



YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

BİYOMÜHENDİSLİK BÖLÜMÜ

BİYOMÜHENDİSLİK LABORATUVARI – II

BYM4242

LABORATUVAR FÖYÜ

2022-2023 BAHAR



ÖNSÖZ

YTÜ Biyomühendislik Bölümü'nde, Biyomühendislik Laboratuvarı I ve Biyomühendislik Laboratuvarı II, 7. ve 8. yarıyıllarda zorunlu ders olarak yer almaktadır. Biyomühendislik Laboratuvarı II kapsamında hazırlanan bu deneyler, 8. yarıyıda Bölüm Öğretim Üyeleri koordinatörlüğünde yürütülmektedir.

Dersin amacı, öğrencilere Biyomühendislik eğitimi boyunca, teorik olarak aldıkları meslek dersleri için seçilmiş deneyler ile uygulama yaptırmak, elde edilen sonuçları tartışarak değerlendirmektir.

Biyomühendislik Laboratuvarı II dersini alan tüm öğrencilerimize başarılar dileriz.

Biyomühendislik Öğretim Elemanları adına,
Prof. Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN

ÇALIŞMA YÖNERGESİ

CLASS ID: 38116794
CLASS ENROLLMENT KEY: BYM4242GR1

- Raporlar en geç deneyden sonraki hafta Salı günü 23:59'a kadar Turnitin sistemine yüklenmelidir.
- Her gruptan sadece bir üye kayıt yapmalı ve final raporunu yüklemelidir. 'Your First Name' sekmesine TR/Grup numarası yazılmalıdır. 'Your Last Name' sekmesine ise deney adı yazılmalıdır. Bu sekmelere öğrenci isim soy ismi yazılmamalıdır!!
- Turnitin intihal oranı %30'un üzerinde olan raporların bir kere revize edilme hakkı vardır. Revize sonrası intihal oranı %30'un altına düştüğünde raporun intihal bölümü 50 puan olarak değerlendirilecektir. Turnitin benzerlik oranı %30'un üzerinde olan grup revize için laboratuvar koordinatörü ile iletişime geçmelidir.
- İntihal oranı %20-30 arasında ise raporun intihal bölümüne 75 puan verilecektir.
- İntihal puanı %20'nin altında ise raporun intihal bölümüne 100 puan verilecektir
- Raporlar Turnitin sistemine ön kapağı silinmeden yüklenmelidir. Sisteme geç yüklenen raporlardan puan kırılacaktır.
- Raporlar laboratuvar koordinatörüne e-mail ile, yazılı çıktıları ise deneyden sorumlu asistana deneyden sonraki Çarşamba günü teslim edilmelidir.
- Her geç teslim için raporlardan 10 puan kırılacaktır.

BAŞARI VE DEĞERLENDİRME DURUMU

Yıl İçi Değerlendirme : % 30

Yıl İçi Sınavı : %30

Yıl sonu sınavı : %40

Yarıyıl boyunca 5 deney ve 1 tasarım deneyi yapılacaktır. Bütün deneylere katılmak zorunludur.

- Çevrimiçi derse zamanında katılınız.
- Deney sonuçları ve yapılan hesaplamalar ayrıntılı ve belirgin bir şekilde, her grup tarafından tek bir grup raporu halinde bir sonraki laboratuvar gününe kadar bilgisayarda yazılmış olarak hazırlanıp sorumlu araştırma görevlisine teslim edilecektir.
- Öğrenciler deneyin her aşamasından sorumludur ve raporlara konulan her şey sorulabilir.

LABORATUVAR TAKVİMİ

HAFTA	TARİH	KONULAR
1	1 Mart	Öğrencilerle Tanışma ve Derse Giriş Toplantısı / Mühendislik Uygulamalarına Yönelik Standartların Sunumu
2	8 Mart	Deney 1
3	15 Mart	Deney 2
		Deney 1 Rapor Teslimi
4	22 Mart	Deney 3
		Deney 2 Rapor Teslimi
5	29 Mart	Deney 4
		Deney 3 Rapor Teslimi
6	5 Nisan	Deney 5
		Deney 4 Rapor Teslimi
7	12 Nisan	Telafi Deneyleri
		Deney 5 Rapor Teslimi
8	19 Nisan	VİZE HAFTASI
		Post-Quiz
9	26 Nisan	Tasarım Deney Föylerinin Teslimi
		Telafi Deney Rapor Teslimi
10	3 Mayıs	Tasarım Deneyleri
11	10 Mayıs	Tasarım Deneyleri
12	17 Mayıs	Tasarım Deneyleri
13	24 Mayıs	<u>Tasarım Deney Raporunun Teslimi için Son Tarih</u>
14	31 Mayıs	Tasarım Deney Sunumları
15	-	FİNAL SINAVI

DENEYLER VE SORUMLU ÖĞRETİM ELEMANLARI

Deney No	DENEY ADI	DENEY SAATİ	SORUMLU ÖĞRETİM ELEMANLARI	E-posta
1	Plazmid DNA İzolasyonu ve Spektral Analizi	13.00	Arş. Gör. Başak AKIN (Laboratuvar Koordinatörü)	basakakin00@gmail.com
2	Üre Biyosensör Yapımı ve Uygulaması	13.00	Arş. Gör. Muhammet ÇELİK	mcelik@yildiz.edu.tr
3	Termokimyasal Dönüşüm ile Biyoyakıt Eldesi	13.00	Arş. Gör. Gülcan Ayşın KARACA	gakaraca@yildiz.edu.tr
4	Işık Saçılması Yöntemi ile Proteinlerde Boyut ve Zeta Potansiyel Analizi	13.00	Arş. Gör. Eda Nur YETİŞKİN MORKAN	yetiskinedaa@gmail.com
5	Biyoreaktörde Maya (<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>) Üretimi	13.00	Arş. Gör. Beyza KARACAOĞLU	beyzak@yildiz.edu.tr
-	Tasarım Grup 1	-	Arş. Gör. Eda Nur YETİŞKİN MORKAN	yetiskinedaa@gmail.com
-	Tasarım Grup 2	-	Arş. Gör. Gülcan Ayşın KARACA	gakaraca@yildiz.edu.tr
-	Tasarım Grup 3	-	Arş. Gör. Mustafa NİĞDE	mnigde@yildiz.edu.tr
-	Tasarım Grup 4	-	Arş. Gör. Muhammet ÇELİK	mcelik@yildiz.edu.tr
-	Tasarım Grup 5	-	Arş. Gör. Ayça ASLAN	aslaanayca@gmail.com
-	Tasarım Grup 6	-	Arş. Gör. Ayça ASLAN	aslaanayca@gmail.com
-	Tasarım Grup 7 (İşletmede Mesleki Eğitim)	-	Arş. Gör. Selcan AKAR	sakar@yildiz.edu.tr

TASARIM DENEYİ TAKVİMİ

Hafta	Çalışmalar
4	Problem ve Konu Belirleme, Sorumlu Asistana Bildirme
5	Belirlenen Konuyu Sorumlu Asistana Onaylatma
9	Deney Föyü Gönderimi
10-12	Tasarım Deneyi Gerçekleştirme
13	Tasarım Deneyi Sonuç Raporu Gönderimi
14	Tasarım Deneyi Sunumları

DENEY GRUPLARI

GRUP NO	ÖĞRENCİ NO	AD	SOYAD
1	18056009	DİLARA	ACIYAN
	18056027	BUKET HAZAL	AĞYÜZ
	18056064	ZEYNEP	AKBOSTANCI
	18056025	DOĞA İREM	AKTAŞ
	19056702	ŞAZİYE	ALAN
	18056043	İREM	ALTINTAŞ
	21056603	RABİA	ARMAĞAN
	19056901	SARA	ARNAVUT
	18056023	PELİN	ASLAN
	18056006	ZENNÜRE	AŞAM
	21056601	AYŞEGÜL	ATAK
	16056035	ÖMER	ATASOY
	20056601	BÜŞRA	ATICI
	18056022	ÖZGE ECE	AYDOĞAN

GRUP NO	ÖĞRENCİ NO	AD	SOYAD
4	19056043	BERFİN ŞARA	İBEK
	18056034	HANDE YAREN	KAHRAMAN
	19056006	SELİN	KÂNOĞLU
	18056055	MERT BERKAY	KARAAĞAÇ
	18056031	BUSE	KELEŞ
	19056067	CEREN	KESKİN
	20056604	ELİF	KILIÇ
	18056021	ÖZGE	KIR
	20056612	ECEM	KIZILDAĞ
	18056019	YAREN	KONAK
	19056012	ECEM	KÖMÜRLÜ
	20056605	İREM	KÖSE
	18056045	ALPAY	KÖSE
	18056024	GÖZDE SULTAN	MAMATİ

2	18056003	DİLAN	AYYILDIZ
	18056004	RUMEYSA	BAĞGÜL
	18056054	İREMNAZ	BANDIRMA
	19056025	ALEYNA	BAŞARAN
	18056014	ELİF SENA	BEDİR
	19056013	BUSE	BIYIKLI
	19056032	SİBEL	BİÇER
	18056056	GAMZE	BÖLÜKBAŞI
	18056013	ESMAHAN	ÇAĞLAR
	17056009	DENİZ	ÇAKMAK
	19056051	AYÇA	ÇAPA
	18056058	BEYZA	ÇAY
	19056011	ZEYNEP İKLİL	ÇEB
	18056063	NİSANUR	ÇELİK

5	19056905	NİLAY	MUTLU
	18056066	CYRILLE MESUE	NJUME
	19056063	MERVE	ORHAN
	18056015	İLAYDA DERYA	ORTULOĞLU
	20056614	ELİF YAĞMUR	ÖKCÜN
	18056047	BUKET	ÖNDER
	19056058	MELİSA	ÖZKAN
	20056603	NAFİYE ECE	ÖZTAŞ
	18056028	FATMA NUR	PEHLİVAN
	20056905	SHAM	RAI
	17056033	YUSUF MERT	SABRİOĞLU
	18056007	ÖZNUR	SAFGÖL
	18056008	RUMEYSA	SARAÇ
	18056046	AYŞENUR	SUNGUR
	19056049	AHMET ENES	ŞİMŞEKER

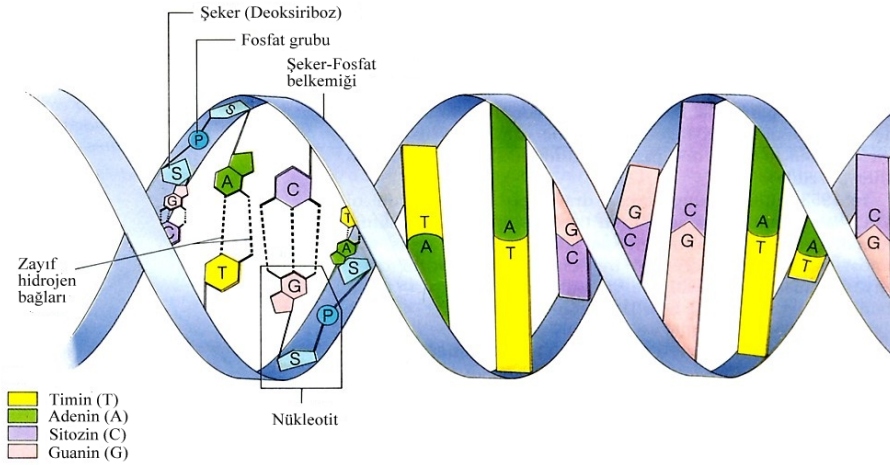
3	18056702	ŞEYMA NUR	ÇİFTÇİ
	18056053	İLKNUR	DANIŞ
	20056006	MERVE	DEMİR
	19056607	MUHAMMET ALPER TUĞRUL	DEMİR
	19056072	MELİSA	DEMİRCİ
	18056016	EBRAR	DEMİROĞLU
	19056909	MERYEM	GAZAL
	19056030	İLAYDA	GENÇER
	18056049	EMİNE HASRET	GÜL
	19056053	MİNA	GÜNER
	Ç18028053	GÖRKEM	GÜNGÖR
	18056051	ATAKAN	GÜNGÖR
	18056052	DÖNE KARDELEN	GÜRBÜZ

6	20056051	ARZUM	TEKİN
	18056012	BERAY	TEKİNCAN
	19056061	FATİH MUSTAFA	TOKÖZ
	19056052	ZİŞAN	TOPRAK
	18056026	TUĞÇE	TÜTEN
	18056011	RANA BEGÜM	UÇAR
	18056061	SİTARE NAZ	UZUN
	18056501	ATAKAN	ÜNLÜ
	19056066	MUSTAFA	ÜNLÜ
	19056017	SEREN	YALIN
	19056044	SERAY	YELDEN
	18056041	ŞEYMANUR BERAT	YENİ
	22056603	EMİNE	YILDIZ
	19056069	SILA	YILMAZ

7	18056039	KARDELEN	AKILLI
	19056608	CEREN	ALİCİKOĞLU
	18056029	MELİSSA	ATILA
	19056070	EZGİ	NAMAZCI
	20056602	ELİF NUR	TEKİN

DENEY 1: PLAZMİD DNA İZOLASYONU VE SPEKTRAL ANALİZİ

Bir DNA molekülü 5 karbonlu şekere bağlı bir fosfat grubu ve azotlu bazlardan meydana gelen nükleotit adlı yapıtaşlarından oluşmuş, çift sarmal oluşturan bir moleküldür. Bu karbonlar 1'-5' numaralı olacak şekilde düzenlenmiştir. DNA'da birbirinden farklı 4 tip nükleotit bulunur. Bunlardan ikisi olan guanin ve adenin ikili halkasal yapıya sahip pürinler, diğer ikisi sitozin ve timin ise tekli halkasal yapıya sahip pirimidinlerdir. Bir DNA molekülünde nükleotitler özel bir sıra ile dizilirler. Şekerler birbirine, birinin 3' karbonu ile diğerinin 5' karbonunu birleştiren fosfat grupları ile bağlanırken, azotlu bazlar zincire yan grup olarak bağlanırlar. DNA molekülünün çift iplikli yapısı da azotlu bazlar arasındaki hidrojen bağları ile bir arada tutulur. Bu tip bir bağlanma sadece sitozin ile guanin ve timin ile adenin arasında oluşur. Böylece bir zincirdeki baz dizilimi diğerinin tamamlayıcısı, yani komplementeri olur. İki zinciri polaritesi birbirine zıttır; her biri 5'-3' yönünde dizilirken doğrultuları birbirine tam aksi yöndedir. Sonuç olarak merdiven benzeri çift zincirli molekül, çift sarmal şeklinde kıvrılır ve aradaki hidrojen bağları ile stabilize edilir. Nükleotit merdivenlerinin basamakları arasındaki bu bağlar proteinlerin alfa-heliks yapısını stabilize eden bağlarla analogtur.



Şekil 1. DNA yapısının şematik gösterimi

Genetik bilginin DNA tarafından taşındığının kabul edilmesinden sonra çalışmalar, DNA yapısının aydınlatılması ve bu molekülde depolanan bilginin gözlenebilir bir fenotip oluşturmak üzere ifade edilme mekanizması üzerine odaklanmıştır. Sonraki yıllarda bu başarılmış ve araştırmacılar, DNA moleküllerini izole ederek özgül bölgelerini çoğaltmayı öğrenmişlerdir. Böylece rekombinant DNA teknolojisi çağının yolu açılmıştır.

Genetik mühendisliği alanında yapılan çalışmalarda total hücre DNA'sı, faj DNA'sı ve plazmid DNA olmak üzere üç tip DNA molekülünden yararlanılmaktadır. Plazmitler, bakteri hücreleri içinde doğal olarak bulunan, bağımsız olarak replike olabilen, bakteri kromozomunun dışında, çift zincirli DNA molekülleridir. İlk geliştirilen vektörler, genetik olarak değişikliğe uğratılmış plazmitlerdir ve hala klonlama için yaygın olarak kullanılmaktadır. Plazmidlerin rekombinant DNA teknolojisi çalışmalarında taşıyıcı DNA (vektör) olarak geniş çapta kullanılması plazmid izolasyon yöntemlerinin geliştirilmesine yol açmıştır.

Genel olarak DNA izolasyon yöntemlerinde birbirini izleyen üç temel aşama bulunmaktadır. Bu aşamalar yüksek molekül ağırlıklı DNA'nın ortaya çıkması amacıyla hücrelerin **lizis solusyonu** yardımıyla **parçalanması**, **denatürasyon** veya **proteoliz** ile **DNA-protein kompleksinin ayrılması** ve **DNA'nın çözünür duruma getirilmesi**, **DNA'nın basit enzimatik ve/veya kimyasal**

yöntemlerle proteinler, RNA ve diğer makro moleküllerden ayrılması basamaklarından oluşmaktadır. Plazmid DNA izolasyonunda ise en sık kullanılan yöntemlerden biri Metot I olarak verilen Birnboim ve Doly tarafından geliştirilen **alkalin lizis yöntemi**dir (Birnboim HC, Doly J; 1979). Bu metod temel olarak sodyum hidroksit ve sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi kimyasallar kullanılarak bakterinin parçalanması ve nötralize edilmesiyle bakteri kromozomal DNA'sının ve diğer yüksek molekül ağırlıklı hücre komponentlerinin seçici olarak çöktürülmesini sağlar. Bu şekilde diğer hücresel bileşenlerden ayrılan plazmid DNA izopropanol ile izole edilir. Bunun yanı sıra daha hızlı, basit ve verimi yüksek çeşitli plazmid DNA izolasyon yöntemleri de bulunmaktadır. Metot II olarak plazmid DNA izolasyonu aşağıda ek olarak verilmiştir.

Deneyin Amacı:

Bakteri kültüründen alkalın lizis yöntemi ile plazmid DNA izolasyonu yapılması ve spektrofotometrik yöntem ile DNA miktar tayini yapılmasıdır.

Deney Öncesi Araştırılması Gereken Sorular:

- Plazmid DNA izolasyonu dışında, diğer DNA izolasyon yöntemleri hangileridir, Açıklayınız.
- Genel olarak tüm DNA izolasyon yöntemlerinde bulunan temel aşamalar nelerdir?
- Plazmid DNA ve genomik DNA arasındaki farklar nelerdir?
- DNA'nın miktar tayini için kullanılan yöntemleri açıklayınız.

MATERYALLER

Bakteri Kültürü

Deneyde klonlanması hedeflenen geni içeren plazmid DNA'ya sahip *E.coli* bakteri kültürü kullanılacaktır. Bakteri kültürü bir gece (veya 24 saat) geliştirilmiş sıvı besi yeri içerisinde inkübe edilerek çoğaltılacaktır.

Solüsyon I:

50 mM glikoz
25 mM TrisCl (pH 8.0)
10 mM EDTA (pH 8.0)

Solüsyon II:

0.2 N NaOH
%1 (wt/vol) sodyum dodesil sülfat (SDS)
3 M potasyum asetat (pH 4.8)
İzopropanol
Etanol
dH₂O

Cihazlar

Mikrosantrifüj, UV spektrofotometre, otomatik mikropipet

Sarf malzemeler

Steril mikropipet uçları, 1.5 ml mikrosantrifüj tüpleri, beher, falkon tüp

Ön Hazırlık

Buz banyosu (veya buz dolu bir strafor kutu) önceden hazırlanmalıdır.

METOD

Bu metoda göre plazmid DNA, bir alkalın liziz yöntemi kullanılarak ekstrakte edilir (Birnboim ve Doly, 1979).

1. *E.coli* içeren ependorf tüp buz üzerine alınır ve I. Solüsyondan 100 µL [50 mM glikoz, 25 mM TrisCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)] eklenerek süspanse edilir.
2. Hücreler 4 dakika boyunca 200 µL II. Solüsyonu (liziz solüsyonu) [0.2 N NaOH, %1 SDS] ile muamele edilir.
3. 150 µL soğutulmuş 3 M potasyum asetat ile nötralize edilir.
4. Örnekler, 4°C'de 10 dakika 14,000 rpm'de santrifüjlenir.
5. Plazmid içeren süpernatant **eşit hacimde** izopropanol ile karıştırılır ve -20°C'de 15 dakika inkübe edilir.
6. Örnekler 14,000 rpm'de 30 dakika 25°C'de santrifüjlenir.
7. Süpernatant çıkarılır ve pelete 500 µL %70 etanol ilave edilir ve 25°C'de 5 dakika 14,000 rpm'de santrifüjlenir.
8. Pelet, 50 µL dH₂O içinde yeniden süspanse edilir.
9. İzole edilen plazmid DNA'nın miktar tayini gerçekleştirilir.

Plazmid DNA'nın Miktar Tayini

İzole edilen plazmid DNA'nın miktar tayini için UV spektrofotometre kullanılarak ölçüm yapılır. Çift zincirli DNA molekülleri için, 1 optik dansitenin (OD) 50 µg/ml ye karşılık geldiği bilinmektedir. Buna göre çift zincirli DNA için miktar belirlenmesinde aşağıdaki formül kullanılır:

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{sulandırım oranı} \times 50$$

Solüsyon içindeki protein ve RNA kontaminasyonu hakkında yorumda bulunabilmek için $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ oranı kullanılır.

Bu oran > 1.8 ise RNA kontaminasyonu,
< 1.8 ise Protein kontaminasyonu,
≈ 1.8 ise kontaminasyonun olmadığı şeklinde bir yorum yapılabilir.

Sonuç Raporunda Olması Gerekenler:

- DNA miktar tayininde neden 260 nm'deki absorpsiyon değerinin ölçüldüğünü yorumlayınız.
- UV spektrofotometre ile miktarını tayin ettiğiniz DNA'nın saflığını yorumlayınız.
- UV spektrofotometre haricinde bir yöntem ile DNA miktarını tespit etmek isteseydiniz, hangi yöntemi seçerdiniz, açıklayınız.
- Ortaya çıkan deneysel hataların nereden kaynaklanabileceğini ve nasıl düzeltilebileceğini tartışınız.
- Deney sonuçlarının tekrarlanabilirliği ve doğruluğunu saptamak isteseydiniz ne yapmanız gerekirdi tartışınız.

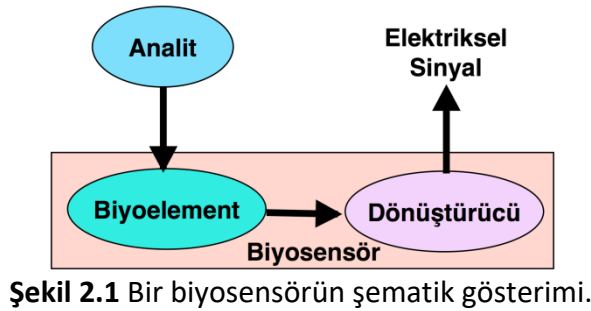
Kaynaklar

- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7(6), 1513-1523.
- Carpenter, T. A., Colebrook, L. D., Hall, L. D., & Pierens, G. K. (1993). Application of gradient-selective COSY and double-quantum filtered gradient-selective COSY experiments to carbohydrates: 2-deoxy-d-arabino-hexose ("2-deoxy-d-glucose"). *Carbohydrate research*, 241, 267-272.
- Domenico, P., Marx, J. L., Schoch, P. E., & Cunha, B. A. (1992). Rapid plasmid DNA isolation from mucoid gram-negative bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(11), 2859-2863.
- Takahashi, S., & Nagano, Y. (1984). Rapid procedure for isolation of plasmid DNA and application to epidemiological analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 10(1), 13-16.

DENEY 2: ÜRE BİYOSENSÖR YAPIMI VE UYGULAMASI

Teorik Bilgi ve Deneyin Amacı:

Biyosensörler, 1962 yılında Leland C. Clark tarafından ilk enzim elektrotunun geliştirilmesinden günümüze kadar tıp, ilaç, ziraat, biyoteknoloji, askeri uygulamalar ve biyoterörizm saptama gibi birçok alanda oldukça yaygın olarak kullanılmıştır. Basitçe bir biyoelement ve sensör elemanından oluşan cihazlar olan biyosensörler genel anlamıyla şu şekilde tanımlanabilir: Biyolojik moleküllerden üretilmiş tanıma birimi sayesinde kimyasalları spesifik (özgün) olarak algılayan, algılanan kimyasal bilgileri anlamlı elektriksel bilgiye çeviren bir dönüştürücüyle (transducer) eşleştirilerek elde edilen ve bu sayede kompleks biyokimyasal parametreleri kantitatif olarak belirleyebilen cihazlardır (Şekil 2.1).



Diğer bir deyişle içerdiği biyolojik malzeme ile analizi yapılacak maddenin etkileştirilmesiyle elde edilen, sonucu kantitatif olarak yorumlayıp anlamlı hale getiren cihazlardır. İçerdiği biyolojik malzemeye ve sensör türüne göre iki şekilde sınıflandırılmaktadır. İçerdiği biyoelemente göre enzim temelli, antikor temelli, nükleik asit temelli, doku temelli, mikrobiyal (hücre temelli) ve polisakkarit temelli olarak sınıflandırılabilir. Bu biyolojik malzemeler, biyosensörlere fiziksel ve kimyasal yolla birçok farklı şekilde tutturulabilmektedir.

Sensör kısmına göre ise voltametrik (elektrik potansiyeli ölçen), amperometrik (elektrik akımı ölçen), konduktometrik (elektrik iletkenliği ölçen), empedans ölçen, optik (ışık şiddeti ölçen), kütle ölçen, termometrik (sıcaklık ölçen) ve viskozite ölçen biyosensörler olmak üzere pek çok biyosensör türü vardır.

Biyosensörlerin çalışması sırasında ilk önce substratın çözelti içerisinde biyosensör yüzeyine taşınması gerçekleşir. Substratın taşınması difüzyon, karıştırma vb. gibi çeşitli şekillerde olabilir. Substrat biyokatalizörün aktif bölgesine difüzlenir. Biyokatalizör polimerik gözenekli membrana (selülozik diyaliz membranı gibi) emdirilmiş veya algılayıcı ile polimerik membran (selofan, selüloz asetat/nitrat, polivinil alkol, poliüretan vb) arasına sandviç edilmiş veya polimerik bir jel içinde hapsedilmiş olabilir. Bu hapsedme işlemi için poliakrilamid, jelatin, kolajen, agaroz vb gibi doğal veya sentetik polimerler kullanılabilir. Biyokatalizör ve substrat arasında reaksiyon meydana gelir. Bu etkileşme sonucu gaz molekülleri (O_2 , CO_2 , NH_3 , vb) salınabilir veya kullanılabilir, seçimli iyonlar oluşabilir. (H^+ , NH_4^+ , diğer tek değerlikli anyon ve katyonlar), ısı ortaya çıkar veya kaybolur, optik yoğunluk değişebilir, elektron salınabilir veya kullanılabilir. Biyokatalizör ve substrat reaksiyonu sonucu oluşan ürün algılayıcı yüzeyine taşınır. Algılayıcı yüzeyinde yukarıda bahsedilen değişimler algılanıp elektriksel devrelerle ölçülebilecek bir boyuta dönüştürülür. Ölçülen elektriksel sinyal analit derişimiyle orantılıdır.

Bu deneyin amacı katı-hal kontakt PVC-NH₂ membranlı NH₄⁺'a duyarlı bir üre biyosensörü yapılışını öğrenmek ve hazırlanan üre biyosensörünün bir uygulamasını gerçekleştirmektir.

Deney Öncesi Araştırılması Gereken Sorular:

- Günümüzde oldukça sık kullanılan biyosensörlerin kullanım alanları nelerdir? Birçok modern komplike cihaza göre avantajları nelerdir?
- Biyosensörler nasıl sınıflandırılır, türlerini açıklayınız?
- Potansiyometre nedir, araştırınız?
- Nernst denklemi nedir, biyosensörlerle ilişkisi nedir?
- Biyosensörlerde biyoelementi tutturmak için bir destek malzemeye ihtiyaç duyulur. Bu destek malzemeler neler olabilir?
- Biyosensörlerde önemli hususlardan biri biyoelementin reaksiyon ortamında kararlı bir şekilde kalması ve biyo-tabakadan ayrılmamasıdır. Biyoelementin biyo-tabakaya tutturulma yöntemleri nelerdir?
- Biyosensörlerin bir diğer avantajı da oldukça spesifik (özgün) olarak cevap vermeleridir. Bu spesifikliği sağlayan nedir? Açıklayınız.
- İdeal bir biyosensörde olması gereken özellikler nelerdir, kısaca açıklayınız?
- Enzim esaslı biyosensörlerde enzimler neden immobilize edilir? İmmobilizasyonun getirdiği avantajları açıklayınız?
- Potansiyometrik üre biyosensörde gerçekleşen reaksiyonları yazarak, biyosensörün çalışma prensibini kısaca açıklayınız?

Deneyin Yapılışı:

Deneyde kullanılacak çözelti ve kimyasallar

Solüsyon-1 (% 2.5'lik glutaraldehit çözeltisi):

0.25 g glutaraldehit

9.25 mL su

Solüsyon-2 (0.05 M fosfat tamponu pH 7):

10 mL 0.05 M fosfat tamponu

90 mL su

Solüsyon-3 (üreaz çözeltisi):

1 mg üreaz

20 µL 0.05 M fosfat tamponu (pH 7)

Solüsyon-4 (üre çözeltileri):

0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 M üre çözeltileri.

Deneyde kullanılacak cihazlar ve gereçler

Potansiyometre, referans elektrot (Kalomel elektrot), katı-hal kontakt PVC-NH₂ membran NH₄⁺'a duyarlı elektrot.

Deneyde kullanılacak sarf malzemeleri

Mikropipet, mikropipet uçları, 5 veya 10 mL pipet, puar, deney tüpleri, beherler, Eppendorf tüpleri.

Ön Hazırlık

NH₄⁺'a duyarlı elektrot ve gerekli çözeltiler önceden hazırlanmalıdır.

Metotlar:

Üre biyosensörü aşağıdaki gibi hazırlanır (I. Isildak, 2002):

1. Önceden hazırlanmış katı-hal kontakt PVC-NH₂ membran ile kaplı NH₄⁺'a duyarlı elektrot, üreaz enzim çözeltisinin (Solüsyon-3) içerisine daldırılarak enzim membranın dış yüzeyine uygulanır.
2. Daha sonra elektrot % 2.5'lik glutaraldehit çözeltisine (Solüsyon-1) daldırılarak 15-20 dakika bekletilir.
3. Elektrot soğuk su ile hafifçe yıkanır.
4. Elektrot ikinci defa enzim çözeltisine (Solüsyon-3) daldırılıp çıkarılır ve çapraz bağlanma reaksiyonunun tamamlanması için 15 saat boyunca 4 °C'de bekletilir.
5. Daha sonra elektrot, 0.05 M fosfat tamponu ile yıkanır ve tampon çözeltisi içerisinde 4 °C'de saklanır.
6. Bu şekilde hazırlanan biyosensör, haftalarca kararlı bir şekilde saklanabilir.

Üre biyosensörü için kalibrasyon eğrisinin elde edilmesi:

1. Elde edilen biyosensör ve referans elektrot, elektrik devresi tamamlanacak şekilde potansiyometreye bağlanır ve uçları örnek çözeltiye daldırılır.
2. Potansiyometreden okunan değer kaydedilir ve bu işlem her bir örnek için tekrarlanır. Sensörler yeni çözeltiye daldırılmadan önce her seferinde saf su ile yıkanmalıdır.
3. Ölçüm her bir örnek için 3 kez tekrarlanır.
4. Elde edilen değerler bir tabloya aktarılır ve ölçülen değerlerin ortalaması alınır. Potansiyele (y-ekseni) karşı $-\log[\text{üre}]$ (x-ekseni) grafiği çizilir.

Örnek üre çözeltisinin konsantrasyonunun belirlenmesi:

1. Elektrotlar konsantrasyonu bilinmeyen çözeltinin içerisine daldırılır ve potansiyel okunur.
2. Kalibrasyon eğrisi kullanılarak örnek çözeltinin üre konsantrasyonu belirlenir.

Sonuç Raporunda Olması Gerekenler:

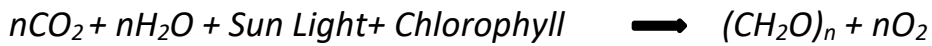
- Potansiyometrik biyosensörlerde ölçüm ve kalibrasyon eğrisi hangi elektrokimyasal prensibe dayanır, açıklayınız?
- Kalibrasyon eğrisinin neden hazırlandığını tartışınız.
- Örnek üre çözeltisinin konsantrasyonu kalibrasyon değerlerinin üst sınırından fazla olsaydı, ölçümü nasıl gerçekleştirirdiniz?
- Örnek üre çözeltisinin konsantrasyonu kalibrasyon değerlerinin alt sınırından az olsaydı, ölçümü nasıl gerçekleştirirdiniz?
- Deneyde her bir standart üre çözeltisinin ölçümü neden 3 kez tekrarlanmıştır. Bu nasıl bir avantaj sağlar.

DENEY 3: TERMOKİMYASAL DÖNÜŞÜMLE BİYİYAKIT ELDESİ

Teorik Bilgi ve Deneyin Amacı:

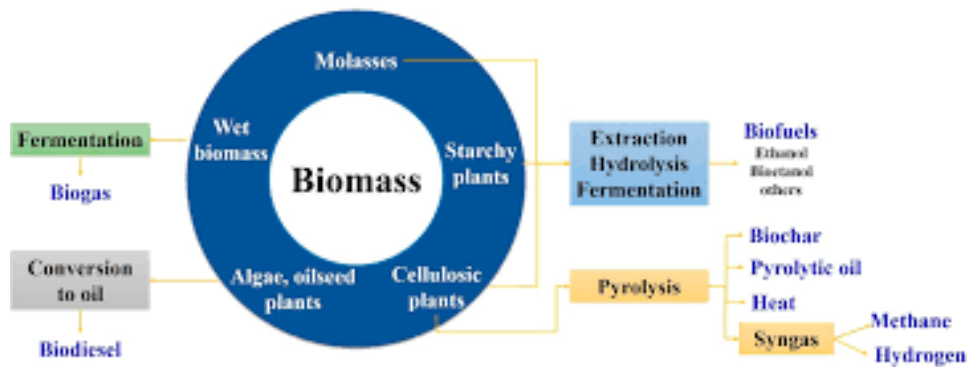
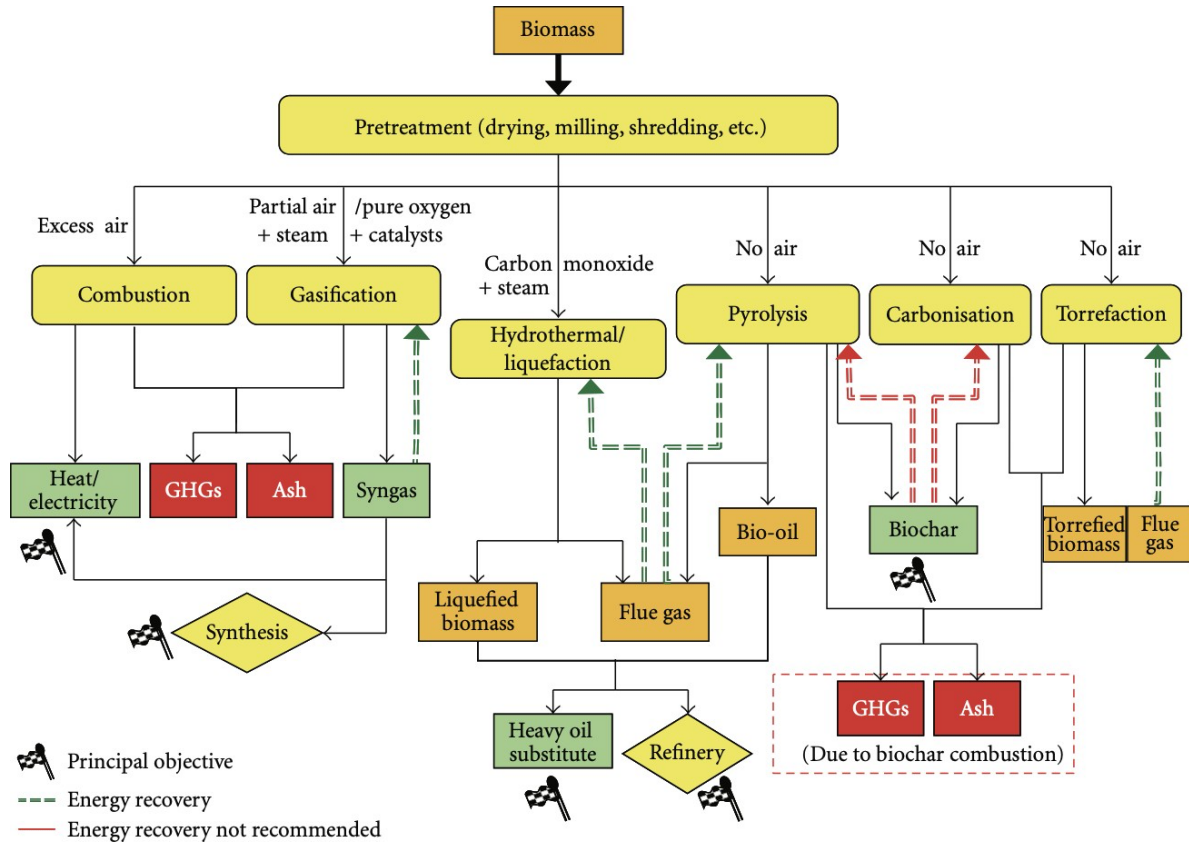
Genellikle temiz enerji olarak adlandırılan yenilenebilir enerji, sürekli yenilenen doğal kaynakları veya süreçleri kullanır. BU kaynaklara güneş enerjisi, rüzgâr enerjisi, hidroelektrikenerjisi, dalga enerjisi, biyokütle enerjisi örnek olarak verilebilir. Bütün bunlardan biyokütle enerjisine bakacak olursak, biyokütle, bitkilerden ve hayvanlardan gelen yenilenebilir organik malzemedir, bu nedenle çok çeşitli kaynaklardan temin edilebilir. Bu kaynaklardan elde edilen enerji ise “Biyokütle Enerjisi” olarak tanımlanmaktadır. Biyodizel, biyogaz, biyokömür gibi biyoyakıt kaynaklarının belirlenmesi ve kullanılması, fosil yakıtların çevresel etkisini potansiyel olarak azaltabilir.

Bitkilerde bu enerji, fotosentez sonrası başta selüloz olmak üzere kimyasallar halinde depolanan Güneş'ten gelir ve çeşitli uygulamalarda kullanılabilir. Güneş enerjisini biyokütle şeklinde depolamak canlı organizmalar için çok önemlidir. Fotosentez ile sadece enerji kaynağıolarak kullanılabilecek organik bileşikler oluşmaz, aynı zamanda solunum için gerekli olan oksijen de atmosfere verilir. Fotosentez yoluyla karbondioksitin organik bileşiklere dönüşmesi,güneş enerjisinin biyokütle şeklinde depolanmasıyla sonuçlanır. Bu adım aşağıdaki denklemdeifade edilmektedir.



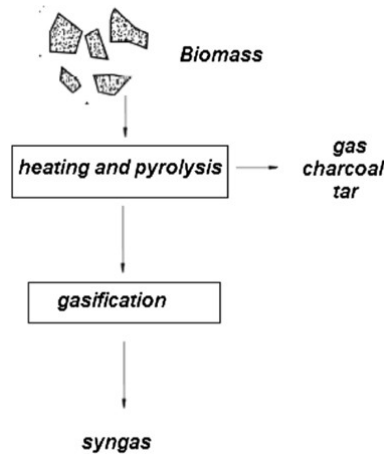
CH₂O yapıtaşı ile gösterilen karbonhidratların oluşumu için yaklaşık 470 kJ enerji depolanmaktadır ve açığa çıkan oksijen sudan kaynaklanmaktadır. Fotosentezin moleküler mekanizması ile ilgili hala yanıtlanamamış pek çok soru bulunmasına karşın, taze biyokütle gelişimi için gerekli olan koşullar bilinmektedir. Bunlar: karbondioksit, elektromanyetik spektrumun görünür bölgesindeki ışık, klorofil katalizörü ve bir canlı bitkidir. Güneş ışığının biyokütle tarafından tutulma veriminin üst limitinin % 8-15 arasında değiştiği tahmin edilmekte; ancak birçok biyokütle türü için bu değerin % 1 veya daha küçük olduğu düşünülmektedir. Selülozik biyokütle, selüloz, hemiselüloz ve lignin gibi üç ana organik bileşen içerir.

Yıllar öncesinde içerdikleri maddelerin/kimyasalların geri kazanılması birçok gelişmiş ülkede gelişen bir endüstriydi. Biyokütle bazı işlemlerle üretilir. Mesela kırma/öğütme, kurutma, paletleme gibi fiziksel süreçlerle katı yakıtlar elde edilebilir. Öte yandan hidroliz fermentasyonu, anaerobik çürütme gibi biyokimyasal süreçlerle sırasıyla biyoetanol ve biyogaz üretilir. Fosil yakıtlara alternatif olarak katı, sıvı ve gaz yakıtlar, biyokütlenin inert atmosfer altında karbonizasyon piroliz, hidrotermal/sıvılaştırma, yakma vb. işlemlerle termokimyasal süreçler ile üretilebilmektedir.



Şekil 4. Biyokütle termokimyasal dönüşüm yolları.

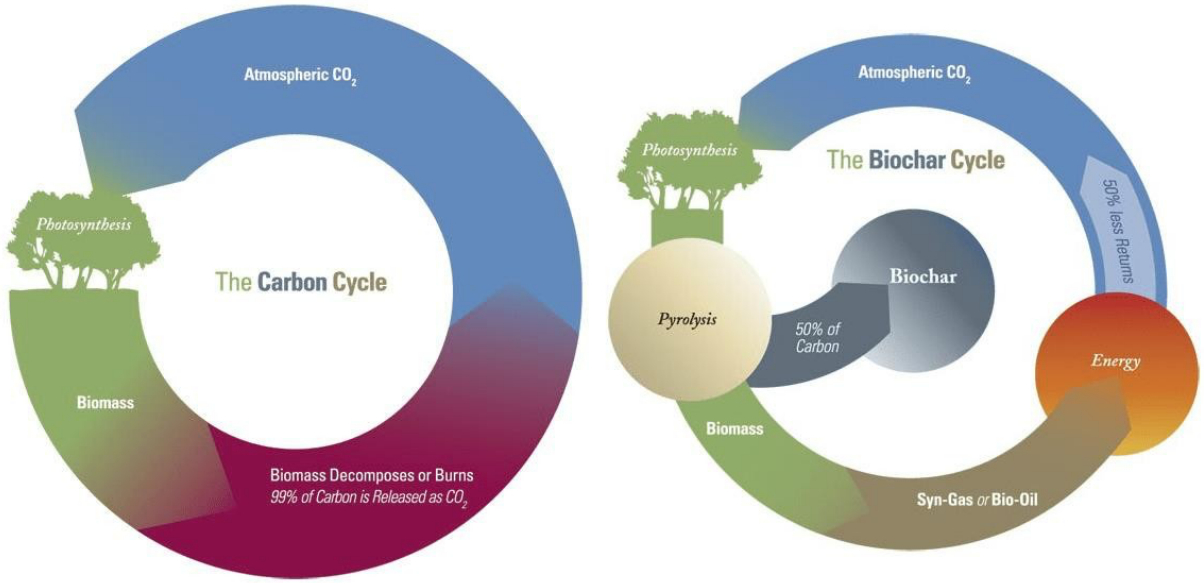
Gazlaştırma, karbon temelli malzemelerin (biyokütle) termokimyasal olarak hava, oksijen, buhar, CO₂ veya bunların bir kombinasyonu gibi gazlaştırıcı bir maddenin varlığında, genellikle sentez gazları (syngas) olarak adlandırılan değerli gazlara 700°C'nin üzerinde sıcaklıklarda dönüştürüldüğü bir işlemdir. Üretilen gaz öncelikle CO, H₂, CO₂ ve CH₄'ten oluşur.



Şekil 5. Biyokütlenin gazlaştırma prosesinin şematik diyagramı.

Piroliz, herhangi bir organik (karbon bazlı) ürüne uygulanabilen termokimyasal bir işlemdir ve bu işlem aracılığıyla biyokütle diğer yakıtlara dönüştürülebilir. Bu işlem sırasında biyokütle oksijen yokluğunda yüksek sıcaklığa maruz bırakılır. Sonuç olarak, biyokütle kimyasal ve fiziksel olarak farklı moleküllere ayrılır. Parçalanma, malzemelerin kimyasal bağlarının sınırlı termal kararlılığı sayesinde gerçekleşir ve bu da ısı kullanılarak parçalanmalarına olanak tanır. Bu termal ayrışma aynı zamanda yeni moleküllerin oluşumuna da yol açar. İşlem sonucunda orijinal kalıntıdan farklı ve genel olarak üstün karakterde ürünlerin elde edilmesi sağlanır. Bu nedenle günümüz endüstrisi önemli bir süreç haline gelmektedir.

Geleneksel olarak, odun kömürü üretimi, insanlık tarafından bilinen ve bugün bile kullanılan en eski kimyasal dönüşüm süreçlerinden biridir. Karbonizasyon, biyokütlenin ısıtıldığı ve yüksek oranda karbon içeren daha basit maddelere dönüştürüldüğü özel bir form olan yavaş bir piroliz işlemidir. Biyokütle kaynaklarından gözenekli karbon oluşumu için karbonizasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Tipik olarak karbonizasyon, biyokütlenin oksijensiz veya oksijenin sınırlı olduğu bir ortamda ısıtılmasından oluşur, aksi takdirde tutuşur ve küle dönüşür. Biyokütle ısıtıldıkça odun kömürüne dönüşme yolunda belirli aşamalardan geçer ve farklı reaksiyonlar sonucunda farklı yapılar oluşur. Reaksiyon koşulları, kömür üretimini en üst düzeye çıkarmak için uyarlanmıştır. Esas olarak odun kömürü (charcoal) üretilir, odun kömürü dışındaki ürünlere genellikle yan ürünler denir. Kısaca karbonizasyon veya piroliz işleminden sonra biochar adı verilen yüksek karbon içerikli ürün elde edilir.

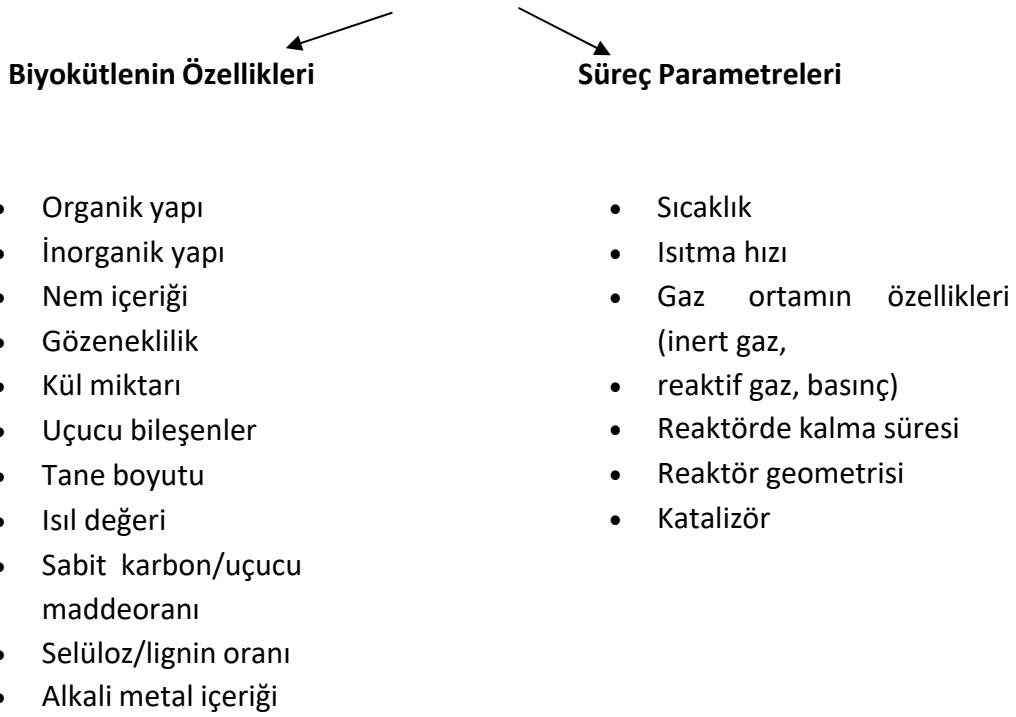


Şekil 6. Karbon ve biyokömür (biochar) döngüsü karşılaştırmasının şematik gösterimi.

Biochar (biyokömür), tarım ve orman atıkları (biyokütle) gibi sürdürülebilir kaynaklardan elde edilen organik maddelerin termokimyasal dönüşümde kontrollü bir süreçte yakılmasıyla elde edilen kömür benzeri bir maddedir. Malzemeler yanarken atmosfere çok az kirletici duman ortaya çıkarır veya hiç çıkarmaz. Bu işlemle organik malzeme, atmosfere kolayca kaçamayan kararlı bir karbon formu olan biyokömüre dönüştürülür. Ek olarak, bu termokimyasal dönüşüm sırasında üretilen enerji veya ısı yakalanabilir ve bir temiz enerji biçimi olarak kullanılabilir. Biochar, karbonu kararlı bir forma dönüştürmekte çok daha verimlidir ve diğer kömür formlarından daha temizdir. Toprak kalitesini güçlendirmek de için kullanılır. Biochar, aşırı derecede tükenmiş topraklar, kıt organik kaynaklar, yetersiz su ve kimyasal gübre kaynaklarına sahip alanlarda gıda güvenliğini ve ekili arazi çeşitliliğini artırmak için önemli bir araç olarak kullanılabilir. Bu sayede bitkiler büyürken gerekli besin maddelerineve suya daha kolay ulaşırlar. Ayrıca biochar üretimi sırasında ortaya çıkan yenilenebilir enerjinin ısısı ve taşıyıcıları geri kazanılarak enerji kaynağı olarak kullanılabilmekte veya bu enerji ihtiyacı olan yerel topluluklara verilmektedir.

Biyokütlenin karbonizasyonu ve pirolizi, aşağıdaki şekilde şematik olarak özetlenen biyokütleözelliklerinden ve işlem parametrelerinden oldukça etkilenmektedir.

Biyokütle Karbonizasyon ve Pirolizini Etkileyen Parametreler



Şekil 7. Biyokütle Karbonizasyon ve Pirolizini Etkileyen Parametreler

Kullanım Alanları

- Toprak iyileştiricisi ve organik gübre olarak kullanılması
- Hayvan çiftliklerinde kullanımı
- Gazların tutulumu-Aritma/Filtrasyon
- Enerji depolamada kullanımı
- Katalizör olarak kullanımı
- Yapılarda kullanımı
- Adsorbent olarak kullanılması
- Yalıtım ve nem dengeleme

Kısaca özetlemek gerekirse biyokütle, yenilenebilir ve sürdürülebilir bir enerji kaynağıdır. Biyokütlenin pirolizi sonucu biyokömür elde edilir. Bu yolla karbon döngüsü iyileştirilmiş olur. Bu deneyde biyokütle kaynağının termokimyasal olarak bozundurmaya uğratılarak biochara dönüştürülmesi ve oluşan biochar veriminin hesaplanması amaçlanmaktadır.

Deneyin Amacı: Bu deneyde biyokütle kaynağının termokimyasal olarak bozundurmaya uğratılarak biochara dönüştürülmesi ve oluşan biochar veriminin hesaplanması amaçlanmaktadır.

Deney Öncesi Araştırılması Gereken Sorular:

- Biyokütle nedir?
- Biochar nedir, kullanım alanları nelerdir?
- Piroliz nedir?
- Biochar verimini ve kalitesini etkileyen parametreler nelerdir?

Ön Çalışma:

- Hammaddeler etüvde 24 saat, 105°C de kurutulur.
- Deneye başlamadan önce reaktör azot debisi ile inert ortam koşulu sağlanır.

Deneyin Yapılışı:

- Hammaddeler hassas terazide tartılır.
- Tartımı alınmış numuneler reaktöre yerleştirilir.
- Sıcaklık ve azot debisi ayarlanır ve reaktör çalıştırılır.
- İstenilen sıcaklığa gelindiğinde reaktör sabit sıcaklıkta ısıtmada bırakılır ve daha sonra sistem soğutmaya alınır.
- Reaktör soğuduktan sonra azot kapatılır ve numuneler reaktörden çıkarılır.
- Biocharların tartımı alınır.

Sonuç Raporunda Olması Gerekenler:

- Biochar verim yüzdesini hesaplayınız.
- Biochar verim-sıcaklık grafiği çiziniz.
- Elde edilen biyochar verimleri literatürdekilerle karşılaştırınız.
- Elde edilen sonuçlara göre biyokütlenin içeriği hakkında yorum yapınız.

DENEY 4: IŞIK SAÇILMASI YÖNTEMİYLE PROTEİNLERDE BOYUT VE ZETA POTANSİYEL ANALİZİ

Teorik Bilgi ve Deneyin Amacı

Proteinler, çok sayıda amino asidin birbirlerine kovalent olarak bağlanmasıyla oluşan ve biyolojik sistemlerde spesifik işlevleri yerine getiren makromoleküllerdir. Proteinlerin en önemli rolleri, enzim olarak kimyasal reaksiyonları katalizlemeleridir. Ayrıca hücre sinyalleme, ligand taşıma ile hücre içinde ve dışında önemli yapı malzemeleri olma özellikleri vardır. Bu nedenle proteinlerin araştırılması biyomühendislikte önemli bir yer tutar.

Sentetik ve rastgele dolanmış (*random coil*) doğal polimerlerin aksine, proteinler doğal hallerinde belirli ve kararlı 3 boyutlu yapılara sahiptirler. Proteinler, sadece belirli 3 boyutlu yapılarındayken işlevsel olurlar. Bu yapıların araştırılmasında boyut, yüzey yükü ve denatürasyon noktasını bulmak önemlidir. Bu özelliklerin belirlenmesinde *ışık saçılması yöntemi* yaygın olarak kullanılmaktadır.

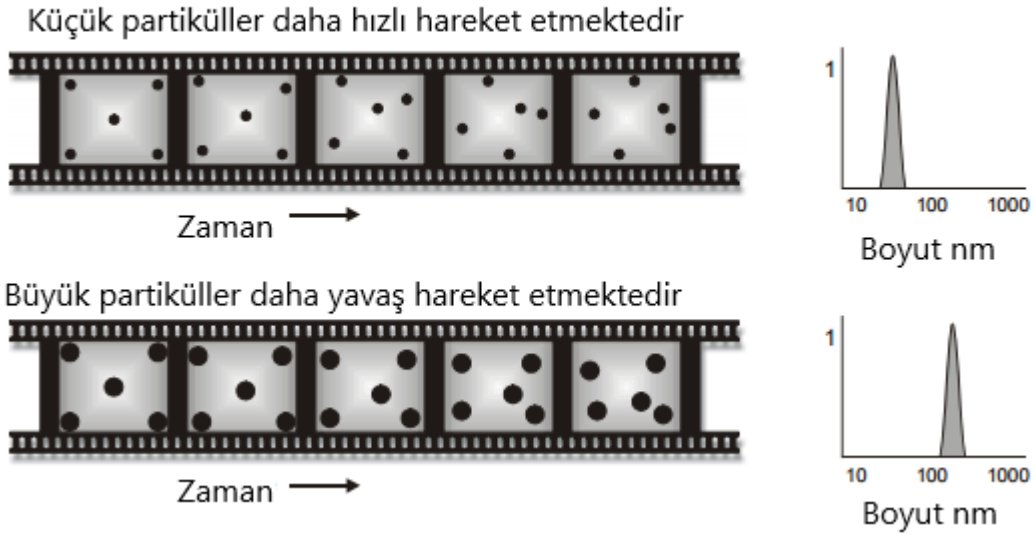
Dinamik ışık saçılması tekniğiyle proteinlerin boyutları ölçülür. Bu teknikte, proteinlerin çözelti içinde yaptıkları Brown hareketinden faydalanılarak önce difüzyon katsayısı, difüzyon katsayısından da boyut bulunur.

Brownian hareketi, bir sıvı ortam içindeki parçacıkların, çevredeki diğer parçacıkların sürekli çarpışmaları sonucu yaptıkları rastgele harekettir. **DLS tekniğinin kullanılabilmesi için Brownian hareketinin varlığı bir şarttır ve Brownian hareketin olmadığı sistemlerde DLS tekniği kullanılamaz!**

DLS tekniğinde, numune üzerine lazer ışığı gönderilir ve numune içindeki parçacıklardan saçılan ışık bir detektör üzerine düşürülür. Işığın şiddeti, detektör üzerinde belli bir anda belli bir değerdedir. Parçacıklar Brownian hareketi sonucu sürekli hareket ettiklerinden, saçılan ışık da sürekli değişir. Saçılan ışığın değişmesiyle girişim sonucu detektör üzerindeki ışık şiddeti de sürekli değişir.

DLS tekniğinde, parçacıkların Brownian hareketinden dolayı yaptıkları hareketi ölçmek için saçılan ışığın detektörde algılanan ışık şiddetinin değişmesine bakılır. Parçacıklar ne kadar küçükse saçılan ışığın şiddetinde görülen değişimler de o kadar hızlı olur.

DLS tekniğinde, ışık saçılmasıyla oluşan ışık şiddetinin zamanla değişmesi ölçülerek ham veri elde edilir. Bu ham veri kullanılarak boyut hesabı yapılır. Boyut hesabı Stokes-Einstein denklemi kullanılarak gerçekleştirilir. Stokes-Einstein denklemi kullanılarak hidrodinamik çap hesaplanır. Bu çap, difüzyon katsayısından hesaplandığından, difüzyonu etkileyen faktörler sonucu da etkiler.



Şekil 1. Küçük ve büyük partiküllerin hareket özellikleri

Elektroforetik ışık saçılması tekniğiyle de proteinlerin zeta potansiyelleri ölçülür. Bu teknikte, yönü sürekli değişen bir elektrik alan altında proteinlerin hızları incelenir ve Doppler kayması etkisinden faydalanılarak bu hız değişimlerinden zeta potansiyelleri ölçülür. Protein erime noktası da (denatüre olunan sıcaklık) boyut ölçümlerinden bulunabilir. Tüm bu özellikler ortamın pH'ından etkilenmektedir.

Bu deneyin amacı, bir proteinin boyut ve zeta potansiyelinin farklı pH değerlerinde nasıl değiştiğini belirlemektir. Sizden beklenen,

- BSA'nın farklı pH'larda boyut ve zeta potansiyel ölçümlerini gerçekleştirmek,
- BSA'nın izoelektrik noktasını da göz önüne alarak, boyut ve zeta potansiyelin pH ile ilişkisini incelemek,
- Farklı pH'lardaki zeta potansiyel ölçümlerinden BSA'nın izoelektrik noktasını bulmak,
- Deney sürecinizi yazılı rapor halinde sunmaktır.

Deney Öncesi Araştırılması Gereken Sorular:

1. Brown hareketi nedir?
2. Dinamik ışık saçılması nedir?
3. Işık saçılmasıyla gerçekleştirilen boyut ölçümlerinde elde edilen şiddet (intensity) ve hacim (volume) dağılımları ne demektir?
4. Eşdeğer küre teoremi nedir?
5. Doppler kayması nedir?
6. Elektroforetik ışık saçılması nedir?
7. Zeta potansiyeli nedir?
8. Protein denatürasyonu hakkında ne biliyorum?
9. BSA'nın izoelektrik noktası kaçtır?
10. BSA'nın erime noktası kaçtır?

Deneyin Yapılışı:

Deneyde, Malvern marka Zetasizer Nano ZS cihazı kullanılacaktır. Cihazda, 4 mW gücünde 632,8 nm dalgaboylu He-Ne lazeri ve ışığın geri saçılmasının ölçümü için 173°'de detektör bulunmaktadır. Boyut ve zeta potansiyel ölçümleri 25 °C'de gerçekleştirilecek, dispersant viskozitesi, kırılma indisi ve dielektrik sabiti için cihaz yazılımındaki su değerleri seçilecektir.

Deneyde aşağıda adım adım verilen işlemler yapılarak boyut, zeta potansiyeli ve erime sıcaklığı ölçümleri yapılacaktır:

1. Cihaz açılarak lazerin kararlı hale gelmesi beklenir.
2. 15,15 μM 'lık 3'er mL fosfat tamponu içinde pH'ı 4,0, 5,0 ve 6,0 olan BSA çözeltileriyle yine 15,15 μM 'lık 5 mL içinde pH'ı 7,0 olan BSA çözeltisi hazırlanır.
3. Örnekler 0,22 μm 'lık filtreden geçirilerek kapiler kuvetlere konur.
4. Kuvet cihaza yerleştirilir ve yazılımdan ölçüm parametreleri girilir.
5. Sırasıyla önce boyut sonra zeta potansiyelleri ölçülür.
6. Ölçümler bittikten sonra kuvetler destile suyla temizlenir.

Sonuç Raporunda Olması Gerekenler:

1. Farklı pH'larda ölçülen boyut değerlerini tablo halinde veriniz. Boyut dağılımlarını da ekleyiniz.
2. Farklı pH'larda ölçülen zeta potansiyel değerlerini tablo halinde yazınız.
3. BSA'nın izoelektirik noktasını da göz önüne alarak pH'ın boyut ve zeta potansiyel üzerine etkisini tartışınız. Deneysel olarak BSA'nın izoelektirik noktasını belirleyin.
4. Çözelti içindeki proteinlerin boyut ve zeta potansiyellerini etkileyebilecek diğer parametreler nelerdir?
5. Deneyden bulunan izoelektirik nokta ile literatürdeki değerlerini karşılaştırınız. Ortaya çıkan deneysel hataların nereden kaynaklanabileceğini ve nasıl düzeltilebileceğini tartışınız.

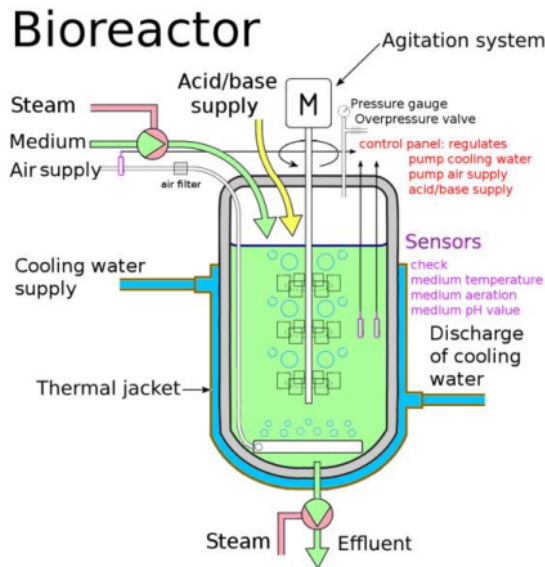
DENEY 5: BİYOREAKTÖRDE MAYA (*Saccharomyces cerevisiae*) ÜRETİMİ

5.1. Deneyin Amacı

Bu deneyin amacı kapalı sistemde çalışan 5 L hacimli bir biyoreaktörde *Saccharomyces cerevisiae* üretmek, gelişim sürecinde örnekler alarak büyüme eğrisi oluşturmak ve büyüme evrelerini gözlemlemektir.

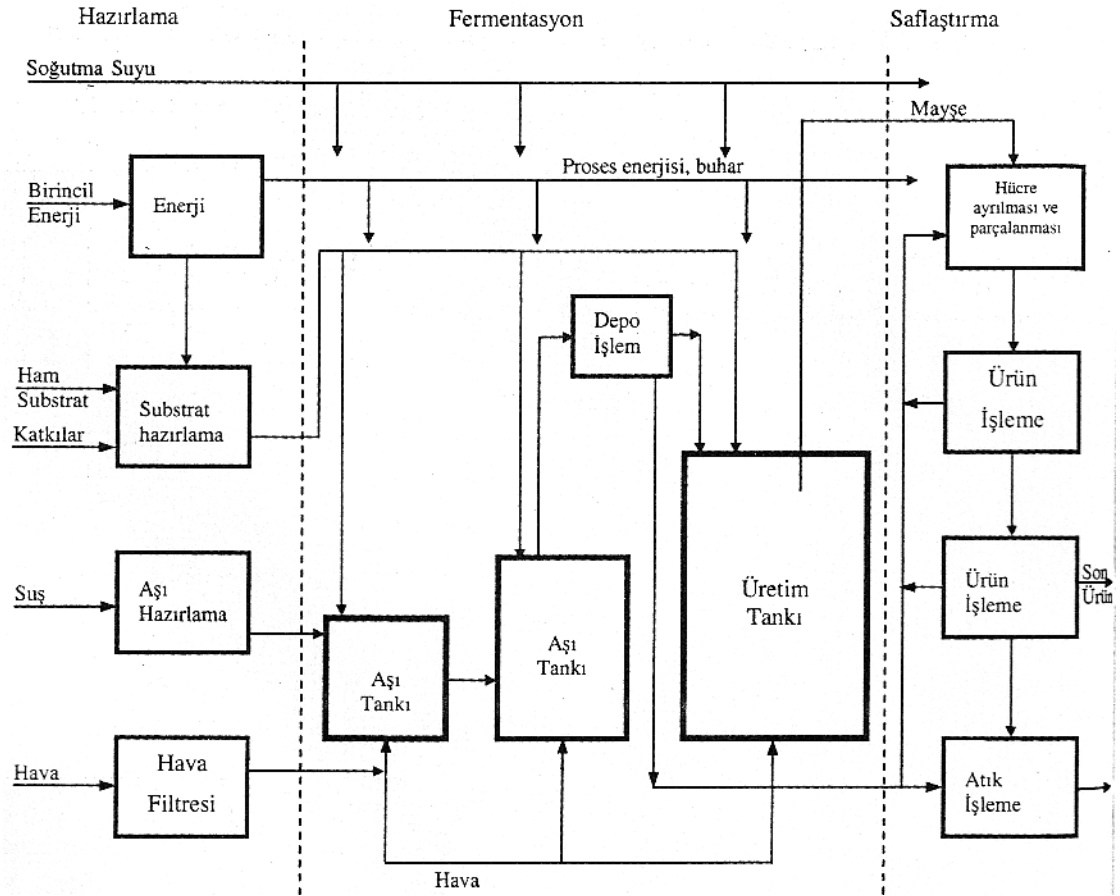
5.2. Teorik Bilgi

Biyoreaktör; içinde kontrollü yöntemlerle organizma (bakteriler, mantarlar, mayalar, vb.) veya ürün üretimi için organizmaların geliştirildiği veya bazı özel durumlarda özgül reaksiyonların yapıldığı tanklardır (Şekil 9). Biyoreaktörler proteinlerin, organik asitlerin, aminoasitlerin, antibiyotiklerin, enzimatik veya mikrobiyal proseslerinde önemli bir role sahiptir. Bu prosesler aerobik veya anaerobik olabilir. Biyoreaktörlerin temel hedefi istenilen ürünün en verimli ve kaliteli şekilde üretilmesi için uygun ortam sağlamaktır. Biyoreaktörün gaz (oksijen, nitrojen, karbondioksit) ve sıvı akış hızları, sıcaklık, pH, substrat ve ürünlerin konsantrasyonu, hücre sayısı ve bileşimi (proteinler ve nükleik asitler), çözünmüş oksijen seviyeleri ve karıştırma hızı gibi çevresel koşulları yakından ve sürekli olarak izlenmeli ve kontrol edilmelidir.



Şekil 9. Biyoreaktör

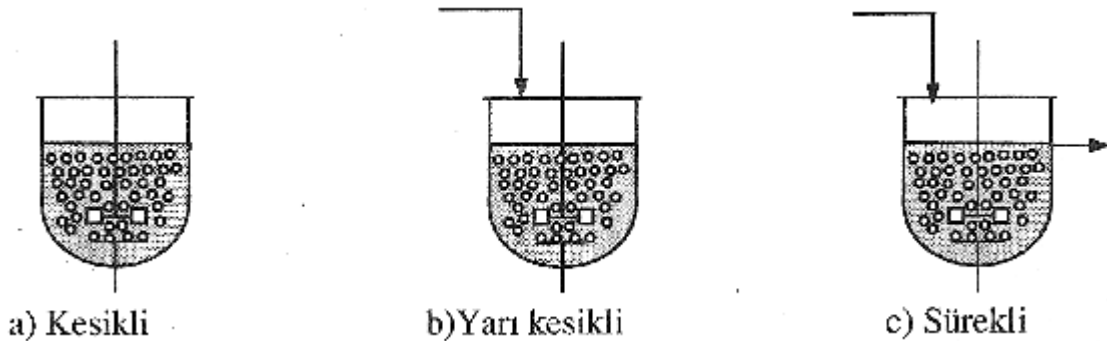
Biyoteknolojik bir proses 3 ana bölümde incelenebilir: hammaddelerin hazırlanması ve ön işlemden geçirilmesi (upstream processing), fermentasyon veya biyolojik reaksiyon (cultivation) ve ayırma ve saflaştırma (downstream processing). Biyoteknolojik bir prosesin genel akış diyagramı Şekil 10'da verilmiştir. Diyagramı oluşturan basamaklardan en önemlisi biyoreaktörlerde mikroorganizmaların üretilmesidir.



Şekil 10. Biyoteknolojik üretim prosesinin genel akış şeması (Schügerl ve Bellgardt, 2000).

5.2.1. Biyoreaktörlerin İşletim Şekilleri

Biyoprosesler besiyerinin reaktöre beslenmesine ve sisteme oksijen verilir verilmemesine bağlı olarak çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir. Besiyerinin akışına bağlı olarak biyoreaktörler kesikli, yarı kesikli ve sürekli olarak temelde 3 gruba ayrılır.



Şekil 11. Biyoproseslerin temel işletim şekilleri.

5.2.1.1. Kesikli Prosesler

Kesikli proseslerde sisteme gelen ve sistemi terk eden besiyeri yoktur. Substratların tamamı başlangıçta reaktöre konur. Az bir miktar biyokütle ile aşılandıktan sonra hücreler üreme için gerekli substratlardan biri tükeninceye kadar veya inhibitör ürünler üremeyi durduruncaya kadar çoğalmaya devam eder. Küçük ölçekli işlemlerde, tam olarak geliştirilmemiş yeni prosesleri test etmek, çok pahalı ürünlerin üretimi ve sürekli işlemlerle dönüşümü zor olan proseslerde kesikli reaktörler kullanılır. Ayrıca bu reaktörler yüksek substrat derişimlerinin istenen biyolojik reaksiyon üzerine olumsuz etkisinin olmadığı ve ürün miktarının az olacağı durumlarda kullanılabilir. Kesikli reaktör, girdinin uzun süre reaktörde kalması ile elde edilen yüksek dönüşüm üstünlüğüne sahiptir ve proses kontrolü için az emek gerekmektedir. Ancak aynı zamanda yükleme başına yüksek işçilik maliyeti, ürünlerin yüklemekten yüklemeye ürün değışkenliği ve büyük ölçekli üretim zorluğu gibi dezavantajlara sahiptir.

5.2.1.2. Yarı Kesikli Prosesler

Reaktöre sürekli besiyeri beslenir, fakat ortamdan uzaklaştırılmaz. Yani reaktörde sıvı hacmi sürekli artar. Yarı kesikli proses, substrat derişiminin ortamda düşük olması gerektiği durumlarda kullanılır. Biyokütle derişimi sürekli olarak artar ve biyolojik reaksiyonun hızı kesikli prosesin aksine besleme hızı ile kontrol edilir.

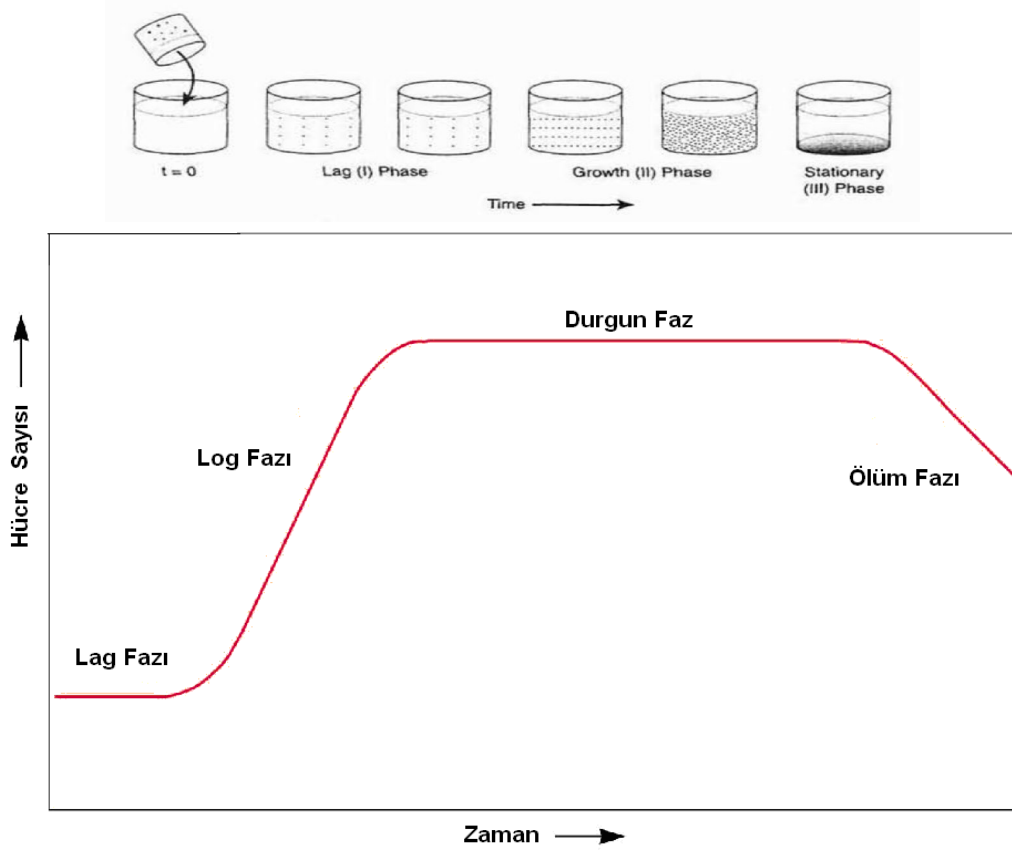
5.2.1.3. Sürekli Prosesler

Besiyeri reaktöre sürekli beslenir ve genellikle aynı hızda ortamdan uzaklaştırılır. Yarı kesikli prosese benzer şekilde biyolojik reaksiyon hızı besleme hızıyla kontrol edilir. Besleme hızının nasıl kontrol edildiğine bağlı olarak değışik sürekli prosesler vardır. En önemlisi olan kemostat, sabit giriş besleme hızında işletilir. Türbidostat ise giriş besleme hızı çıkış hücre derişimi ile kontrol edilir. pH-auxostat ise kontrol değışkeni pH'tır. Sürekli prosesin avantajı genellikle verimliliğin diğerlerine göre yüksek olmasıdır. Fakat uygulamada kesikli veya yarı kesikli prosesler daha çok tercih edilmektedir. Bunun nedeni, proses seçiminde verimliliğin tek başına belirleyici bir etken olmaması ve diğer başka etkenlerin de dikkate alınması gerektiğidir.

5.2.2. Mikrobiyal Büyüme Kinetikleri

Biyoteknolojide fermentasyonlar kesikli (batch), kesikli beslemeli (fed-batch) veya sürekli (continuous) yöntemlerle yürütölmektedir.

Kesikli kültürlerde fermentasyon ortamı hazırlanır ve mikroorganizma aşılanır. Sistemin pH, sıcaklık ve diğer değeri ayarlandıktan sonra ortama yeni substrat veya mikroorganizma ilavesi olmaz. Fermentasyon, ortamdaki besin elementleri tükeninceye kadar veya çevresel koşullarda gözlemlenen değışikliklere göre sonlandırılır. Fermentasyon boyunca fermentöre oksijen, köpük önleyici ve pH ayarı için ilave edilen asit ve bazlar hariç herhangi bir madde ilave edilmez. Kültür ortamı, biyokütle ve metabolit konsantrasyonu hücre metabolizmasının bir sonucu olarak sürekli olarak değışiklik gösterir. Kesikli fermentasyonda steril besiyerine aşılandıktan sonra (inokülasyon), uygun koşullar altında inkübasyona bırakılan mikroorganizmada dört temel büyüme fazı görülür (Şekil 12).



Şekil 12. Kesikli kültürde hücre büyümesinin kinetiği.

Lag Faz:

Lag faz olarak adlandırılan alışma fazında, hücre konsantrasyonunda çok az artış vardır. Lag faz aşamasında hücreler kendilerini yeni ortamlara göre ayarlamaktadır. Bu süre içinde hücreler, substratın hücreye girmesi için gereken taşıma proteinlerinin sentezlenmesi, yeni substratı kullanmak için gereken enzimlerin sentezlenmesi ve hücrelerin genetik materyalini kopyalanması gibi işlevleri yerine getirir. Lag fazın uzunluğu veya kısalığı hücrelerin inokulum öncesi hangi fazda olduklarına bağlıdır. Hücrelerin inokulum ortamı ile fermantasyon ortamı arasında farklılığa göre de bu süre uzun veya kısa olabilir.

Log Faz:

Lag fazın sonunda hücre yeni kültür ortamına adapte olmuş olarak hızla üremeye başlar. Hücre kütlesi bu aşamada hızla artar. Hücre sayısı logaritmik olarak artarken, kültürün spesifik büyüme hızı sabit kalmaktadır. Log faz, hücre çoğalma hızı hücre konsantrasyonu ile orantılı olması nedeniyle çoğalma fazı olarak adlandırılır. Bu fazda metabolizma için gereken tüm enzimlerin yolu besin içinde olduğundan (alışma fazının bir sonucu olarak) ve hücreler besinleri en verimli şekilde kullanacaklarından dolayı hücreler maksimum hızda bölünmektedir.

Durgun Faz:

Durgun faz, kararlı fazdır. Durağan faz sırasında, besinlerin veya önemli metabolitlerin tükenmesinin bir sonucu olarak net çoğalma hızı sıfırdır. Bu fazda net büyüme gözlenmez, biyokütle miktarı sabit kalır. Çoğu antibiyotik dahil bir çok önemli fermentasyon ürünü, sabit fazda üretilir. Örneğin, *Penicillium chryogenum* küfı kullanılarak ticari olarak üretilen penisilin, ancak hücre çoğalması sırasında meydana gelen organik asitlerin ve zehirli maddelerin etkisi ile de yavaşlar.

Ölüm Fazı:

Hücrenin enerji rezervlerinin tamamen tükendiği ve metabolik aktivitenin durduğu dönemdir. Ticari işlemlerde ölüm fazının hiçbir değeri yoktur. Bu aşamaya gelir gelmez fermentasyon kesilmektedir.

5.2.3. Üreme Kinetiği

Ekspansiyonel büyüme aşaması (log faz), ürünü ve/veya biyokütlenin kendisini üretmek istediğimizde büyüme kinetiğinin en önemli aşaması olarak belirtilir. Üstel büyüme hızının ölçülmesi (yani hücrelerin ne kadar hızlı büyüdüğü), kültür kinetiğinin ölçülmesinde ilk temel adımdır.

Kültür ortamının besin oranları ve pH, sıcaklık, iyon kuvveti vb. gibi fizikokimyasal koşulları uygunsa “dt” gibi belirli ve küçük bir zaman aralığındaki mikroorganizma (biyokütle) artışı “dx”; ortamdaki mikroorganizma konsantrasyonu (x) ile orantılıdır. Bu tanımlama aşağıdaki matematiksel bağlantılar ile gösterilir:

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

$$*t_d = \ln 2 / \mu$$

(μ =spesifik üreme hızı; X_2 =Log faz sonundaki hücre sayısı; X_1 =Log faz başındaki hücre sayısı; t_2-t_1 = log faz süresi; t_d =ikilenme süresi)

NOT!! Üreme kinetiği için olan bu denklemler sadece log faz süresince uygulanabilir. Yani spesifik üreme hızı ve ikilenme süresi hesaplanması için oluşturulacak grafik log faza göre çıkartılmalıdır.

*Spesifik büyüme oranı (μ), hücrelerin ne kadar hızlı çoğaldığını tanımlar. Spesifik büyüme oranının daha yüksek değeri, hücrelerin daha hızlı büyüdüğü anlamına gelir. Hücreler büyümediğinde, spesifik büyüme hızları sıfırdır. Log faz sırasında, spesifik büyüme hızı nispeten sabittir.

Saccharomyces cerevisiae tek hücreli canlılar grubundan olup ekmek mayası olarak bilinir. Maya hücreleri yuvarlak veya oval şeklinde olup, boyutları 2-3 μm ile 20-50 μm arasında

değişir. 1 gr yaş maya yaklaşık 10 milyar hücre içerir. Yaklaşık 600 adet bilinen maya türü olmakla birlikte bunlardan sadece birkaç tanesi ticari öneme sahiptir. Ekmek yapımında kullanılan maya türü *Saccharomyces cerevisiae*'dir.

Deney Öncesi Araştırılması Gereken Sorular:

- Bir biyoreaktörün sahip olması gereken özellikleri ve çalışma prensipleri nelerdir?
- Biyoreaktörü oluşturan ana elemanlar hangileridir?
- İnokülasyon, inokulum, kültivasyon ve fermantasyon nedir?
- Mikroorganizmalar hangi yollarla çoğalırlar?
- Mikroorganizmalar laboratuvar koşullarında üretilmek isteniyorsa nasıl bir yöntem izlenmelidir?
- *Saccharomyces cerevisiae* nasıl bir mikroorganizmadır, özellikleri nelerdir?

Ön Çalışma:

- *Saccharomyces cerevisiae*'nin saf kültürü katı besiyerine yayma yöntemi ile ekilir, 48 saat 30°C'de inkübe edilir.
- Katı besiyerinden tek koloni ekimi ile 10 mL'lik sıvı besiyerine geçilir (mini-prep). 48 saat 30°C'lik çalkalayıcı inkübatörde bırakılır.
- Ölçek büyütme işleminde kullanılan sıvı besiyeri hacmi büyük ölçeklinin %10 kadarı olmalıdır.
- Süre sonunda 10 mL'lik kültür 100 mL'lik steril besiyerine aktarılır ve 48 saat 30°C'lik çalkalayıcı inkübatörde bırakılır.

Deneyin Yapılışı:

- Süre sonunda 100 mL'lik besiyerinin tamamı büyük ölçekli besiyerine (biyoreaktöre) aktarılır.
- Biyoreaktöre ekim yapıldığında ($t = 0$, kontrol) örnek alınmaya başlanır ve büyümenin gerçekleşeceği 48 saat içinde belirli aralıklarla örnek alınmaya devam edilir.
- Örnek alım işleminde cihazın tahliye vanası kapatılır, örnek alma aparatı kullanılarak birkaç mL sıvı besiyeri bir deney tüpüne aktarılır.
- Alınan örneklerin absorbansları spektrofotometrik olarak ölçülür. Blank (kör) olarak steril besiyeri kullanılmalıdır. Blank cihaza yerleştirilir. Auto zero yapıldıktan sonra örnek kuvete eklenir ve OD₆₀₀ belirlenir.

Sonuç Raporunda Olması Gerekenler:

- Alınan her örnek için $t = 0$ anından başlayarak zamanı belirleyiniz.
- Elde ettiğiniz OD₆₀₀ değerlerini (x =hücre sayısı) kaydedip zamana karşı bir grafik oluşturunuz.

- Grafik üzerinde büyüme evrelerini gösteriniz.
- Log fazı belirleyiniz.
- Spesifik üreme hızı (μ) ve ikilenme süresini (t_d) hesaplayınız.
- Lag fazdan logaritmik faza geçişi hızlandırmak için yapılması gerekenleri yazınız.