiyon esaslı jelle immobilize edildiğı çalışmada doğrusal ölçüm aralığı 0.002-2 mM olarak bulunmuştur (Huang vd., 2001).

pH biyosensörün tekrarlanabilirliğinin ve işlem kararlılığının belirlenmesi için tribütirin ile arka arkaya ölçümler alındı. 5 ölçüm için ortalama değer (X_{ort}): 91.25 mM, standart sapma (S.D): ± 4.732 ve varyasyon katsayısı (C.V): % 10.97 olarak hesaplandı. Cam elektroda *C. rugosa* lipazının mikroemülsiyon esaslı jelle immobilize edildiğı çalışmada; 8.6×10^{-5} mol/l zeytinyağı için işlem kararlılığı 7 ölçüm ve varyasyon katsayısı: % 2.8 bulunmuştur (Huang vd., 2001). Bazı bitkisel dokularda fenol oksidaz enziminin kullanılabilirliği çalışmasında standart sapma (S.D): ± 0.3294 , varyasyon katsayısı: % 1.4, işlem kararlılığı 7 ölçüm çıkmıştır (Sagiroglu ve Özcan, 2009). Serumda trigliserid tayini için geliştirilen amperometrik enzim biyosensöründe iki farklı immobilizasyon destekleri için varyasyon katsayıları: % 6.2 ve 7.4 bulunmuştur (Narang J. vd., 2010b). Etanol tayini için *Candida tropicalis* hücrelerinin kullanıldığı bir biyosensörün tekrarlanabilirlik çalışmalarında varyasyon katsayısı: % 3.39, işlem kararlılığı 10 ölçüm çıkmıştır (Akyılmaz ve Dinçkaya, 2004).

Depo kararlılığı çalışmalarında, yaklaşık ilk 8 saatte başlangıç aktivitesinin % 80'ini korumuştur. İlk 12 saatteki aktivitenin, başlangıcın % 60'ını koruduğı görülmektedir. Yaklaşık 24 saatin sonunda aktivite tamamen düşmüştür. Depo kararlılığı beklenenin altında bulunmuştur. Literatürlerde biyosensörlerde kullanılan enzimin, immobilizasyon bileşenleri ve yönteminin ve ölçüm metodunun değişmesine bağlı olarak elde edilen biyosensörlerin depo kararlılıkları saatler en çok ta günler mertebesinde bulunmuştur. Benzer çalışmalardan saat mertebesinde çalışma bulunamamıştır. Aynı immobilizasyon yönteminin kullanıldığı bitkisel doku esaslı bir

biyosensör çalışmasında 10 gün civarında depo kararlılığı % 80 oranında koruduğu belirtilmiştir (Özcan ve Sagiroglu, 2010). Etanol tayini için *Candida tropicalis* hücrelerinin kullanıldığı bir biyosensörün depo kararlılığı çalışmasında depolama ömrü 9 gün olarak rapor edilmiştir (Akyılmaz ve Dinçkaya, 2004).

Sonuç olarak;

Bu tez kapsamında trigliserid tayini amacıyla lipaz enzimi immobilize edilmiş bir pH biyosensörü geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla; pH elektrodu ve pH metre kolay çalışılan ve temin edilen alet olması sebebiyle kullanıldı. Biyosensör geliştirilmesi için pH elektrodunun yuvarlak cam ucu enzim immobilizasyonu için pratik olarak uygun olmadığı gibi kararlı da olmayabilir. Bu göz önüne alınarak pH elektrodu çözücülerden etkilenmeyen mikropipet uçları kullanılarak enzim immobilizasyonuna uygun olacak şekilde modifiye edilmiştir. Böylece kullanışlı, ortamda pH değişiminin algılanmasına olanak sağlayan bir biyosensör elde edildi.

Bu biyosensörün çalışma koşulları, immobilizasyon bileşenlerinin miktarları optimize edildi. Aynı zamanda biyosensörün karakterizasyon çalışmaları da yapıldı.

Biyobileşen olarak kullanılan *Candida rugosa* enzimi varlığında ortamdaki pH değişimi algılaması çıplak pH elektrodunun algılamasına yakın bulundu. Belirlenen substrat için doğrusal ölçüm aralığı oldukça geniştir. Geliştirilen biyosensörün istenildiği kadar olmayan işlem ve depo kararlılığının biraz daha artırılması için çalışma yapılması gerekmektedir.

Biyosensörün kan serumu örneklerinde lipid tayini uygulanabilirlik çalışmasında Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı tarafından yapılan ölçümlerde bulunan değerlerle, geliştirilen biyosensörle ölçülen değerler arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Dolayısıyla biyosensörün kararlılığı arttırıldığında kan örneklerinde lipid tayinlerinde uygulanabileceği görüldü.

6. KAYNAKLAR

Adam B., Ardıçoğlu Y., 2002. Klinik Biyokimya Analiz Metotları, Ankara

Akoh, C.C., Min, D.B., 1998. “Microbial Lipases and Enzymatic Interesterification”, Food Lipids-Chemistry, Nutrition and Biotechnology, Marel Deccer, Inc., 641- 698

Akyılmaz E. 2002. “Alkol tayinine yönelik biyosensör geliştirilmesi” Doktora Tezi

Akyılmaz E. ve Dinçkaya E., 2004. An Amperometric Microbial Biosensor Development based on Candida tropicalis Yeast Cells for Sensitive Determination of Ethanol, Biosensors and Bioelectronics, (20), 1263–1269

Alberghina L., Lotti M., 1998. “Lipases and lipids: structure, specificity and applications in biocatalysis”, Chem. Phys. Lipids. 93.

Bachman S., Gebicka M.L., Gasyna Z., 2006. “Some properties of whole-cell glucose isomerase immobilized in polyacrylamide gel by radiation” Inter Science 33 (11):366 - 369

Bereuter T.L. ve Lorbeer E., 1995. Monitoring of lipase-catalyzed cleavage of acylglycerols by high-temperature gas chromatography J. Chromatogr. A 697,469–474

Bhambi M., Minakshi, Pundir C.S., 2006. Preparation of Oxygen Meter Based Biosensor for Determination of Triglyceride in Serum. Sensors & Transducers Magazine 67:61-567

Bickerstaff, G.F., 1997. “Immobilization of Enzymes and Cells”, Humana press, Totowa, New Jersey, 12-32.

Bornscheuer U.T., Kazlauskas R.J., 1999. Hydrolases in organic synthesis- regio- and stereoselective biotransformations. Wiley-VCH, Weinhei.

Brune A.K. ve Gotz F., 1992. Degradation of Lipids by Bacterial Lipases. In: Microbial Degradation of Natural Products, Winkelman, G. (Ed.). VCH., Weinhein, pp: 243-266.

Cabral J.M.S., Kennedy J. F. ve Kalogerakis B., 1991. “Covalent and coordination immobilization of proteins”, Bioprocess Technol., 14:73-138.

Chaplin M. 2004. Available at: <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/biosensors.html>. Accessed 2008 August 1.

Chen S., Liu Y. ve Yu P., 1996. “Study on column reactor of chitosan immobilized”, Chem. Abstr., 127 (4): 127-129

Cyglar M. ve Schrag J.D., 1999. Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1441: 205-214

Drauz K. ve Waldman H, (eds.) 2002. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim. Volumes 1-3

Deeth H.C. ve Touch V. 2000. Methods for detecting lipase activity in milk and milk products. *Aust. J. Dairy Technol.* 55(2), 153-168.

Digenis GA, Gold TB, Shah VP., 1994. Cross-linking of gelatin capsules and its relevance to their in vitro in vivo performance. *J Pharm Sci*; 83:915-21.

Dinçkaya E. ve Telefoncu A., 1993. Enzyme electrode based on oxalate oxidase immobilized in gelatin for specific determination of oxalate, *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, (30), 282-284.

Dinçkaya E., 1999. Enzim sensörleri, *Biyosensörler* (Ed. Azmi Telefoncu), Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir, 81-142.

Erarslan A., 2002. Mayıs 414, *Bilim Teknik*, 35:16-18

Esposito E., Cortesi R., Nastrazzi C., 1995. “Gelatin Microspheres: Influence of Preparation Parameters and Thermal Treatment on Chemico-Physical and Biopharmaceutical Properties”, *Biomaterials*, 20, 2009-2020.

Faber K. 2004. *Biotransformations in organic chemistry*, Springer-Verlag, Berlin, (pp.) 330-331

Fadıloğlu S., 1996. “Kinetics of Olive Oil Hidrolysis by Free and Immobilized *Candida Rugosa* Lipase” Ph. D. Thesis, Universtiy of Gaziantep, 24-56

Ferrato F., Carrière F., Sadra L. ve Verger R. 1997. A critical re-evaluation of the phenomom of ‘interfacial activation’. *Methods Enzymol* 286, 327-347

Gargouri Y., Pieroni G., Riviere C., Sauniere J.F., Lowe P.A., Sadra L. ve Verger R. 1986. Kinetic assay of human gastric lipase on short- and long-chain triacylglycerol emulsions. *Gastroenterology* 91, 919–925

Ghosh P.K., Saxena T.K., Gupta R., Yadav R.P. ve Davidson S. 1996. Microbial lipases: production and applications. *Sci. Prog.* 79:119-157.

Gloger M., Tischer W., 1981. “Determination of Catalytic Activity of Immobilized Enzymes” In *Methods of Enzymes Analysis*, 2nd ed., Mc Graw Hill, New York, 142-154

Gooding J.J., 2006. Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends. *Analytica Chimica Acta* 559 :137–151

Guilbault G.G., Kauffmann J.M. 1987. Enzyme-based electrodes as analytical tools: A review. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 9:95-113

Gulomova K., Ziomek E., Schrag J.D., Davranov K., and Cygler M. 1996. Purification and characterization of a *Penicillium* sp. lipase which discriminates against diglycerides. *Lipids*, 31, 379-384

Haim M., Benderly M., Brunner D., Behar S., Graff E., Reicher-Reiss H., Goldbourt U., 1999. Elevated Serum Triglyceride Levels and Long-Mortality in Term Patients With Coronary Heart Disease, BIP,

Hastings GW, Ducheyne P., 1984. Macromolecular biomaterials. Boca Raton: CRC Pres.

Hemachander C., Bose N., Puvanakrishnan R., 2001. Whole Cell Immobilization of *Ralstonia pickettii* for lipase production, *Process Biochemistry*, (36), 629-633.

Huang XR, YZ Li, GL Yang, LL Liu, YB Qu ve WJ Zhang. 2001. A novel method for fabrication of a glass-electrode-based lipase sensor. *Chinese Chemical Letters* 12(5):4536.

Jacobs S.L. ve Henry R.J., 1962. Studies on the gravimetric determination of serum lipids. (*JUn. Chim. Acta* , 270

Jaeger K.-E., Ransac S., Dijkstra B. W., Colson C., Heuvel M. ve Misset O. 1994. *FEMS Microbiology Review* 15, 29–63 Bacterial lipases.

Jaeger K.E. ve Eggert T., 2002. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13: 390-397.

Jensen R.G., 1983. Detection and determination of lipase acylglycerol hidrolase activity from various sources. *Lipids* 18: 650-657

Kartal F., Kılınç A., Timur S. 2007. Lipase biosensor for tributyrin and pesticide detection 87: 715–722

Kennedy J.F. ve Cabral J.M.S., 1985. “Immobilized enzymes cells”, Immobilization of enzyme, (Woodward, 2nd ed.), Oxford Press, U.K., 19-37

Khor E., 1997. Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprotheses. *Biomaterials*;18:95-103.

Knight J.A., Anderson S. ve Rawle J.M., 1972. “Chemical basis of the sulfo-phospho-vanillin reaction for estimating total serum lipids” *Clin Chem*, 18(3): 199-202

Koç M., Yilmazer M.S., Ertekin K.F., 2010. Mikroapsülasyon ve gıda teknolojisinde kullanımı 16:1

Lanz W.W. ve Williams P.P., 1973. Characterization of Esterases Produced by a Ruminal Bacterium Identified as *Butyrivibrio fibrisolvens* J. Bacteriol. 113, 1170–1176

Lawrence R.C., Fryer T.F. ve Reiter B., 1967. Rapid Method for the Quantitative Estimation of Microbial Lipases. Nature (London) 213, 1264–1265

Macholan L., 1987. Recent Progress in Developing Enzyme and Tissue-based Membrane Electrodes, Acta-Biotechnol, 7(69), 547-553.

Mehrvar M., Bıs C., Scharer J.M., Moo-Young M. ve Luong, J.H., 2000. Fiber-optic biosensors- Trends and advances. Analytical Science Vol 16 July: 677-692.

Meyer M ve Morgenstern B., 2003. Characterization of gelatine and acid soluble collagen by size exclusion chromatography coupled with multi angle light scattering (SEC-MALS). Biomacromolecules; 4:1727–32

Minakshi, Pundir C.S. 2008. Construction of an amperometric enzymic sensor for triglyceride determination. Sens Actuat B: Chem 133:251–5.

Miyoshi M., Sakaki H., Usami M., Lizuka N., Shuno K., Aoyama M., Usami Y. 2011. Oral administration of tributyrin increases concentration of butyrate in the portal vein and prevents lipopolysaccharide-induced liver injury in rats Volume 30, 252-258

Murthy M.R., Mandappa I.M., Latha R., Vinayaka A.C., Thakur M.S., Manonmani H.K. 2010. An immobilized dehydrohalogenase based potentiometric biosensor for the detection of chlorinated pesticides .Anal. Methods, 2: 1355-1359

Narang J, Bhambi M, Minakshi, Pundir CS. 2010a. Fabrication of an amperometric triglyceride biosensor based on PVC membrane. Anal Lett 2010;43:1–10.

Narang J, Bhambi M, Minakshi, Pundir CS. 2010b. Determination of serum triglyceride by enzyme electrode using covalently immobilized enzyme on egg shell membrane. International Journal of Biological Macromolecules 47 (2010) 691–695

Olde Damink LHH, Dijkstra PJ, van Luyn MJA, van Wachem PB, Nieuwenhuis P, Feijen J., 1995. Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials. J Mater Sci: Mater Med;6:460-72.

Otani Y, Tabata Y, Ikada Y., 1998. Hemostatic capability of rapidly curable glues from gelatin poly(L-glutamic acid) and carbodiimide. Biomaterials;19:2091-8.

Özcan M. H., Sagiroglu, A. 2010. A novel amperometric biosensor based on banana peel (*Musa cavendish*) tissue homogenate for determination of phenolic compounds, Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology an International Journal, 38, (4), 208–214

Öztürk B., 2006. “Lipaz enzimi: yapısal özellikleri ve uygulama alanları”. Gıda mühendisliği dergisi, 20-23

Paiva A.L., Balcao V.M., Malcata F.X., 2000. “Kinetics and Mechanisms of Reactions Catalyzed by Immobilized Lipases”, Enzyme and Microbial Technology, 27:187- 204.

Palüzar H. 2009. Bazı Organik Bileşiklerin Tayini İçin Mikrobiyal Esaslı Biyosensör Geliştirilmesi (yüksek lisans tezi)

Pandey Ashok, Benjamin Sailas, Soccol Carlos R., Nigam Poonam, Krieger Nadia ve Soccol, Vanete T., 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. Biotechnology and Applied Biochemistry, vol. 29: 119-131.

Park T.G., Hoffman A.S., 1993. “Thermal Cycling Effects on the Bioreactor Performances of Immobilized β -Galactosidase in Temperature Sensitive Hydrogel Beads”, Enzyme Microbial Technology, 15: 476-556

Pérez José L., Pulido A., Pantozzi F., Rogelio M. 1990. "Butyrate esterase (4-methylumbelliferyl butyrate) spot test, a simple method for immediate identification of *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* corrected" Journal of Clinical Microbiology 28 (10): 2347–2348

Petersen M.T.N., Fojan P., Petersen S.B., 2001. “How do Lipases and Esterases Work: The Electrostatic Contribution” Journal of Biotechnology, 85(2):115-147

Pijanowska D.G., Baraniecka A., Wiater R., Ginalska G., Łobarzewski J., Torbicz W. 2001. The pH-detection of triglycerides .78: Pages 263-266

Reddy R.R.K., Chadha A. ve Bhattachary A. 2001. Porous silicon based potentiometric triglyceride biosensor. Biosensors and Bioelectronics 16(4-5):313-7.

Reddy R.R.K., Basu I. ve Bhattachary E. 2003. Estimation of triglycerides by porous silicon based potentiometric biosensor. Current Applied Physics 3:155-161

Redondo O., Herrro A., Bello J.F., Roig M.G., Calvo M.V., Plou F.J. ve Burguillo F.J. 1995. Comparative kinetic study of lipases A and B from *Candida rugosa* in the hydrolysis of lipid P-nitrophenyl esters in mixed micells with triton X-100. Biochimica etBiophysicaActa (BBA)-General Subjects, 1243: 15-24.

Rejeb BI, Arduini F, Amine A, Gargouri M, Palleschi G. 2007. Amperometric biosensor based on Prussian Blue-modified screen-printed electrode for lipase activity and triacylglycerol determination. Anal Chim Acta 594:1–8.

Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maukean A., Dubourdşeu D., 2000. Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments, John Wiley and Sons Ltd., West Sussex, (404)s

Rose P.J., Mark H.F., Bikales N.M., Overberg C.G., Menges G., Kroschwitz J.I., 1987. “Encyclopedia of Polymer Science and Engineering”, 2nd. Ed., Wiley Interscience, New York, 7, 89.

Ruiz L., Rodriguez-Fernandez M.F.C. 1982. Kinetic study of hepatic triglyceride lipase from rat liver soluble fraction. *Enzyme* 27,215–219

Sagioglu A., Ozcan H.M., Hasancebi O. 2009. Scanning of Some Herbal Tissues to be Used with Biosensors as Polyphenol Oxidase Enzyme Source. *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 37 (4) 303-312

Sagioglu A., Paluzar H., Ozcan H.M., Okten S., Sen B. 2011. A novel biosensor based on *Lactobacillus acidophilus* for determination of phenolic compounds in milk products and wastewater. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*.41:321-336

Scardi V., 1987. “Immobilization of Enzymes and Microbial Cells in Gelatin, Methods in Enzymology”, 135, 293-294.

Schmidt Rolf D. ve Verger Robert. 1998. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 37: 1608-1633.

Schmitke J.L., Stern L.J., Klibanov A.M. 1997. The crystal structure of subtilisin Carlsberg in anhydrous dioxane and its comparison with those in water and acetonitrile. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4250-4255

Setzu S., Salis S., Demontis V., Salis A., Monduzzi M., Mula Guido 2007. Porous silicon-based potentiometric biosensor for triglycerides. *phys. stat. sol.* 204: 1434–1438

Shah J. ve Wilkins E, 2003. Electrochemical Biosensors for Detection of Biological Warfare Agent Electroanalysis; 15, 3: 157-167

Sharma S. K., Sehgal N., Kumar A., 2003. Biomolecules for Development of Biosensor and their Applications, *Current Applied Physics*, (3), 307-316.

Sidwell J. S. ve Rechnitz G. A., 1986. Progress and Challenges for Biosensors using Plant Tissue Materials, *Biosensors*, 2 (4), 221-233.

Pratima R. Solanki, Ajeet Kaushik, Anees A. Ansari, and B. D. Malhotra. 2009. Nanostructured zinc oxide platform for cholesterol sensor. *Physics letters* 94, 143901

Starodub N.F. 2006. Biosensors for the evaluation of lipase activity *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 40:155-160

Staubmann R., Ncube I., Gubitz G. M., Steiner W. ve Read J. S. 1999. Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. seeds. *J Biotechnol.* 75, 117–126

Telefoncu A., 1999a. Biyosensörlere Genel Bakış, *Biyosensörler* (Ed. Azmi Telefoncu), Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir, 1-9.

Telefoncu A., 1999b. Biyoreseptörlerin immobilizasyonu, Biyosensörler (Ed. Azmi Telefoncu), Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir, 42-65.

Telefoncu, A., 1997. “İmmobilize enzimler” Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu Kuşadası-AYDIN,193-247.

Timur S., Pazarhoğlu N., Pilloton R., Telefoncu A., 2003. Detection of Phenolic Compounds by Thick Film Sensors based on Pseudomonasputida, Talanta, (61), 87-93.

Tkáč J., Švitel J., Novák R., Šturdik E. 2000. Triglyceride Assay by Amperometric Microbial Biosensor: Sample Hydrolysis and Kinetic Approach. Analytical Letters. V33, 12.

Türk B., 2008. İmmobilize Lipaz Enzimi Kullanılarak Etil Bütirat Üretimi

Tüzün, C. 1997. “Biyokimya, 3. baskı”, Palme Yayınları, Ankara, 116- 117,124-125

Vakhlu J. 2006. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. Electronic Journal of Biotechnology 0717-3458 Vol.9 No.1

Vijayalakshmi A., Tarunashree Y., Baruwati B., Manorama S.V., Narayana B.L., Johnson R.E.C., Rao N.M. 2008. Enzyme field effect transistor (ENFET) for estimation of triglycerides using magnetic nanoparticles. Biosensors and Bioelectronics V 23, 11, 15 June 2008, Pages 1708–1714

Villeneuve P., Muderhwa J., Graille J., Haas M. 2000. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. J Mol Catal B: Enzym 9:113-148

Yahşi, A., 2005. “Aljinat jel boncukları ve poli(akrilamid-ko-akrilik asit) hidrojenlerle tirozinaz enziminin binari yöntemi ile immobilizasyonu” , Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 17-25

Winartasaputra J., Kutan S.S. ve Guilbault G.C. 1982. Amperometric enzyme determination of triglyceride in serum. Anal. Chim., 54: 1987–1990.

Wiseman, A., 1986. “Handbook of Enzyme Biotechnology 2nd edit.”, John Wiley&Sons Chcester, England, 12

Zaborsky, O., 1974. “İmmobilized enzymes” , 1-3 CRC Press., Ohio, 146-149

<http://www.genetikbilimi.com/genbilim/enzimler.htm>

<http://www.msxlab.org/>

www.phmetre.com.tr

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



ÖZGEÇMİŞ

19.03.1983 Samsun'da doğdum. 1989-1994 yılları arasında ilköğrenimimi Edirne İstiklal İlköğretim Okulunda tamamladım. 1994 yılında Ortaokul-Lise öğrenimime başladığım Edirne Anadolu Lisesinden 2001 senesinde mezun oldum. 2002 yılında Ege Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesinin Biyokimya bölümünü kazanarak lisans eğitimime başladım. 2007 senesinde lisans eğitimimi tamamladıktan sonra kısa süreli bir iş deneyimim oldu. 2009'da Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı'nda yüksek lisansa başladım.