

**Enzim Aktivitesinin Tayinine  
Yönelik Elektrokimyasal  
İmpedans Spektroskopisi  
Temelli Biyosensör  
Geliştirilmesi**

**Şükran Gülden YEŞİLLER**

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

**T.C.**

**NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİNE YÖNELİK ELEKTROKİMYASAL  
İMPEDANS SPEKTROSKOPİSİ TEMELLİ BİYOSENSÖR  
GELİŞTİRİLMESİ**

**Şükran Gülden YEŞİLLER**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK**

**TEKİRDAĞ-2014**

**Her hakkı saklıdır**

Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK danışmanlığında, Şükran Gülden YEŞİLLER tarafından hazırlanan” Enzim Aktivitesinin Tayinine Yönelik Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Temelli Biyosensör Geliştirilmesi” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

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

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

Üye : Doç. Dr. Cenk ARAL *İmza :*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU  
**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİNE YÖNELİK ELEKTROKİMYASAL İMPEDANS SPEKTROSKOPİSİ TEMELLİ BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

**Şükran Gülden YEŞİLLER**

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

Elastaz çoğu omurgalının sindirim sisteminde bulunan proteinleri parçalayıcı özelliğe sahip bir sindirim enzimidir. Bu enzim aktif olmayan bir zimogen olarak pankreasta üretilir ve tripsin ile on iki parmak bağırsakta aktif hale gelir. Bu tez çalışmasında, elastaz aktivite tayini için yeni bir amperometrik biyosensör sistemi tasarlandı. Geliştirilen biyosensörün çalışma prensibi, elastazın GOD biyoaktif tabakasını hidrolizleyerek kronoamperometride sinyal düşüşünün izlenmesine dayanmaktadır. Glukoz oksidaz, jelatin ve karbonnanotüp (CNT) karışımı camı karbon elektrot yüzeyine tutturularak ve gluteraldehit ile çapraz bağlama yapılarak immobilize edilmiştir. Geliştirilen biyosensörün optimizasyonu amacıyla optimum sıcaklık, jelatin miktarı, elastaz inkübasyon süresi, glukoz oksidaz derişimi, CNT miktarı, optimum çalışma potansiyeli ve NaHCO<sub>3</sub> tamponu için pH gibi parametreler için deneysel çalışmalar yapıldı. Tekrarlanabilirlik, tekrarüretilebilirlik ve ilgili istatistiksel parametreleride hesaplanmıştır. Her bir immobilizasyon adımı kronoamperometrik ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) yöntemleri kullanılarak incelendi. Son olarak, bu tezde geliştirilen biyosensör gerçek serum numunelerine uygulandı.

**Anahtar kelimeler:** Elastaz, enzim aktivite tayini, kronoamperometri, elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), biyosensör

**2014, 66 sayfa**

## **ABSTRACT**

MSc. Thesis

### **DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL IMPEDANCE SPECTROSCOPY BASED BIOSENSOR SYSTEM FOR DETERMINATION OF ENZYME ACTIVITY**

**Şükran Gülden YEŞİLLER**

Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof.Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

Elastase is a digestive enzyme most of found in digestive system of vertebrates, This enzyme is produced in the pancreas as an inactive zymogen form and actived in duodenum by trypsin. In this thesis, a new amperometric biosensor system for determination of elastase activity was developed. Principle of this new biosensor is based on the hydrolysis of GOD's bioactive surface by elastase and consequently decreasing of the amperometric signal. Glucose oxidase, gelatin and carbonnanotube (CNT) mixture is layered onto the surface of the glassy carbon electrodes. Glucose oxidase was crosslinked by glutaraldehyde as a crosslinking agent. In order to optimize preparation and working conditions, current parameters such as optimum temperature, concentration of gelatin, incubation time of elastase, concentration of glucose oxidase, concentration of CNT, optimum working potential, and pH for NaHCO<sub>3</sub> buffer have been studied. Immobilization steps were monitored by EIS and chronoamperometry. Repeatability, reproducibility and related statistical parameters were also investigated. Finally the biosensor presented in this thesis was applied to the real serum samples.

**Keywords:** elastase, the enzyme activity assay, chronoamperometry, electrochemical impedance spectroscopy (EIS), biosensor

**2014, 66 pages**

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>ix</b>
<b>1.GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER</b> .....	<b>3</b>
2.1 Biyosensörlere Genel Bakış .....	3
2.2 Biyosensörlerin Sınıflandırılması .....	6
2.2.1 Analizlenecek madde-biyoaktif bileşen ilişkisine göre biyosensörlerin sınıflandırılması	6
2.2.2 Biyoaktif tabaka-iletim ve ölçüm sistemi içeriğine göre biyosensörlerin sınıflandırılması	6
2.2.3 Biyoaktif tabakada kullanılan biyokomponent türüne göre biyosensörlerin sınıflandırılması	6
2.3 Enzim Temelli Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemleri .....	7
2.3.1 Adsorbsiyon.....	7
2.3.2 Tutuklama.....	8
2.3.3 Çapraz bağlama .....	8
2.3.4 Kovalent bağlama .....	8
2.4 Elektrokimyasal Esaslı Enzim Biyosensörleri.....	8
2.4.1 Amperometrik esaslı enzim biyosensörleri .....	9
2.5 Döngüsel Voltametri (Cyclic Voltammetry, CV).....	9
2.6 Kronoamperometri (CA) .....	11
2.7 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi.....	12
2.7.1 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi'nin Temel ilkeleri.....	12
2.7.2 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Temelli Biyosensörler .....	15
2.8 Yaşamın Anahtarı: Enzimler .....	15
2.8.1 Enzim aktivitesi .....	17
2.8.2 Proteazlar, fizyolojik özellikleri ve sınıflandırılmaları.....	18
2.8.3 Serin Proteazlar (E.C.3.4.21).....	20
2.8.4 Proteaz enziminin kaynakları .....	20
2.8.5 Proteazların endüstriyel uygulama alanları .....	22

2.9 Elastaz Enziminin Genel Özellikleri .....	23
2.9.1 Elastin ve Özellikleri .....	23
2.9.2 İnsandaki elastazın hastalıklardaki rolü.....	24
2.10 Glukoz Oksidaz (EC 1.1.3.4) Enziminin Genel Özellikleri .....	24
2.11 Karbon Nanotüp ve Genel Özellikleri .....	26
<b>3. MATERYAL ve METODLAR .....</b>	<b>27</b>
3.1 Materyal.....	27
3.2 Elektrokimyasal Ölçümler .....	27
3.3 Ölçüm Prosedürleri.....	27
3.4 Biyosensörün İmmobilizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu .....	29
3.4.1 Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	29
3.4.2 Elastaz inkübasyon süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	30
3.4.3 Glukoz oksidaz konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	31
3.4.4 Karbonnanotüp miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi .....	32
3.4.5 Çalışma potansiyelinin biyosensör cevabı üzerine etkisi .....	32
3.4.6 NaHCO <sub>3</sub> tamponunun pH'ının biyosensör cevabı üzerine etkisi .....	32
3.4.7 En uygun sıcaklık değerinin belirlenmesi .....	33
3.5 Biyosensörün Karakterizasyonu .....	33
3.5.1 Biyosensörün lineer ölçüm aralıkları.....	33
3.5.2 Biyosensör cevaplarının tekrarlanabilirliği .....	33
3.5.3 Biyosensör cevaplarının tekrar üretilebilirliği.....	33
3.5.4 Elektrokimyasal impedans karakterizasyonu .....	34
3.5.5 Biyosensörün gerçek örneklere uygulanabilirliğinin incelenmesi .....	34
<b>4.ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA .....</b>	<b>35</b>
4.1 Biyosensörlerin Hazırlanma Koşullarının Optimizasyonuna Ait Bulgular.....	35
4.1.1 Jelatin miktarının biyosensör cevapları üzerine etkisi.....	35
4.1.2 Elastaz inkübasyon süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	36
4.1.3 Glukoz oksidaz konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	37
4.1.4 Karbonnanotüp miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi .....	38
4.1.5 Çalışma potansiyelinin biyosensör cevabı üzerine etkisi .....	39
4.1.6 NaHCO <sub>3</sub> tamponunun pH değişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	40
4.1.7 Sıcaklığın biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	41
4.2 Biyosensör Karakterizasyonu .....	42
4.2.1 Biyosensörün lineer ölçüm aralıkları.....	42
4.2.2 Biyosensörün tekrarlanabilirliği .....	43
4.2.3 Biyosensörün tekrar üretilebilirliği.....	44

4.2.4 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Karakterizasyonu .....	45
4.2.5 Biyosensörün gerçek örneklere uygulanabilirliğinin incelenmesi .....	46
<b>5. SONUÇLAR.....</b>	<b>48</b>
<b>6.KAYNAKLAR.....</b>	<b>50</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>54</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1 : Biyosensörün işleyiş şeması.....	4
Şekil 2.2 : Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi.....	4
Şekil 2.3 : İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.4 : Enzim biyosensörünün genel çalışma ilkesi .....	9
Şekil 2.5 : İkizkenar üçgen dalgası şeklinde uygulanan potansiyel .....	10
Şekil 2.6 : Üçgen dalga potansiyel uygulandığında elde edilen voltammogram .....	10
Şekil 2.7 : Kronoamperometride elektroda uygulanan potansiyelin zamanla değişimi .....	11
Şekil 2.8 : İmpedans'ın potansiyel(zaman) ve akım(zaman) büyüklüklerine bağımlı matematiksel gösterimi .....	13
Şekil 2.9 : Bir elektrolitle kontakt halindeki elektroda ilişkin Randles eşdeğer devre modeli	14
Şekil 2.10 : Proteazların genel mekanizması.....	18
Şekil 2.11 : Katalizledikleri reaksiyona göre proteazların sınıflandırılması .....	19
Şekil 2.12 : Serin proteaz türüne ait mekanizmasının genel özeti .....	20
Şekil 2.13 : Glukoz okidazın üç boyutlu yapısı. Kahverengi: $\alpha$ -heliks; mavi $\beta$ katlanmaları; yeşil: FAD.....	25
Şekil 3.1 : Elastaz biyosensörünün kronoamperometrik ölçüm prensibi .....	29
Şekil 4.1 : Elastaz biyosensörü için jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi .....	35
Şekil 4.2 : Elastaz biyosensörü için inkübasyon süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi ..	36
Şekil 4.3 : Elastaz biyosensörü için glukoz oksidaz konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	37
Şekil 4.4 : Elastaz biyosensörü için karbonnanotüp miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	38
Şekil 4.5 : Elastaz biyosensörü için potansiyelin biyosensör cevabı üzerine etkisi .....	39
Şekil 4.6 : Elastaz biyosensörü için inkübasyonun gerçekleştirildiği NaHCO <sub>3</sub> tamponun pH'ının biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	40
Şekil 4.7 : Elastaz biyosensörünün sıcaklığa karşı biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	42
Şekil 4.8 : Kalibrasyon grafiği.....	43
Şekil 4.9 : Biyosensörün tekrar üretilebilirliği .....	44
Şekil 4.10 : Elektrokimyasal İmpedans spektroskopisi .....	45
Şekil 4.11 : EIS'nin R <sup>2</sup> 'leri ve denklemleri .....	46
Şekil 4.12 : Geliştirilen biyosensörün gerçek serum örneklerinde uygulanabilirliğini inceleme (a) elastaz + serum örneği (b) serum örneği .....	47

## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa

Tablo 2.1 : Biyoelektrokimyasal sistemleri tanımlamakta çok sıklıkla kullanılan impedans elemanlarının tanımlanmaları, frekans bağımlılıkları ve faz kaynakları .....	14
Tablo 3.1 : Elastaz enziminin hidroliz temelli biyosensörün hazırlanma prosedürü.....	28
Tablo 4.1 : Jelatin miktarı optimizasyonu grafiklerinin $R^2$ leri ve denklemleri .....	35
Tablo 4.2 : Elastaz inkübasyon süresi optimizasyonu grafiklerinin $R^2$ leri ve denklemleri ...	36
Tablo 4.3 : Glukoz oksidaz konsantrasyon optimizasyon grafiklerinin $R^2$ leri ve denklemleri .....	37
Tablo 4.4 : Karbonnanotüp miktarı optimizasyonu grafiklerinin $R^2$ leri ve denklemleri.....	38
Tablo 4.5 : Potansiyel optimizasyonu grafiklerinin $R^2$ leri ve denklemleri.....	39
Tablo 4.6 : $\text{NaHCO}_3$ için pH optimizasyonu grafiklerinin $R^2$ leri ve denklemleri.....	40
Tablo 4.7 : Sıcaklık optimizasyonu grafiklerinin $R^2$ leri ve denklemleri .....	42
Tablo 4.8 : Elastazın üç farklı konsantrasyonu için hesaplanan ortalama değer, standart sapma, varyasyon katsayı değerleri .....	44
Tablo 4.9 : Biyosensörün tekrar üretilebilirlik grafiklerinin $R^2$ leri ve denklemleri .....	45
Tablo 4.10 : Gerçek örnek denemelerinin $R^2$ değerleri ve denklemleri.....	47

## KISALTMALAR DİZİNİ

CV	: Döngüsel voltametri
EIS	: Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
CA	: Kronoamperometri
GOD	: Glukoz oksidaz enzimi
CNT	: Karbonnanotüp
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
ATP	: Adenozin 3'-trifosfat
A1AT	: $\alpha$ -1-antitripsin
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
GCE	: Camsı karbon elektrot

## **TEŞEKKÜR**

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

Varlıkları ile yaşama sevincim olan, maddi manevi her türlü desteği hiçbir zaman benden esirgemeyen sevgili aileme,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen, her türlü moral ve motivasyon sağlayan çalışma arkadaşlarım Çiğdem SAYIKLI ŐİMŐEK, Munteha Nur SONUÇ' a ve Mehmet Çetin CANBAZ'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## 1.GİRİŞ

Tüm canlılar yaşadıkları ortamdaki değişimleri derhal algılayıp yaşamlarını sürdürebilmek için değişimlere uymak zorundadırlar. İşte bu algılama mekanizması biyosensörlerin *in vitro* uygulaması için temel oluşturmuştur **(Coulet, 1991)**.

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

Biyosensörler; tıp, tarım, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma ve birçok endüstriyel aktivitede özellikle otomasyon, kalite kontrolü, durum tespiti ve enerji saklanması çok önemli rol oynarlar. Ayrıca, gıda maddeleri, metabolitler, vitaminler, antibiyotikler, ilaçlar gibi organik maddeler, bazı anorganik bileşikler, enzimler, virüsler ve mikroorganizmaların tayininde de kullanılırlar **(Telefoncu, 1999)**.

Canlıdaki hemen hemen tüm kimyasal reaksiyonlar özgün enzimler ile katalizlenmektedir. Bundan dolayı yaşamın kendisi, birleşmiş enzimatik reaksiyonlar serisi, bazı hastalıklar ise normal metabolik modeldeki düzenin bozulması olarak ele alınmaktadır **(Burtis ve Ashwood, 2007)**.

Enzimlerden bazı hastalıkların tedavisinde yararlanıldığı gibi enzimlerin kalitatif ve kantitatif tayinlerinden hastalıkların tanısında da yararlanır. Bazı patolojik hallerde hücrelerarası sıvıdaki veya kan plazmasındaki enzim düzeyi artar. Bunun sebebi enzim sentezinin artması olacağı gibi hücre zarının geçirgenliğinin artması veya hücrenin parçalanması da olabilir **(Tekman ve Önder, 1987)**.

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

Proteazlar, endüstriyel enzimler içerisinde %60'lık pazar payıyla ilk sırada yer almaktadır **(Rao ve ark., 1998)**. Gıda endüstrisinde; etin yumuşatılması, bebek mamalarının hazırlanması ve fırıncılık gibi proseslerde kullanılmaktadır. Ayrıca tıbbi teşhiste, deterjan

katkı maddelerinde ve dericilikte kılların arındırılması gibi süreçlerde yer almaktadır **(Genckal ve Tari, 2006)**.

Elastaz, moleküler biyolojide proteinleri yıkan proteazlar (peptidazlar) sınıfından bir enzimdir. Amidleri ve esterleri hidrolize eden bir serin proteazdır. Bu enzim aktif olmayan bir zimogen olarak pankreasta üretilir ve tripsin ile on iki parmak bağırsakta aktif hale gelir. Bu proteinin eksikliği bir dizi fizyolojik sorunlara neden olabilir.

Elastazı, kollajen ile birlikte, bağ dokusunun mekanik özelliklerini belirleyen bir elastik lif olan elastin ayırır. Hedef proteinlerin peptit bağlarının bölünmesi yoluyla gerçekleştirilir. Parçalanabilen spesifik peptit bağları örneğin glisin, alanin, valin gibi küçük, hidrofobik amino asitlerin karboksil grupları olanlardır. Elastaz aktivitesi alfa-1-antitripsin tarafından özgün olarak baskılanır.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında elastaz enziminin aktivite tayini için yeni bir amperometrik biyosensör geliştirildi. Çalışmanın amacı, geliştirilen biyosensörün kolay, ucuz, pratik uygulamaya olanak sağlayan, güvenilir ve hassas amperometrik esaslı biyosensörlerin oluşturulması ve hazırlanan enzim hidroliz temelli biyosensörlerin karakterizasyonu, optimizasyonu ve uygulanabilirliğinin incelenmesidir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1 Biyosensörlere Genel Bakış

Biyosensörler fizikokimyasal analiz sistemleri ile biyolojik materyallerin birleştirilmesi ile oluşan analitik sistemlerdir. Biyosensörlerde biyolojik sistemin yüksek spesifikliği ile fiziksel analiz sisteminin tayin duyarlılığı birleştirilmiştir. Çok sayıda biyoorganik molekül ve bazı inorganik moleküllerin analizinde kullanılmak amacıyla pek çok biyosensör geliştirilmiştir. Günümüzde biyosensörler, özellikle sağlık başta olmak üzere; çevresel analizlerde, askeri sahada, gıda, farmasötik ve kimya endüstrilerinde kullanılmaktadır (**Dinçkaya, 1999**).

İlk biyosensör sistemi L.C. Clark'ın kandaki oksijen seviyesini O<sub>2</sub> duyar amperometrik bir elektrotla ameliyat sırasında izlemesi ve ardından 1962 yılında ise O<sub>2</sub> duyar amperometrik elektrot yüzeyine glukoz oksidaz enzimini immobilize ederek hazırladığı glukoz biyosensörüdür (**Lucadou ve ark, 1988**). Bu gelişmenin ardından yıllar içinde pek çok biyosensör geliştirilmiştir. Biyosensör teknolojisi o kadar hızlı gelişmektedir ki; IUPAC tarafından oluşturulan Biyosensörleri Sınıflandırma ve Adlandırma Komisyonu 1996 yılında hazırlayıp yayınladığı biyosensör tanımı biyomikrochiplerin gelişimi ile daha şimdiden geçerliliğini yitirmiştir (**Dinçkaya, 1999**).

Biyosensörler birbiri içine geçmiş biri biyokimyasal diğeri elektrokimyasal özellikteki iki çeviriciden oluşmaktadır. Biyokimyasal kısmın görevi analizlenecek maddeyle etkileşerek onu tanımadır. Bu tanıma olayının sonucunda bir biyokimyasal ürün de oluşabilmektedir. Biyosensörün ikinci kısmı olan elektrokimyasal kısım ise bu tanıma olayını okunabilir (ölçülebilir) bir sayısal değere çevirmekle görevlidir (**Coulet, 1991 ve Turner, 1987**).





**Kullanım Ömrü:** Biyosensörün kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli faktör biyolojik çeviricinin aktivitesindeki azalmadır. Bu durum ayrıca, biyosensörün kalibrasyon sıklığı, stabilite, tekrarlanabilirlik gibi diğer parametrelerini de etkilemektedir.

**Kalibrasyon Gereksinmesi:** İdeal bir biyosensörün hiç kalibrasyona gerek duymaması ya da en az kalibrasyona gereksinmesi istenir. Fakat bu özellik, teorikte planladığı gibi, pratikte gerçekleştirilememiştir. Kullanım ömürleri boyunca biyosensörler, sıklıkla kalibre edilmelidirler.

**Tekrarlanabilirlik:** İdeal bir biyosensör için, elektrodun aynı koşullar altında arka arkaya yapılan ölçümlerde hemen hemen aynı sonuçların okunması istenir. Pratikte pek mümkün olmayan bu durum göz önüne alınarak yapılan çalışmalarda tekrarlanabilirlik parametresi mutlaka incelenmelidir. Tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa biyosensörün uygulamalarının da o denli iyi olduğundan söz edilebilir.

**Stabilite:** Elektrot stabilitesinin (kararlılığının) yüksek olması ideal biyosensörler için gereklidir. Stabilite, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır. Ayrıca; pH, ısı, nem, ortam, O<sub>2</sub> derişimi gibi parametrelerden de etkilenmektedir.

**Yüksek Duyarlılık:** Biyosensöre immobilize edilmiş biyolojik materyalin yalnız belirli maddelere karşı duyarlı olması ideal biyosensörlerin özelliklerindedir.

**Yeterli Düzeyde Tayin Sınırı:** Tasarlanan bir biyosensörün tayin sınırının belirli bir derişim değerinin altında olması gerekmektedir. Belirtilen bu sınır, elektrot yüzeyinin büyüklüğü, biyolojik materyalin tayin edilecek maddeye afinitesi, immobilize edilen madde miktarı gibi faktörlerden etkilenir.

**Geniş Ölçüm Aralığı:** Biyosensör uygulamalarında ölçüm aralığı olarak adlandırılan bölge biyosensörlerden alınan akım - derişim eğrilerinin lineer olduğu derişim aralığıdır.

**Hızlı Cevap Zamanı:** Bir biyosensör elektrodunun cevap zamanı elde edilen akım-zaman eğrilerinden anlaşılabilir. Örneğin elde edilen eğride basamakların şekli yayvan ve genişse cevap zamanı uzun (yavaş), tersi söz konusu ise cevap zamanı kısa (hızlı)'dır.

**Hızlı Geriye Dönme Zamanı:** Geriye dönme zamanı örneğin amperometrik çalışmalarda ilk örnekten ne kadar süre sonra ikinci örneğin ölçülebileceğini belirler. Yani ilk örneğin ilavesinden sonra sabit akım değerleri kısa sürede gözlenebiliyorsa ikinci örnek de aynı süre sonra ilave edilebilecektir.

**Basitlik ve Ucuzluk:** Tasarımı basit ve ucuz, kullanımı rahat biyosensörler ideal biyosensörlerdir. Bu nedenle ilk biyosensörlerdeki karmaşık ve de pahalı olan yapılar daha sonra basitleştirilmiş ve mümkün olduğunca da maliyeti düşürülmüştür.

**Küçültülebilirlik ve Sterilize edilebilirlik:** Elektrotlarının sterilize edilebilmesi ve boyutlarının küçültülmesi biyosensör tasarımında önemlidir. Buna karşın, biyosensör yapısına giren biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, sterilizasyonu kısıtlayan en önemli parametredir.

## **2.2 Biyosensörlerin Sınıflandırılması**

### **2.2.1 Analizlenecek madde-biyoaktif bileşen ilişkisine göre biyosensörlerin sınıflandırılması**

Biyosensörler farklı bir bakış açısıyla analizlenecek madde biyoaktif bileşen ilişkisine göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilirler;

- a) Biyokatalitik esaslı biyosensörler (mikroorganizma ve enzimlerin kullanıldığı biyosensörler)
- b) Biyoafinite esaslı biyosensörler (antikor-antijen ve reseptör ligand gibi etkileşimlerin kullanıldığı biyosensörlerdir)

### **2.2.2 Biyoaktif tabaka-iletim ve ölçüm sistemi içeriğine göre biyosensörlerin sınıflandırılması**

Biyosensörler ölçüm prensiplerine ve transduser türüne göre aşağıdaki gibi sınıflandırılır:

- a) Elektrokimyasal esaslı biyosensörler (Amperometri, Potansiyometri)
- b) Optik esaslı biyosensörler (Fotometri, Fluorometri, Biyoluminesans)
- c) Piezoelektrik esaslı biyosensörler (Kuartz kristal mikrobals, Mikrokantileverlar)
- d) Kalorimetri esaslı biyosensörler (termistörler)

### **2.2.3 Biyoaktif tabakada kullanılan biyokomponent türüne göre biyosensörlerin sınıflandırılması**

Biyosensörler biyoaktif tabakalarında görev alan biyokomponentin türüne göre:

1. Enzim temelli biyosensörler
2. Hücre temelli biyosensörler
3. DNA temelli biyosensörler
4. Antikor/Antijen temelli biyosensörler (immüno-biyosensörler)

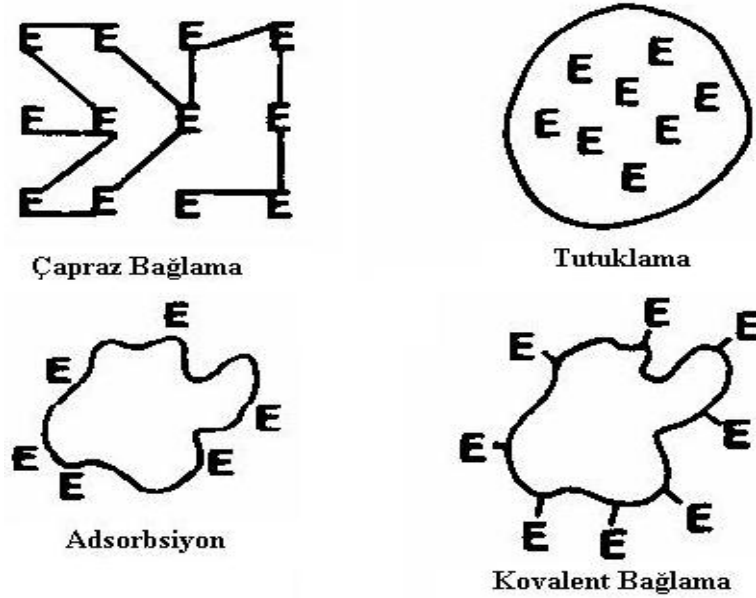
## 2.3 Enzim Temelli Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemleri

Analizlenmesi hedeflenen örneğe uygun biyokomponent ve transduser seçildikten sonra bu iki eleman birbirine bağlanmalı yani biyokomponent transduser yüzeyine immobilize edilmelidir.

İmmobilizasyon için kullanılan temel yöntemler şöyledir:

- I. Adsorpsiyon (kovalent olmayan bağlama)
- II. Kovalent Bağlama
- III. Tutuklama
- IV. Çapraz Bağlama

Bu immobilizasyon yöntemleri şematik olarak Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi

([www.engr.usask.ca/classes/CHE/461/notes/lecture%2016/lecture%20notes%20enzymeimmobilization%20of%20enzyme.ppt](http://www.engr.usask.ca/classes/CHE/461/notes/lecture%2016/lecture%20notes%20enzymeimmobilization%20of%20enzyme.ppt))

### 2.3.1 Adsorbsiyon

İmmobilizasyon için kullanılan en basit yöntemlerden biridir. Biyokomponentin transduser yüzeyine non-kovalent etkileşimler (hidrojen bağları, çoklu tuz köprüleri, elektron geçiş kompleksleri ve Van der Waals kuvvetleri) ile tutturulması prensibine dayanır. Adsorbsiyonda kullanılan başlıca adsorbanlar; selüloz, silikajel, cam, hidroksiapatit, kollajen, kil, polimerik aromatik reçinelerdir.

### 2.3.2 Tutuklama

Yüksek molekül kütleli biyomoleküller sentetik veya doğal jel matrislerde, yarı geçirgen membranlarda, misellerde ve mikro kapsüllerde tutuklanarak etkin bir şekilde immobilize edilebilirler. Jel matriste tutuklamada kullanılan başlıca malzemeler akrilamit polimerleri, jelatin tabakaları, nişasta, kalsiyum aljinat jelleri, silikon lastiği, polivinil klorür, polivinil alkoldür.

### 2.3.3 Çapraz bağlama

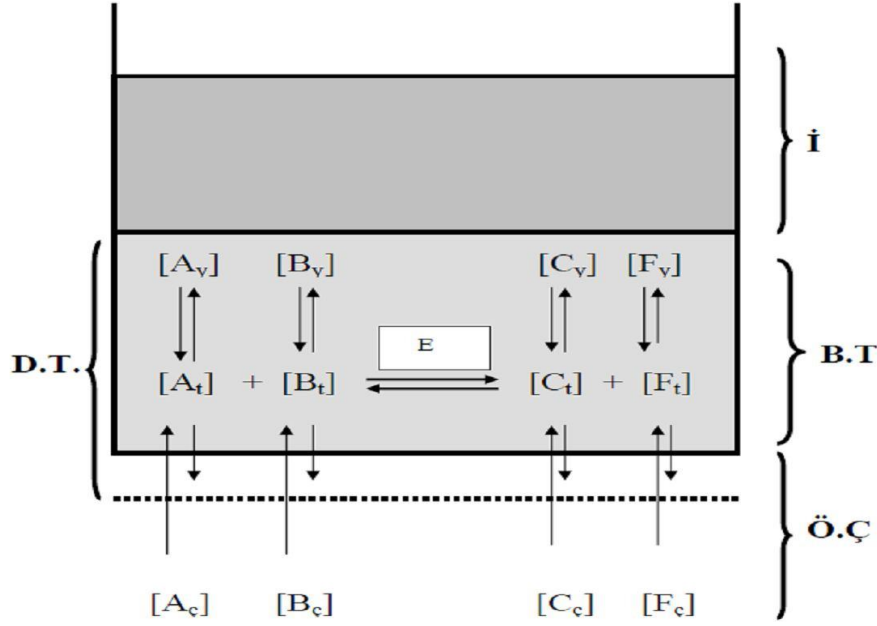
Çapraz bağlama; küçük moleküllü bir ya da multi-fonksiyonel gruplar içeren kimyasal reaktifler kullanarak biyokomponent ile adsorban arasında çözünmeyen kompleksler oluşturma prensibine dayanır. En çok kullanılan çapraz bağlama ajanı gluteraldehittir. Gluteraldehit dışında hekzametilen diizosiyanat, 2-izosiyanato-4- izotiyasiyanato-toluen, 1,5-difloro-2,4-dinitrobenzen, bisdiazobenzidin- 2,2- disülfonikası gibi kimyasallarda çapraz bağlamada kullanılabilir.

### 2.3.4 Kovalent bağlama

Kovalent bağlamanın gerçekleşmesi için bağlanma yüzeyinde ve/veya biyomolekül üzerinde tiyol (-SH), hidroksil (-OH), amin (-NH<sub>2</sub>), karbonil (-C=O), karboksil (-COOH) gibi reaktif grupların olması gerekmektedir. Bu reaktif gruplar olmadığı takdirde çeşitli manipülasyonlarla (kendiliğinden oluşan tek tabakalar, SAM vb. gibi) reaktif gruplar oluşturulabilir. Biyomolekül aktive edilmiş transduser yüzeyine bağlanabileceği gibi önceden uygun bir materyale kovalent bağlanıp immobilize biyokomponenti içeren tabaka ile transduser yüzeyinde film oluşturulabilir. Biyokomponentlerin kovalent bağlama ile immobilizasyonu pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi değişkenlere karşı direnç sağlar ve biyosensörün ömrünü uzatır ancak biyoaktif tabakada bir miktar aktivite kaybına sebep olabilir.

## 2.4 Elektrokimyasal Esaslı Enzim Biyosensörleri

Enzim temelli biyosensörlerin pek çoğunda elektrokimyasal esaslı transduserler kullanılır. Bu transduserler ile amperometri ve/veya potansiyometri ilkelerine göre ölçümler alınabildiğinden genellikle oksidoredüktaz (elektron açığa çıkaran enzimler) sınıfı enzimler kullanılır (**Bartlett, 1990**). Bir enzim biyosensörü Şekil 2.4'te şematik olarak gösterilmiştir.



(A: Substrat, B: Kosubstrat veya Koenzim, C ve F: Ürünler, ç: Ölçüm çözeltisi içindeki, t: biyoaktif tabakadaki ve y: elektrot yüzeyindeki konsantrasyonlar. D.T: Difüzyon tabakası, Ö.Ç.: Ölçüm çözeltisi, B.T.: Biyoaktif tabaka, İ: İletici)

**Şekil 2.4.** Enzim biyosensörünün genel çalışma ilkesi (Dinçkaya, 1999)

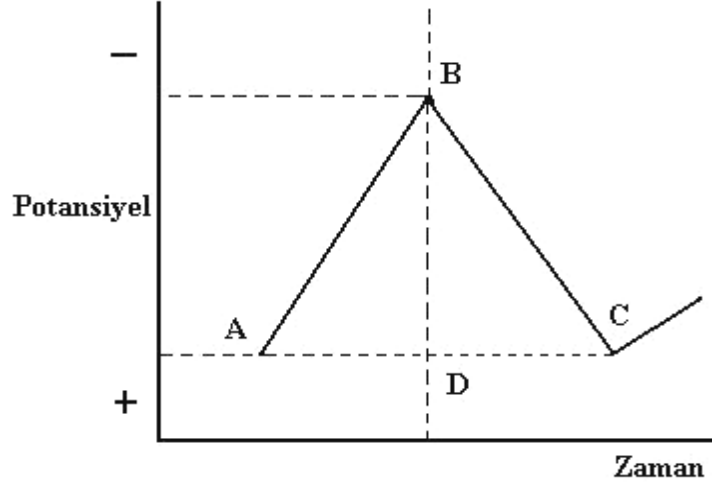
Şekilden de görüldüğü üzere A substratı elektrot yüzeyine immobilize olmuş enzim tarafından B koenziminin yardımıyla C ve F'ye dönüştürülür. Bu dönüşüm sonrasında elektrot yüzeyindeki madde konsantrasyonlarındaki farklanma iletici tarafından sinyal olarak yansıtılır.

#### 2.4.1 Amperometrik esaslı enzim biyosensörleri

Amperometri genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. Söz konusu akım yoğunluğu çalışma elektrodunda yükseltgenen ya da indirgenen elektroaktif türlerin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak tanımlanır. İkinci elektrot referans elektrot olarak iş görür. Kalibrasyondan sonra, akım yoğunluklarından ilgili türlerin konsantrasyonlarının belirlenmesinde yararlanılır. İletici sistem olarak bir amperometrik sensörün kullanılması durumunda potansiyometrik sensörlerden en büyük fark, ürünlerden sinyal oluşturan türün elektrot yüzeyinde tüketilmesidir (Dinçkaya,1999).

#### 2.5 Döngüsel Voltametri (Cyclic Voltammetry, CV)

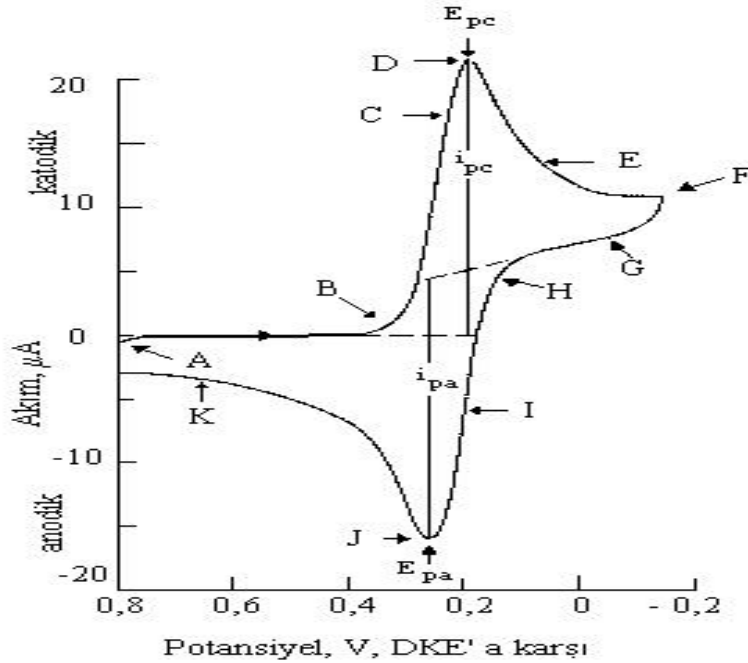
Döngüsel voltametri (CV), karıştırılmayan bir çözeltide küçük durgun bir elektrodun akım cevabı bir üçgen dalga şekilli potansiyel ile uyarılır (Skoog ve ark., 1997). (Şekil 2.5.)



Şekil 2.5. İkizkenar üçgen dalgası şeklinde uygulanan potansiyel

Döngüsel voltametri de belli bir potansiyel aralığında doğrusal olarak tarama yapılır sonra tarama yönü ters çevrilir ve potansiyel orijinal değerine getirilir. Her iki yöndeki tarama hızı aynıdır. Bu uyarma çevrimi birkaç kez tekrarlanır. Ters yöndeki potansiyellere döndürme potansiyelleri denir. Döndürme potansiyellerin aralığı, bir veya daha fazla analitin difüzyon kontrollü bir yükseltgenme veya indirgenmenin meydana geldiği potansiyeldir. Başlangıç taramasının yönü negatif veya pozitif olabilir. Bu da numunenin bileşimine bağlıdır.

Daha negatif potansiyeller yönünde bir tarama ileri tarama, zıt yöndeki tarama da ters tarama olarak adlandırılır. Üçgen dalga uygulandığında Şekil 2.6'daki gibi bir voltammogram elde edilir.

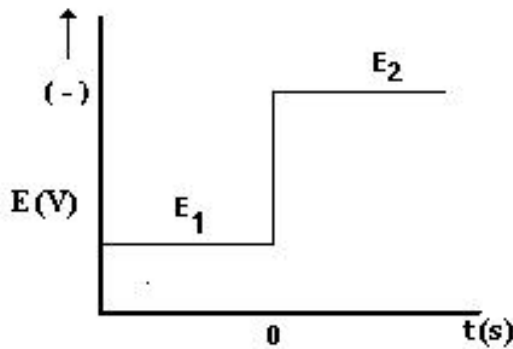


Şekil 2.6. Üçgen dalga potansiyel uygulandığında elde edilen voltammogram (Skoog ve ark., 1997).

Bu eğri şöyle yorumlanır; gittikçe artan bir katodik gerilim uygulandığında eğrinin ABDF dalı elde edilir. İndirgenme sebebiyle bir katodik akım gözlenir (B noktası ). B'den D'ye kadar ki bölgede indirgenebilen maddenin yüzey derişimi gittikçe küçülürken, akımda hızlı bir artış olur. Pik akımı iki bileşenden meydana gelir. Biri, analitin yüzey derişimini Nernst eşitliği ile verilen denge derişimine eşitlemek için gerekli kapasitif akım artışıdır. İkincisi ise normal difüzyon kontrollü akımdır. Sonra ilk akım, difüzyon tabakası elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça hızla azalır (D noktasından F noktasına). F'de uygulanan katodik gerilim azalmaya başlar. FH bölgesinde indirgenebilen maddenin indirgenmesi devam eder. Ancak indirgenmiş madde konsantrasyonu azalmış olduğundan akım da azdır. Potansiyel yeteri kadar pozitif olduğunda indirgenme daha fazla devam etmez, akım sıfıra gider ve sonra da anodik olur. Anodik akım, ileri yöndeki tarama sırasında yüzey yakınlarında biriken indirgenmiş maddenin yeniden yükseltgenmesi sonucu oluşur. Bu anodik akım pik yapar ve sonra biriken indirgenmiş maddenin anodik reaksiyon yoluyla kullanılmasıyla azalır (Skoog ve ark., 1997).

## 2.6 Kronoamperometri (CA)

Kronoamperometride çalışma elektrodunun potansiyeli aniden değiştirilir ve durgun ortamda akım–zaman ilişkisi gözlenir. Kronoamperometride çözeltiye daldırılan çalışma elektroduna uygulanan potansiyel–zaman grafiği Şekil 2.7'de gösterildiği gibidir. Önce çalışma elektroduna herhangi bir indirgenmenin olmadığı E1 potansiyeli uygulanır. Sonra potansiyel ani olarak E2'ye değiştirilir. E2 potansiyeli, indirgenme difüzyon kontrollü olacak şekilde seçilir.



Şekil 2.7. Kronoamperometride elektroda uygulanan potansiyelin zamanla değişimi (Skoog ve ark., 1997).

## 2.7 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), sistemlerin kompleks elektriksel dirençlerini, yüzey hassasiyetlerini ve miktarlarındaki değişimleri analiz etmede kullanılan çok etkili ve kullanışlı bir metottur. Metal korozyon mekanizmalarının aydınlatılmasında, membranlar boyunca yük aktarımı ve membran/çözelti ara yüzeylerinin karakterizasyonunda ve optimizasyonunda çok sıklıkla kullanılmaktadır. Son yıllarda ise biyosensörlerin hem hazırlanma aşamalarının, hem de biyomoleküllerin spesifik etkileşimlerinin izlenmesi ve kantitatif analizlerinde çok yoğun bir şekilde tercih edilmeye başlanmıştır (**Macdonald 1987, Rubinstein 1995, Krause 2007**).

EIS'nin kullanımı ile ilgili ilk örnekler 1980'lerin sonunda rapor edilmiş olmasına rağmen metodun uygulamaları, enstrümantasyondaki ilerlemelere bağlı olarak son yıllarda çok fazla artış göstermiştir. Çünkü elektrokimyasal impedans spektroskopisinin kompleks parametreleri enstrümanların her türlü donanımından çok fazla etkilenebilmektedir. İmpedans teknikleri ile biyoreseptör ve onun analiti arasındaki etkileşimin belirlenmesinin yanı sıra, transduserde biyomoleküllerin immobilizasyonu boyunca meydana gelen olaylarda olduğu gibi, yüzey modifikasyonun karakterizasyonları da başarıyla gerçekleştirilebilir. Bu özellikleri ile impedans aynı zamanda, yüzey morfolojisinin görüntüleme teknikleriyle aydınlatılmasında yardımcı ve çok önemli bir araçtır (**Macdonald 1987, Rubinstein 1995, Krause 2007**).

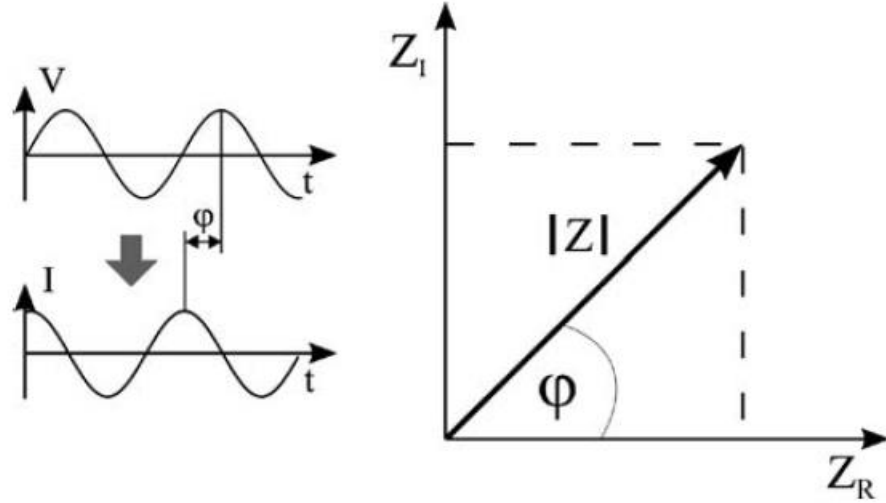
### 2.7.1 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi'nin Temel İlkeleri

Bir sistemin impedansı genellikle küçük bir genlikli potansiyel uygulanması ve akım cevabının belirlenmesiyle tayin edilir. Bu tanımdan yola çıkarak impedans; potansiyel-zaman fonksiyonun  $V(t)$  akım-zaman  $I(t)$  fonksiyonuna bölümüdür.  $V_0$  ve  $I_0$  maksimum değere ulaştıklarında,  $f$ ; frekans,  $t$ ; zaman,  $\phi$  potansiyel-zaman ve akım-zaman arasındaki faz kaymasıdır.

$$Z = \frac{V(t)}{I(t)} = \frac{V_0 \sin(2\pi ft)}{I_0 \sin(2\pi ft + \theta)}$$

İmpedans kompleks bir değerdir; çünkü akım sadece genlik açısından farklılık göstermekle kalmaz, potansiyel-zaman fonksiyonuyla kıyaslandığında faz kayması da gösterir. Bu yüzden değer ya  $|Z|$  ve faz kayması  $\phi$  ya da reel  $Z_R$  ve imgesel  $Z_I$  olarak tanımlanabilir.





**Şekil 2.8.** İmpedans'ın potansiyel(zaman) ve akım(zaman) büyüklüklerine bağımlı matematiksel gösterimi

Bu durum, şekil 2.8.'de gösterilmiştir. Dolayısıyla impedans ölçümlerinin sonuçları iki şekilde gösterilebilir: Bode grafiği ( $\log f$ 'nin fonksiyonu olarak  $\log Z$  ve  $\phi$ ) veya  $Z_R$  ve  $Z_I$ 'nin olduğu Nyquist grafiği şeklindedir.

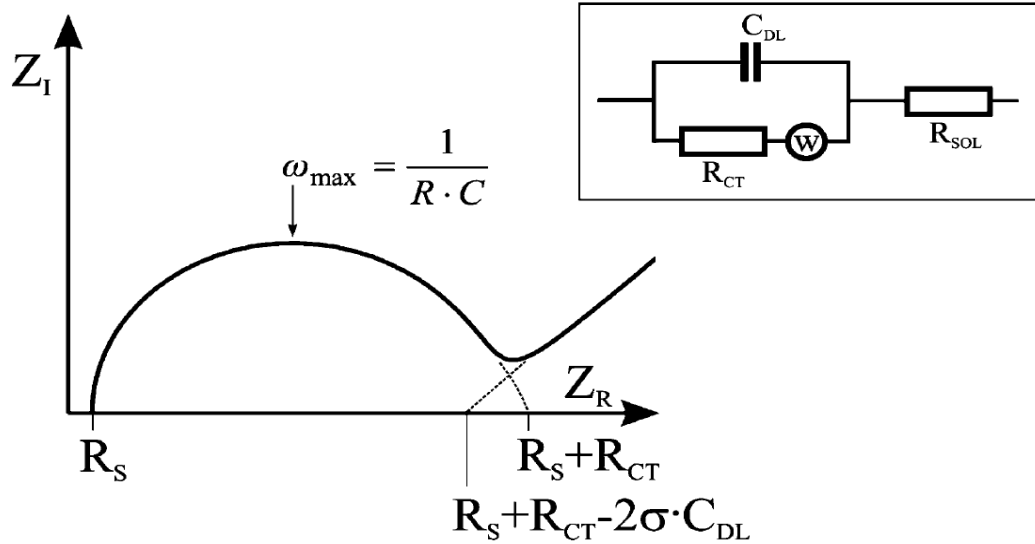
İmpedans “spektroskopisi” adı, impedansın tek bir frekanstan ziyade farklı frekansları tayin edebilme gerçeğinden türemiştir. Bu sayede bir impedans spektrumundan yüzeylerin, tabakaların veya membranların değişim ve difüzyon prosesleri ve karakterizasyonu hakkında bilgi sağlanır. Bu bilgilere ulaşmak için, impedans spektrumu genellikle eşdeğer devre kullanılarak analiz edilir. Genellikle direnç ve kapasitans oluşmuş devre incelenen sistemin farklı fizikokimyasal özelliklerini açıklar. Ayrıca sistem; elektrokinetik, difüzyon, partasyon gibi temel yasalardan türeyen transfer fonksiyonları temelinde de tanımlanabilir. Bu durumda bir impedans elementinin –direnç veya kapasitans- değişimi çözeltinin bileşiminin bir fonksiyonu olarak değerlendirilir. Bazı durumlarda, tüm impedansla konsantrasyondaki değişim arasında ilişki kurmak mümkündür (**Macdonald 1987, Rubinstein 1995, Krause 2007**).

Elektrokimyasal impedans spektroskopisinde, elektrolit çözeltisi sistemin tek bileşeni olarak incelendiğinde, impedans davranışı açıklamak için 4 unsur kullanılır: ohmik direnç, kapasitans, sabit faz ögesi ve Warburg impedans. Bu unsurlar ve tanımlamalarının özeti tablo 2.1.'de verilmiştir.

**Tablo 2.1.** Biyoelektrokimyasal sistemleri tanımlamakta çok sıklıkla kullanılan impedans elemanlarının tanımlanmaları, frekans bağımlılıkları ve faz kaymaları

İmpedans Elemanı	Tanımlama	Faz açısı	Frekans Bağımlılığı
R	$Z = R$	$0^\circ$	Hayır
C	$Z_C = \frac{1}{j\omega C}$	$90^\circ$	Evet
CPE	$Z_{CPE} = \frac{1}{A(j\omega)^\alpha}$	$0 - 90^\circ$	Evet
W (sonsuz)	$Z_W = \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}} (1 - j)$	$45^\circ$	Evet
	$\sigma = \frac{RT}{F^2 n^2 \sqrt{2}} \left( \frac{1}{\sqrt{D_0 C_0}} + \frac{1}{\sqrt{D_R C_R}} \right)$		

Eşdeğer devreler, deneysel impedans verilerini seri ve/veya paralel düzenlenmiş ideal impedans unsurlarla yaklaşık olarak belirlemek için kullanılır. Çoğu elektrokimyasal sistem bu prosedüre göre analiz edilir. Bir elektrolitle bir elektrodun temasta olduğu bir sistem – Randles devresi- çözelti direnci,  $R_s$ , yük transfer direnci  $R_{ct}$ , çift tabaka kapasitans  $C_{dl}$  ve Warburg impedans,  $W$ 'dir. Şekil 2.9.' de gösterilen Nyquist grafiğinde  $R_s$  ve  $R_{ct}$  değerleri kolaylıkla belirlenebilir. Çift tabaka kapasitansı ise yarım dairenin maksimum yaptığı noktadaki frekanstan hesaplanabilir.



**Şekil 2.9.** Bir elektrolitle kontakt halindeki elektroda ilişkin Randles eşdeğer devre modeli

## 2.7.2 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Temelli Biyosensörler

Bütün elektrokimyasal biyosensörlerde olduğu gibi, impedimetrik biyosensörler biyomoleküllerin kondüktif bir (veya yarı kondüktif) transduser yüzeyiyle etkileşimini kullanan biyoelektronik cihazlardır. Ölçüm prosesleri, reseptör biyomolekül ile analit arasında oluşan algılama yüzeyinin, elektronik transduserin elektriksel özelliklerini direkt veya indirekt şekilde değiştirmesine dayanır. Antijen-antikor veya DNA-DNA etkileşimleri gibi sınırlı katalitik aktiviteye sahip bileşiklerin analizi için geliştirilen elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) temelli biyosensörlerin sayısı literatürde her geçen gün daha da artmaktadır. Son yıllarda, EIS, birçok kimyasal ve fiziksel proseslerin çalışılmasında da kullanılan çok etkili bir yöntem haline gelmiştir. EIS, birçok proses için analitik çözümler sunmaktadır. Bunun yanı sıra membran özelliklerinin belirlenmesi, biyosensör karakterizasyon ve fabrikasyonu gibi bilimsel araştırmalar için de etkili bir teknik olan EIS ile gerçekleştirilebilmektedir. Enzim-substrat etkileşimlerinin tersine, bağlanmadan sonra herhangi bir reaksiyonun meydana gelmediği antijen-antikor veya DNA-DNA, protein-protein gibi afinite etkileşimlerinden sonra yük transfer değişimleri meydana gelir ve bu değişimler EIS ile çok etkili bir şekilde izlenebilir. Çeşitli spesifik ve hassas ölçümler , elektrot materyaline (metaller, metal oksitler, camsı karbonlar, yarı iletkenler) elektrot geometrisine (klasik elektrot düzenlenmesi veya interdijite-birbirine geçmiş- elektrotlar), analite (proteinler, antikorlar, nükleik asitler vs) veya kullanılan amplifikasyon protokolüne (label-free –tabakasız-, enzim labeller enzim tabakalar-, iletken polimer filmler nanopartiküller vs..) göre sınıflandırılabilir (**Katz ve ark. 2003, Guan ve ark. 2004, Daniels ve ark. 2007, Berggren ve ark. 2001, Saby ve ark. 1993**).

## 2.8 Yaşamın Anahtarı: Enzimler

Proteinler, tüm hücrelerde ve hücrelerin tüm bölümlerinde en çok bulunan biyolojik makro moleküllerdir. Genetik bilginin tanımlandığı moleküler araçlardır. Çok farklı çeşitte bulunabilecekleri gibi büyüklükleri de ufak peptitlerden milyonlarca moleküler ağırlıktaki büyük polimere kadar değişebilmektedir. Ayrıca proteinler, biyolojik işlev manasında da aşırı çeşitlilik gösterirler (**Nelson ve ark., 2005**). Enzimler kimyasal reaksiyonları katalizleyen biyolojik polimerlerdir. Enzimler olmasaydı bildiğimiz şekliyle yaşam olanaksız olacaktı. Yürüyen bütün fizyolojik olayların hızlarını düzenleyen biyokatalizörler olarak enzimler, sağlıkta ve hastalıkta merkezi bir yer işgal eder. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç, bilinen enzimlerin çoğu protein yapısındadır (**Murray ve ark., 1998**).

Biyokimya tarihinin genelinde enzim araştırmalarına rastlamak m¼mk¼n. Biyolojik kataliz ilk olarak 1700'lerin sonunda midenin salgılarıyla etin sindirimi üzerine yapılan çalışmalarda keşfedilmiş ve daha sonra t¼kr¼k ve çeşitli bitki ¼z¼tleriyle nişastanın şekere d¼n¼ř¼m¼ çalışmalarıyla s¼rd¼r¼lm¼řt¼r. 1800'lerin sonunda Louis Pasteur şekerin mayayla alkole fermentesinin "fermentler" tarafından katalizlendiğini ve bu "fermentlerin" canlı maya h¼crelerinin yapılarından ayrılamaz olduğunu ¼ne s¼rm¼řt¼r. Ama Buchner maya ¼z¼tlerinin şekeri alkole fermentlediğini, bunun da h¼creden ayrıldığında işlevine devam eden molek¼ller tarafından sağlandığını keşfetmiştir. Frederic W.K¼hne ise bu molek¼lleri "enzimler" olarak adlandırmıştır (**Nelson ve ark., 2005**).

Enzimlerin belirli bileşik gruplarıyla reaksiyon verip, başka bileşiklerde etkili olmamasına enzim spesifikliği denir. Bazı enzimler dar bir spesifikliğe sahipken bazı enzimler bu anlamda daha geniştirler. Üreyi, karbondioksit ve amonyağa parçalayan üreaz enzimi dar bir spesifite g¼sterir, bununla birlikte bir ince bağırsak proteazı olan kimotripsin ise substratına karşı daha az spesifiktir (**Montgomery ve ark., 2000**). Grup aktarma ve diğer tepkimeleri katalizleyen birçok enzim, substratlarına ek olarak koenzim adı ile bilinen ikinci bir organik molek¼l gerektirir ve bunlar bulunmuyorsa etkinlik g¼stermez. Koenzimler, metal iyon etkinleştiricileri ve bizzat enzimin kendisinden ayırt edilmeleri için, enzimlerin etkinliği için gereken, sıcağa dirençli, k¼¼k molek¼l ağırlıklı organik bileşikler olarak tanımlanır. Sindirim enzimleri tarafından kataliz edilen hidrolitik tepkimeler dahil litik tepkimeleri katalizleyen enzimler koenzim gereksinmez (**Murray ve ark., 1998**).

Bir enzim molek¼l¼n¼n katalitik aktivitesi genel olarak yapısının b¼t¼nl¼đ¼ne bağlıdır. Dolayısıyla yapıdaki herhangi bir bozulma aktivite kaybı ile beraberdir, bu s¼re denat¼rasyon olarak bilinir. Eğer denat¼rasyon çok ilerlememişse, denat¼re edici etkenin uzaklaştırılması ile aktivite geriye d¼ner. Bununla beraber uzamış veya ileri derecedeki denat¼re edici koşullar aktivitede geri d¼n¼ř¼ms¼z bir kayba sebep olur (**Burtis ve ark., 2007**).

Enzimler sıcaklıkla çoğunlukla denat¼re olurken, kofakt¼rler ısıya dayanıklıdır. Katalitik bakımdan etkin olan enzim-kofakt¼r kompleksine "haloenzim" adı verilir. Kofakt¼r¼ kendisinden ayrılan enzim, aktivitesini kaybeder (**Onat ve ark., 1997**). Genomik dizilimle ilgili araştırmalarla birlikte, çok sayıda enzim tanımlanmıştır. 2004 yılının ortalarından itibaren, 9800 farklı organizmadan 83000'den fazla farklı enzime dair bilgiye ulaşmak m¼mk¼n. B¼t¼n enzimler katalizledikleri kimyasal reaksiyonlara g¼re 6'ya ayrılırlar (**Devlin, 2006**). Oksidored¼ktazlar, transferazlar, Hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar. Oksidored¼ktazlar; elektronların transferini, Transferazlar; Grup-transfer tepkimelerini,

Hidrolazlar; hidroliz tepkimelerini, Liyazlar; çift bağlara grupların ilavesi ve grupların yer değişmesiyle çift bağların oluşmasını, İzomerazlar; İzomerik formları oluşturmak üzere moleküller içinde grupların transferini, Ligazlar; ATP'nin ayrılmasıyla eşleşmiş kondensasyon tepkimeleriyle C-C, C-S, C-O, ve C-N bağlarının oluşmasını katalizler (**Nelson ve ark., 2005, Sonuç, 2011**).

### **2.8.1 Enzim aktivitesi**

Enzimlerin katalitik etkinliği "aktiviteleri" ile tanımlanmaktadır. Enzim aktivitesi enzimin yapısı dışında pH'a, sıcaklığa, basınç ve gerilimlere, kimyasal bileşenlere, ışık, ses ve iyonizasyon radyasyonuna bağlıdır. Bu nedenle aktivite tanımının belli koşullarda yapılması gerekir. Enzimlerin aktiviteleri genellikle katalizledikleri tepkimenin "başlangıç hızları" tayin edilerek bulunur. İki türlü aktivite tanımı yapılmaktadır. Enzim aktivitesi:

1. Birim zamanda bir mol aktif enzim tarafından ürüne dönüştürülen substratın mol sayısı (turn-over sayısı) veya
2. Dakikada 1 µmol substratı ürüne dönüştüren miligram enzim miktarı (enzim ünitesi) olarak tanımlanmaktadır (**Aiba ve ark., 1973**).

Molekül içi kuvvetler arasındaki denge, enzimlerin bütünlüğü ve kararlılığı açısından çok önemlidir. Çevredeki herhangi bir değişiklik enzimin yapısındaki ve kararlılığındaki dengeyi tayin eder yani kararlı veya denatüre (bozunmuş) olmasını sağlar. Doğal enzimler sadece kendi çevrelerinde kararlıdır. Denatürasyon veya inaktivasyon koşullarında enzimlerin yapıları değişir ve bunun sonunda enzimler inaktif hale gelirler. Çevre etkili denatürasyon değişik fiziksel, kimyasal, biyolojik bozucu bileşiklerin etkisiyle meydana gelir (**Bailey ve Ollis 1986**).

Enzim aktivitesi;

\*pH

\*sıcaklık

\*mekanik kuvvetler –basınç ve kesme gerilimleri (hidrodinamik kuvvetler), hidrostatik basınç, ara yüzey gerilimi-

\*ışık, ses ve iyonizasyon radyasyonu,

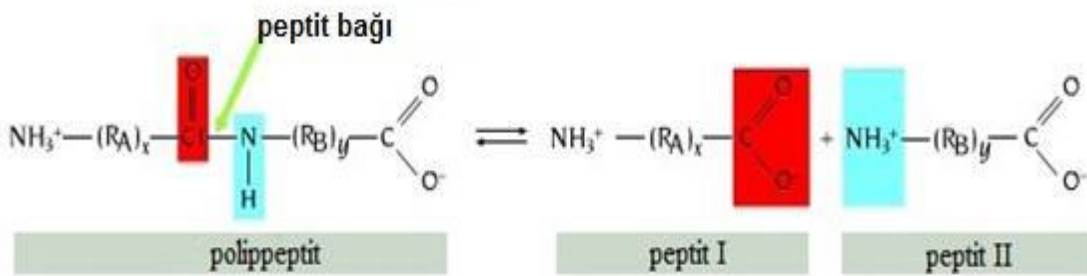
\*kimyasal bileşenler (alkol, üre, hidrojen peroksit, vs)

\*biyolojik etkenler gibi faktörlerden etkilenir (**Sonuç, 2011**).

## 2.8.2 Proteazlar, fizyolojik özellikleri ve sınıflandırılmaları

Proteinlerin dönüşümünü, sentezini ve aktivasyonunu kontrol ederek fizyolojik süreçlerin en önemli düzenleyicisi olan proteazlar; gebeliğin başlaması, doğum, sindirim, gelişme, olgunlaşma, yaşlanma ve hatta tüm organizmaların ölümünde çok önemli düzenleyici rol oynarlar (Shen ve Chou 2009). Proteazlara lizozomlarda protein yıkımından hücre bölünmesine kadar çeşitli biyolojik sistemlerde rastlanmıştır. Ayrıca proteazlar virüsler ve omurgalılar gibi çeşitli organizmalarda bulunmaktadır. Proteaz mekanizmaları, 10 kDa'luk monomerlerden multimerik komplekslere kadar olan peptidlerin ve proteinlerin amid bağlarının kırılmasını katalizlemektedir. Bu özellikleri proteazların biyolojik katalizörler olarak önemini zaten açıklamaktadır. Proteazlar; protein katabolizması, kanın pıhtılaşması, hücre büyümesi ve göçü, doku düzenlenmesi ve zimojenlerin aktivasyonu, öncül proteinlerden hormonların ve farmakolojik olarak aktif peptidlerin ayrılması, proteinlerin membranlardan geçişini sağlanması gibi birçok fizyolojik ve patolojik proseste çok önemli rol oynamaktadır.

Farklı özellikteki ve kombinasyondaki bir çok enzim; proteinlerin amino asitlerine yıkılmasına gerek duyar. Proteazlar (proteazlar veya peptidazlar) su ile peptit bağlarını yıkıp proteinleri hidrolizleyen ve organik çözücüler varlığında peptit sentezini katalizleyebilen enzim grubudur (Sookkheo ve ark., 2000). (Şekil 2.10.). Proteazlar sadece sindirim yolunda değil her hücre içerisinde bulunurlar (Koolman ve ark., 2005).



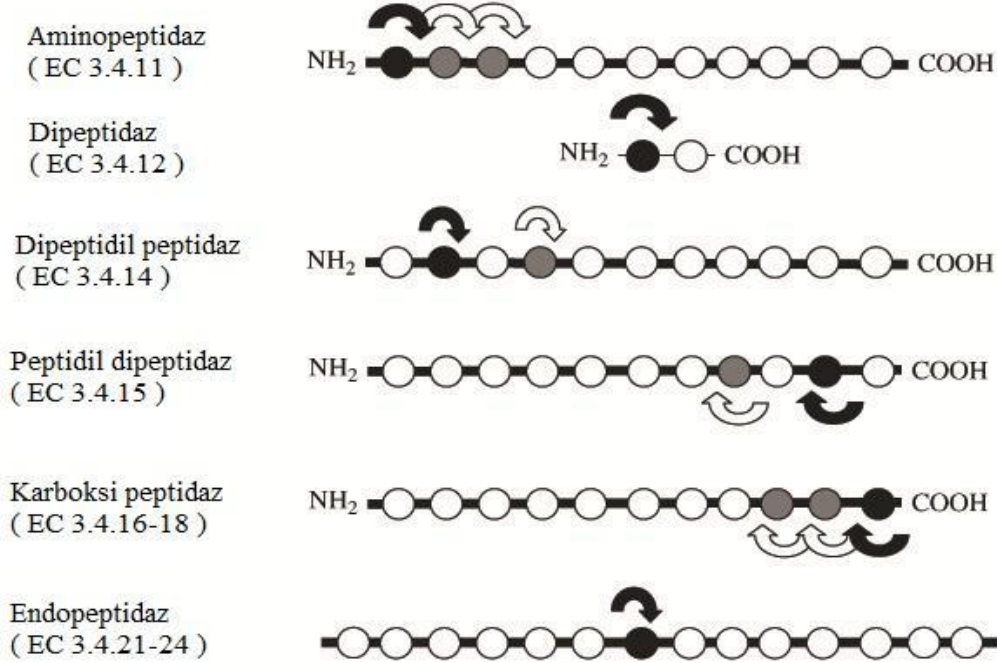
Şekil 2.10. Proteazların genel mekanizması

Proteazlar etki bölgelerine göre kabaca ikiye ayrılabilirler; ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar (Şekil 2.10). Ekzopeptidazlar; peptit bağlarını substratın amino ( $-\text{NH}_2$ ) veya karboksil ( $-\text{COOH}$ ) ucuna yakın bir yerden parçalarlarken endopeptidazlar ise uzak bir noktadan parçalar (Joo ve ark., 2003).

Aktif bölgesindeki fonksiyonel grubun varlığına ve katalitik mekanizmasına göre proteazlar için 6 farklı gruplandırma daha yapmak mümkündür; aspartik, glutamik, ve

metalloproteazlar, sistein, serin, ve treonin proteazlar. Glutamik proteazlar, memelilerde henüz bulunamamıştır (Otin ve ark., 2008).

Proteazlar aktivite gösterdikleri pH aralığına göre de, asidik, nötral ve alkali protezlar olarak sınıflandırılmışlardır.



Şekil 2.11. Katalizledikleri reaksiyona göre proteazların sınıflandırılması (Rawlings N ve ark., 2007)

### Ekzopeptidazlar

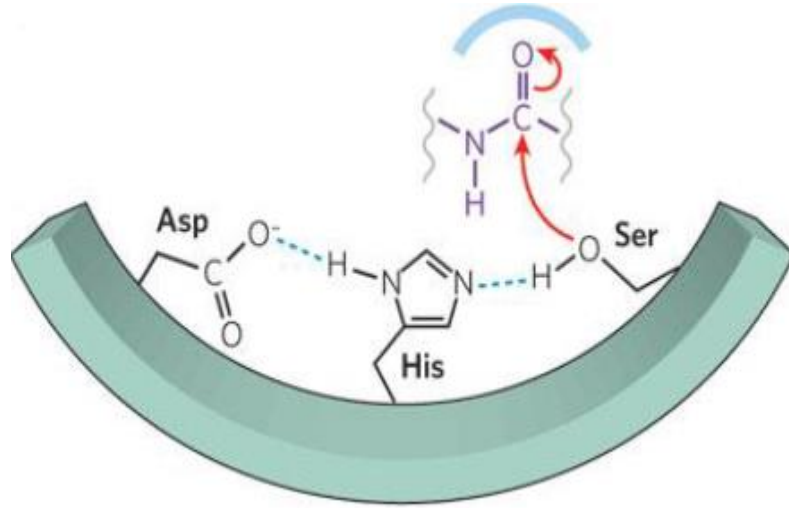
Ekzopeptidazlar, polipeptit zincirinin amino veya karboksil ucundaki peptit bağlarını hidroliz eder. Amino ucunu hidrolizleyen ekzopeptidazlar; amino peptidazlar, karboksil ucunu hidrolizleyen ekzopeptidazlar karboksipeptidazlar olarak adlandırılır.

### Endopeptidazlar

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

### 2.8.3 Serin Proteazlar (E.C.3.4.21)

Serin proteazlar, aktif merkezlerinde aspartik asit (Asp-102), serin (Ser-195) ve histidinden (His-57) oluşan üçlü katalitik yapı ile karakterize edilir. Bu yapı içinde serin; substrat ile kovalent bağ oluşturur ve yapı adını da buradan alır. Serin proteazlara örnek olarak; tripsin, kimotripsin, elastaz gibi sindirim enzimleri ile koagülasyon faktörleri, plazmin fibrinolitik enzimi ve aktivatörleri de verilebilir (Koolman ve ark., 2005).



Şekil 2.12. Serin proteaz türüne ait mekanizmasının genel özeti

([http://www.nature.com/nature/journal/v459/n7245/box/nature08146\\_BX1.html](http://www.nature.com/nature/journal/v459/n7245/box/nature08146_BX1.html) 2011)

Serin proteazlar genellikle 7-11 arasında değişen nötral ve alkali pH'larda aktif olmakla birlikte daha uç pH'larda aktif serin proteazlara da rastlanmaktadır. Bu enzimler; esterolitik ve amidaz da dahil olmak üzere geniş bir substrat spesifitesine sahiptirler. Molekül kütleleri 18 ile 35 kDa olmakla birlikte *B. subtilis (natto)*'dan 90 kDa'lık bir proteazın izole edildiğine dair de raporlar vardır (Kato ve ark. 1992). Serin proteazların isoelektrik noktaları genellikle pH 4-6 arasında değişmektedir (Gupta ve ark. 2002).

### 2.8.4 Proteaz enziminin kaynakları

Yaşayan bütün organizmalar proteazlara fizyolojik olarak gerek duydukları için, bu enzim bitkiler hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi kaynaklardan elde edilebilmektedir. Bundan dolayı proteazlar kaynağına göre, bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal olmak üzere üç farklı grupta incelenir (Sonuç, 2011).



## Bitkisel Kaynaklar

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

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

Papain, vücudumuzda karbonhidrat ve yağlar gibi diğer bileşikleri de etkileyerek tüm sindirim sistemini olumlu yönde düzenleme yeteneğine de sahiptir. Papaine, mide tarafından salgılanan ve proteinleri parçalayan enzim olan pepsine benzerliği nedeni ile bitkisel pepsin adı da verilir. Papain bir sistein proteazdır ve enzimin performansı, yetiştirildiği iklimsel koşullara, bitki kaynağına, saflaştırılması ve ekstraksiyonu için kullanılan metotlara bağlıdır. Enzim pH 5-9 arasında aktiftir ve substrat varlığında 80 ya da 90°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda kararlıdır **(Rao ve ark.1998, Grudkowska ve Zagdanska 2004)**.

## Hayvansal Kaynaklar

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

## Mikrobiyal Kaynaklar

Bitkisel ve hayvansal kaynaklı proteazların bazı yetersizlikleri günümüz dünyasının mikrobiyal proteazlara olan ilgisini arttırmıştır. Mikroorganizmaların biyoteknolojik uygulamalar için neredeyse tüm karakteristik özelliklerinin istenen yönde değiştirilebilmesi mümkün olduğu için mikrobiyal kaynaklı proteazlar bitki ve hayvansal kaynaklı proteazlara tercih edilmektedirler **(Rao ve ark. 1998)**. Mikrobiyal proteazlar enzimolojinin gelişiminden beri kapsamlıca çalışılan en önemli hidrolitik enzim grubudur **(Gupta ve ark. 2002)** ve dünya enzim endüstrisinin % 40'ını oluşturmaktadır **(Anwar ve Saleemuddin 1998)**.

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

2002). Serin, aspartil, ve sistein peptidazlar çeşitli virüslerde bulunmuştur. Virüs kodlu tüm peptidazlar endopeptidazdır, metalopeptidaz bulunmaz. Yapılan araştırmalarda viral proteazların üç boyutlu yapısı ve sentetik inhibitörler ile etkileşimi odak noktası olmuştur (Rao ve ark.1998).

Bakteri kaynaklı mikrobiyal proteazlar, başlıca nötral ve alkali ticari proteazların çoğu *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından üretilirler. Bakteriyel nötral proteazlar, pH 5-8 arasında ve düşük sıcaklıklarda aktiftirler ve bağıl olarak düşük termotoleransa sahiptirler. Hidrofobik amino asit çiftlerine yüksek afiniteleriyle karakterize edilirler. Bazı nötral proteazlar metalloproteazlar grubuna üyedirler ve aktivite gösterebilmek için iki değerlikli metal iyonlarına ihtiyaç duyarlarken serin proteazlar şelat yapıcı ajanlar tarafından etkilenmezler (Rao ve ark.1998).

### 2.8.5 Proteazların endüstriyel uygulama alanları

Mikroorganizmalardan elde edilen proteolitik enzimler dünya çapında deterjan endüstrisinde en fazla kullanım alanı bulan enzimlerdir. 2010 yılı için endüstriyel enzimlerin küresel piyasası yaklaşık 3,3 milyar dolar olarak tahmin edilmiştir. Novozymes'in açıkladığı rapora göre bu satışların %32'sini deterjan enzimleri oluşturmuştur (Anonim, Enzymes Business, 2011 ve Anonim, Enzymes in Industrial Applications: Global Markets, 2011)

Alkali proteazlar geniş pH ve sıcaklık aralıklarında stabil kalabilmesi, düşük değerlerde bile (%0,4-0,8) etkili olabilmesi, oksitleme ve ağartıcı ajanlarla birlikte kullanılabilmesi ve raf ömrünün uzun olmasından dolayı deterjan endüstrisi için ideal enzim grubudur. Bir deterjan çözeltisindeki proteazın en iyi performansının anahtar parametresi enzimin pI'sıdır. Deterjan çözeltisinin pH'sı ile enzimin pI'sı birbirine uyumlu ise proteazın bu uygulama için çok uygun olduğu kabul edilir. Alkalofilik *Bacillus spp.* tarafından üretilen Esperase ve Savinase T (Novo Endüstrisi) çok yüksek izoelektrik noktaya sahip (pI 11) iki ticari proteazdır, dolayısıyla bu enzimler yüksek pH değerlerine dayanabilirler (Rao ve ark.1998).

Deterjan endüstrisinde kullanılan proteazların büyük çoğunluğunu subtilisinler oluşturmaktadır. Subtilisinler yüksek sıcaklıklardaki kararlılıkları, yüksek substrat özgüllükleri ve oldukça kısa sürede üretilibilmelerinden dolayı her türlü çamaşır ve bulaşık deterjanlarında kan, süt, yumurta gibi protein içerikli lekelerin giderilmesinde başarıyla kullanılmaktadır (Maurer 2004).

Deri sanayisinde en zorunlu operasyon derinin kıllarından arındırılmasıdır. Bu işlemin kimyasal maddeler ile yapılması ciddi anlamda kirlenmeye ve işçilerde sağlık sorununa neden olmaktadır. Proteazlar, tüy, deri ve boynuzların kullanılabilir biyokütleyle çevrilmesi amacı ile fibröz proteinlerin hidrolizlenmesinde kullanılmaktadır (**Kazan ve ark. 2005**). Derinin kıllarından arındırılmasında proteazların kullanılması kirlenmeyi ve sağlık sorunlarını da azaltmaktadır (**Nilegaonkar ve ark.2007**).

Proteazların bir diğer önemli kullanım alanı atık fotoğraf filmlerindeki jelatini hidroliz ederek içindeki gümüşü geri elde etmektir. Bu atık filmlerin jelatin tabakaları içinde yaklaşık %1,5-2 oranında gümüş bulunmaktadır ve gümüşün bu yolla geri kazanımı çok önemlidir (**Singh ve ark., Kumar ve ark. 1999**). Tüm bunların haricinde proteazlar, fırın ürünlerinde, süt ve peynir üretiminde, bira endüstrisinde, kozmetik ve ilaç sanayinde oldukça çok kullanılmaktadır.

## **2.9 Elastaz Enziminin Genel Özellikleri**

Elastaz, moleküler biyolojide proteinleri yıkan proteazlar (peptidazlar) sınıfından bir enzimdir. Elastazı, kollajen ile birlikte, bağ dokusunun mekanik özelliklerini belirleyen bir elastik lif olan elastin ayırır. Hedef proteinlerin peptit bağlarının bölünmesi yoluyla gerçekleştirilir. Parçalanabilen spesifik peptit bağları örneğin glisin, alanin, valin gibi küçük, hidrofobik amino asitlerin karboksil grupları olanlardır. Elastaz aktivitesi alfa-1-antitripsin tarafından özgün olarak baskılanır.

Elastaz amidleri ve esterleri hidrolize eden bir serin proteazdır. Bu enzim aktif olmayan bir zimogen olarak pankreasta üretilir ve tripsin ile on iki parmak bağırsakta aktif hale gelir. Bu proteinin eksikliği bir dizi fizyolojik sorunlara neden olabilir. Elastaz, elastin ve kollajeni parçalayan klasik bir metalloproteazdır. Elastiyolitik aktivite, olasılıkla enfeksiyonun başlangıç evresinde elastin içeren akciğer dokusunun yapısında bozulmaya ve doku içi kanamaya neden olmaktadır.

### **2.9.1 Elastin ve Özellikleri**

Elastin ve diğer proteinlerin daha basit moleküllere ayrılmasını katalize eden, genellikle aminoasitlerin karbonil gruplarının bulunduğu bağlardaki polipeptit zincirini kıran, nötrofiller, makrofajlar tarafından salgılanan serin endopeptidazların bir grubudur.

Elastin organizmada ligaman, arter cidarları, akciğer plevrası ve parankimi ve diğer esnek bağ dokularında elastik liflerin yapısını oluşturan mezankimal kaynaklı sarı renkli ultraviyole ışıkta mavimsi flüoresans gösteren bir skleroproteindir. Sarı bağ dokusunda beyaz

bağ dokusuna göre daha yüksek oranda bulunur. Tripsin ve kimotripsin gibi proteazlara, asit ve alkalilere karşı dirençli olan; pH 2' de pepsin ile yavaş hidrolize uğrayan ve bir pankreas enzimi olan elastaz ile sindirilen proteindir. Bileşiminde %70 den daha yüksek oranda hidrofobik aminoasitler, %27 oranında glisin, %8-9 oranında hidrofilik amino asitler bulunur.

Elastinin hidroliz ürünleri arasında bulunan desmosin, izodesmozin, merodesmozin ve lizinilnorlosin moleküldeki çapraz bağların oluşumunda görevli olan amino asitlerdir (**Vlassara ve ark., 1984**).

## **2.9.2 İnsandaki elastazın hastalıklardaki rolü**

### **$\alpha$ -1-antitripsin (A1AT)**

Elastaz ,elastaz ve tripsinin aktif yerine geri dönüşümsüz olarak bağlı olan akut fazdaki protein  $\alpha$ -1-antitripsin (A1AT), tarafından inhibe edilir. A1AT, normal olarak serum içinde karaciğer hücreleri tarafından salgılanır.  $\alpha$ -1-antitripsin eksikliği (A1AT) elastaz tarafından elastik lifin yıkımına yol açar.

### **Döngüsel hematopoez**

Nadir bir hastalık olan döngüsel hematopoez (aynı zamanda "siklik nötropeni" denir) 21 günlük periyotlar boyunca dalgalı nötrofil granülosit sayıları ile karakterize edilen otozomal dominant bir genetik bozukluğudur. Nötropeni sırasında hastalar enfeksiyon için risk altındadır. 1999 yılında, bu hastalık ELA-2 / Elane gen bozukluklarına bağlanmıştır.

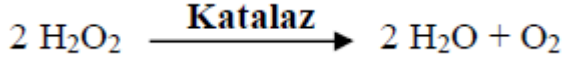
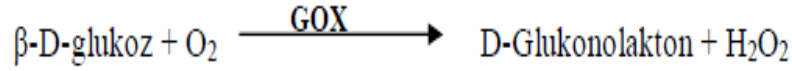
### **Hastalıklarda bakteriyel elastaz rolü**

Elastaz, sıkı bağlantıları bozduğu, dokuya proteolitik hasara neden olduğu, sitokinler ve alfa proteinaz inhibitörünü yaktığı, immünglobülin A ve G (IgA, IgG) ayırdığı, fagositozda yer alan başka bir tamamlayıcı molekül için nötrofiller bir reseptör olduğu gözlenmiştir. IgA, IgG, C3bi ve CR1 bölünme fagositoz ile bakterileri öldürmek için nötrofillerin yeteneğinin azalmasına katkıda bulunur. Bütün bu faktörler, insan patolojisine katkıda bulunur.

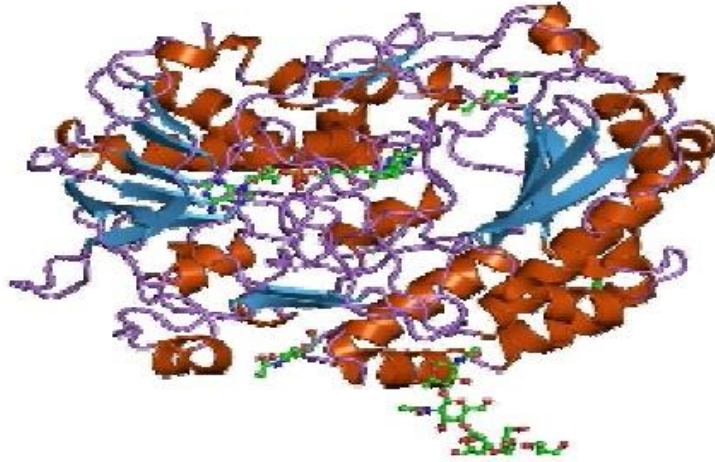
## **2.10 Glukoz Oksidaz (EC 1.1.3.4) Enziminin Genel Özellikleri**

İlk olarak 1928 yılında Muller tarafından keşfedilen glukoz oksidaz enzimi (GOD) (beta-D-glukoz oksijen-1-oksidoredüktaz, EC1.1.3.4) beta-D-glukozun D-glukonolaktona ve hidrojen peroksite yükseltgenmesini katalizler (**Kleppet, 1966; Wilson ve Turner, 1992**).

Oluşan D-Glukonolakton ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, laktonaz ve katalaz enzimleri tarafından glukonik asit ve H<sub>2</sub>O'ya dönüştürülürler.



Glukoz oksidaz enzimi her biri identik olarak 80 kDa olan iki altbirimden ve kovalent olarak bağlı olmayan iki flavin adenin dinükleotid (FAD) biriminden oluşur. Buradaki koenzim FAD, bir elektron taşıyıcısı olarak iş görür (Wilson ve Turner 1992). *Aspergillus niger* kaynaklı glukoz oksidaz enziminin ağırlığının yaklaşık olarak % 20'sini aminoşekerler ve % 16–19'u karbohidratlar oluşturmaktadır. Bu karbohidratların % 80'ini N- veya O-glikozidik bağıyla bağlanmış mannoz birimleri oluşturmaktadır (Swooboda ve Massey 1965; Nakamura and Fujiki; 1968; Tsunge ve ark. 1975). glukoz oksidazın üç boyutlu yapısı şekil 2.13'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.13.** Glukoz oksidazın üç boyutlu yapısı. Kahverengi:  $\alpha$ -heliks; mavi  $\beta$  katlanmaları; yeşil: FAD ([www.ebi.ac.uk/msd-srv/msdlite/atlas/summary/1cf3.html](http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/msdlite/atlas/summary/1cf3.html))

Glukoz oksidazın katalitik merkezinde glutamat (Glu412), Glutamin (Gln329) Histidin (His 559 ve His 516) aminoasitleri ve bunların yakınlarında bir FAD molekülü bulunmaktadır. Enzim glukozu yükseltirken glukoz üzerindeki elektronlar aktif merkez aminoasitleri tarafından FAD üzerine taşınırlar ve böylelikle FAD indirgenir.

## 2.11 Karbon Nanotüp ve Genel Özellikleri

Karbon nanotüpler, nanoteknolojinin uygulama aşamasında önemli bir yol katedilmiş alt dallarından biridir. Kendilerine özgü yapıları ve üstün özelliklerinden dolayı nanotüpler, bilim adamları ve araştırmacıların oldukça üzerlerinde durduğu nano yapılardır. Nanotüpler üzerinde yapılan araştırmalar, nanotüplerin sentezlenmeleri, oluşum mekanizmaları, yapıları, özelliklerini etkileyen unsurlar üzerinde yoğunlaşırken, bu araştırmalardan sağlanan verilerle birlikte özellikleri geliştirilmiş ve kontrol edilebilen, ucuz ve seri üretilebilen nanotüpler ve birçok alanda kullanılmak istenmektedir. Karbon nanotüplerin üretimi günümüzde pahalıya mal olmakta; fakat gün geçtikçe daha seri sentezlenmesiyle ilgili çalışmalar ve firmalar çoğalmakta ve maliyet de düşmektedir.

Karbon nanotüpler bilimin bazen istemeyerek tesadüfen ürettiği ama önümüzdeki yüzyılın teknolojik manzarasında devrim yaratacak olan inanılmaz nesnelere arasında yer almaktadır.

Toplumumuz nanotüplerden önemli derece de etkilenmektedir ve nanotüp uygulamaları ile tıpkı silikon bazlı teknolojilerin günümüzde hala hayatımızı şekillendirmesi gibi her açıdan şekillenmiştir. Dünya en güçlü kablolar ile bağlanmış uzay asansörleri, hidrojen tahrikli araçlar, suni kaslar vs. gibi olguları hayal etmeye başladı bile, tüm bu olgular karbon nanotüp biliminin ortaya çıkması ile gerçekleşebilecektir. Karbon nanotüpler daha iyi bir hayat açısından beklentilerimizi yerine getirmemize yardımcı olabilir ve bu dünya oldukça umut verici görünmektedir.

Bir karbon nanotüpler grafinin silindirik olarak sarılmasıdır. Bir karbon nanotüpün çapı, nanometre ölçeğindedir, uzunluğu ise 1 mikro metreden fazla olabilir. Nanotüp çap büyüklüğü, bugüne kadar elde edilmiş en gelişmiş yarı iletken aletten daha küçüktür. Karbon nanotüplerin bu elverişli yapısı çok küçük boyutu ve karbon atomunu eşsiz elektronik özelliklerinden dolayı yarı iletken fiziği üzerinde büyük bir etkiye sahip olabilir. Kilarite (chirality) olarak bilinen olası çok çeşitli sarmal geometri nedeniyle karbon nanotüplerin çok değişik çap ve kilaritede elde edilmesi mümkündür.

Karbon nanotüpün en önemli fiziksel özelliklerinden biriside sadece geometrik yapısına bağlı olan elektronik özelliğidir. Özellikle tek katmanlı metal veya yarıiletken olan karbon nanotüpün elektronik özelliği herhangi bir katkı gerektirmeden çapı ve kilaritesine bağlıdır. Böylece karbon nanotüp tabanlı en küçük yarı iletken cihazı hayal edebiliriz **(Yetim, 2011)**.

### 3. MATERYAL ve METODLAR

#### 3.1 Materyal

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

#### 3.2 Elektrokimyasal Ölçümler

GCE elektrota uygulanan bütün immobilizasyon işlemlerinin karakterizasyonunu ölçmek için döngüsel voltametri (CV), kronoamperometri, elektrokimyasal impedans spektroskopisinden (EIS) yararlanılmıştır. CV için potansiyel aralığı -0,5 – 1 V arasında seçilmiş olup (adım büyüklüğü: 20 mV, tarama hızı: 50 mV/s) ölçümler 0.1 M KCl içeren ve ölçüm için redoks probu sunan 5 mM  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  (1:1) çözeltisi içinde gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal impedans ölçümleri ise 10 mV alternatif akımda gerçekleştirilmiştir. Ölçümde kullanılan redoks çifti, döngüsel voltametredeki ile aynıdır. İmpedans spektrumları 10.000 – 0.05 Hz aralığındadır. Kronoamperometri ölçümlerinde potansiyeli 0,4 V (600 saniye) seçilmiş olup ölçümler 50 mM sitrat monohidrat içeren ve ölçüm için redoks probu sunan 25 mM  $K_3Fe(CN)_6$  çözeltisi içerisinde gerçekleştirilmiştir.

#### 3.3 Ölçüm Prosedürleri

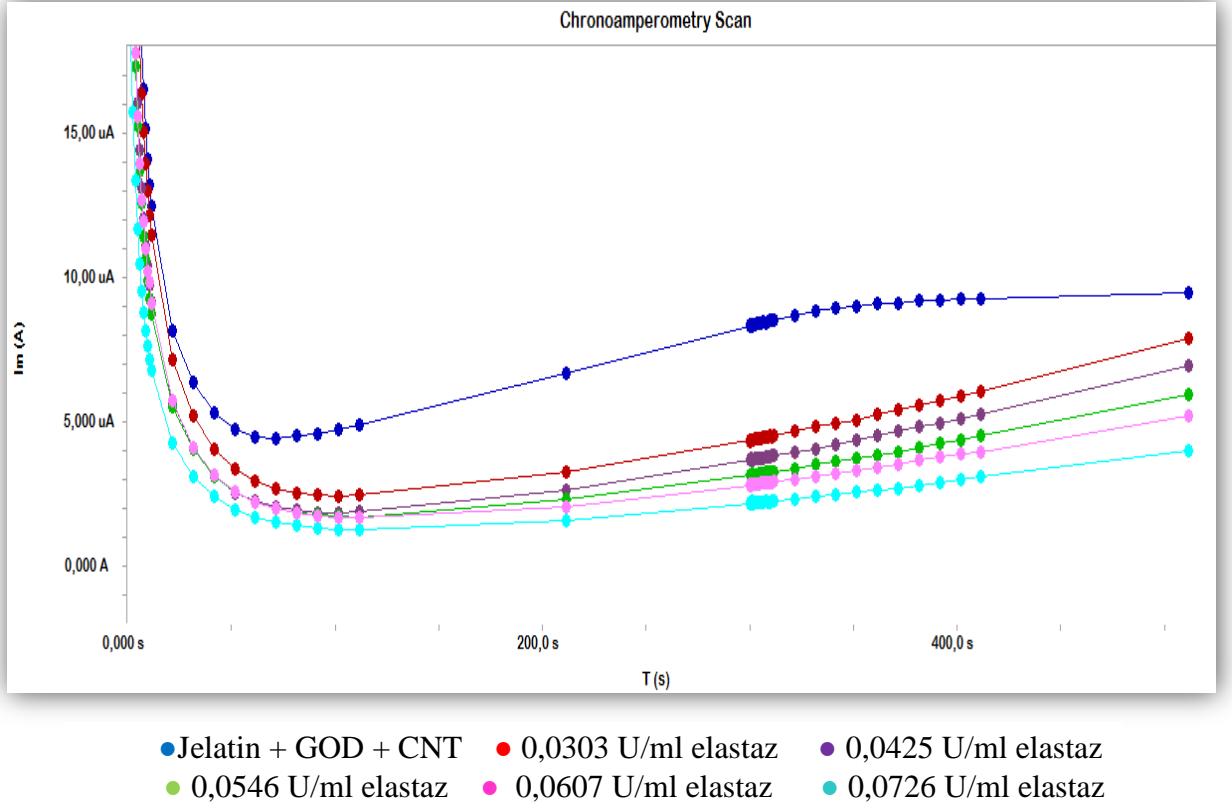
Enzim hidrolizi temelli biyosensörün hazırlanması için kullanılan çalışma elektrodu camsı karbon elektrottur. Elastaz enziminin konsantrasyonu sabit potansiyelde sistemden geçen akım miktarındaki değişimlerle doğru orantılıdır ve camsı karbon çalışma elektrodu ile akım değişimlerini belirlemek mümkündür. İlk olarak CV ve EIS ölçümleriyle camsı karbon elektrodun temiz ölçümleri alındı. Daha sonra camsı karbon çalışma elektrodu yüzeyi jelatin + glukoz oksidaz (GOD) + karbonanaotüp (CNT) karışımıyla kaplandı ve sonra glutraldehit ile çapraz bağlama gerçekleştirildi. Çalışma prensibi Şekil 3.1' de gösterilmiştir.

Enzim hidrolizi temelli biyosensörün hazırlanmasında izlenen yol elastaz biyosensörü için Tablo 3.1’de ayrıntılı olarak verilmiştir. Tablolarda belirtilen değerler; çok sayıdaki ön denemeler ve optimizasyon çalışmaları sonrasında belirlenen en uygun değerlerdir. Hazırlanan sensörler önce destile su ile yıkanmış ve ölçümler arasında çalışma sıcaklığında çalışma tamponu içerisinde bekletilmiştir.

**Tablo 3.1.** Elastaz enziminin hidroliz temelli biyosensörün hazırlanma prosedürü

İŞLEM SIRASI	İŞLEM
1	50µl fosfat tamponu+7,5mg jelatin karıştırılıp 5µl alınıp, 0,5mg CNT ve 10µl glukoz oksidaz (18unite) ile karıştırıldı.
2	Karışımın 10µl si camsi karbon elektrodu üzerine yayıldı. Kuruyana kadar bekletildi.
3	Bekleme süresinin sonunda %1’lik 20µl gluteraldehit çözeltisi elektrot yüzeyine eklenerek 5 dk bekletildi.
4	Biyosensör saf su ile yıkandı ve 0,4V potansiyelde 1M’lık 60µl glukoz çözeltisi eklenerek kronoampermetrik ölçüm alındı.
5	Ölçümden sonra biyosensör, 0,0303 U/mL’lik elastaz çözeltisi içinde (pH 8,5 ve 50mM NaHCO <sub>3</sub> tamponu)1 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 1M’lık 60µl glukoz eklenerek tekrar kronoamperometrik ölçüm alındı.
6	0,0425 U/ml’lik elastaz çözeltisi içinde (pH 8,5 ve 50 mM NaHCO <sub>3</sub> tamponu)1 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 1M’lık 60µl glukoz eklenerek tekrar kronoamperometrik ölçüm alındı.
7	0,0546 U/ml’lik elastaz çözeltisi içinde (pH 8,5 ve 50 mM NaHCO <sub>3</sub> tamponu)1 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 1M’lık 60µl glukoz eklenerek tekrar kronoamperometrik ölçüm alındı.
8	0,0607 U/ml’lik elastaz çözeltisi içinde (pH 8,5 ve 50 mM NaHCO <sub>3</sub> tamponu)1 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 1M’lık 60µl glukoz eklenerek tekrar kronoamperometrik ölçüm alındı.
9	0,0729 U/ml’lik elastaz çözeltisi içinde (pH 8,5 ve 50 mM NaHCO <sub>3</sub> tamponu)1 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 1M’lık 60µl glukoz eklenerek tekrar kronoamperometrik ölçüm alındı.





Şekil 3.1. Elastaz biyosensörün kronoamperometrik ölçüm prensibi

### 3.4 Biyosensörün İmmobilizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu

Yüksek lisans tezinin bu aşamasında enzim hidroliz temelli biyosensörler için en iyi biyosensör cevabının elde edilebileceği optimum immobilizasyon koşullarının tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla jelatin miktarının, elastaz inkübasyon süresinin, glukoz oksidaz enziminin konsantrasyonunun, karbonnanotüp miktarının, uygulanan potansiyelin, inkübasyonun yapıldığı tamponun pH'nın, sıcaklığın biyosensör cevabına etkileri araştırılmıştır. Her bir immobilizasyon parametresinin optimum miktarının tayin edilmesi için, diğerleri sabit tutularak optimizasyonu yapılacak parametre değiştirilip biyosensörler hazırlandı ve ölçümler alındı.

#### 3.4.1 Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Enzim hidroliz temelli biyosensörler için biyoaktif tabakalardaki jelatin miktarının biyosensör cevaplarına etkisinin belirlenmesi amacıyla; diğer tüm değerler sabit tutularak farklı jelatin miktarları kullanılmasıyla biyosensörler hazırlandı.

Hazırlanan biyosensörlerle yapılan ölçümlerden standart grafikler elde edildi. Bu grafikler yardımıyla en uygun jelatin miktarı tespit edildi. Bu amaçla aşağıda belirtilen oranlar kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Düşük jelatin miktarlı elektrotlarda ölçümler sırasında elektrot yüzeyinde biyobileşenin düşmesine neden oldu. Bu sorununun giderilmesi amacıyla elastaz biyosensöründe daha fazla miktarda jelatin kullanılarak biyobileşen elektrot yüzeyinde sağlamlaştırıldı. Ölçümler potansiyeli 0,4 V (600 saniye) seçilmiş olup ölçümler 50 mM sitrat monohidrat içeren ve ölçüm için redoks probu sunan 25 mM  $K_3Fe(CN)_6$  çözeltisi içerisinde gerçekleştirilmiştir. 1M'lık 60µl glukoz eklenerek kronoamperometrik ölçüm alındı.

### **Elastaz biyosensörün jelatin miktarı optimizasyonu için hazırlanan sensörler**

- 1- **2,5 mg jelatin** + 18 unite glukoz oksidaz +1 mg CNT + %1 Gluteraldehit
- 2- **5 mg jelatin** + 18 unite glukoz oksidaz + 1 mg CNT + %1 Gluteraldehit
- 3- **7,5 mg jelatin** + 18 unite glukoz oksidaz + 1 mg CNT + %1 Gluteraldehit
- 4- **10 mg jelatin** + 18 unite glukoz oksidaz + 1 mg CNT + %1 Gluteraldehit

### **3.4.2 Elastaz inkübasyon süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi**

En uygun jelatin miktarı belirlendikten sonra, elastaz inkübasyon süresinin biyosensör cevaplarına etkisinin belirlenmesi amacıyla; diğer tüm değerler sabit tutularak biyosensör farklı inkübasyon sürelerinde bekletildi.

Hazırlanan biyosensörlerle yapılan ölçümlerden standart grafikler elde edildi. Bu grafikler yardımıyla en uygun inkübasyon süresi tespit edildi. Bu amaçla aşağıda belirtilen oranlar kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Ölçümler potansiyeli 0,4 V (600 saniye) seçilmiş olup ölçümler 50 mM sitrat monohidrat içeren ve ölçüm için redoks probu sunan 25 mM  $K_3Fe(CN)_6$  çözeltisi içerisinde gerçekleştirilmiştir. 1M'lık 60µl glukoz eklenerek kronoamperometrik ölçüm alındı.

### **Elastaz biyosensörün inkübasyon süre optimizasyonu için hazırlanan sensörler**

- 1 - 7,5 mg jelatin + 18 unite glukoz oksidaz + 1 mg CNT + %1 Gluteraldehit → **elastaz inkübasyon süresi 10 dakika**
- 2 - 7,5 mg jelatin + 18 unite glukoz oksidaz + 1 mg CNT + %1 Gluteraldehit → **elastaz inkübasyon süresi 20 dakika**

3 - 7,5 mg jelatin + 18 unite glukoz oksidaz + 1 mg CNT + %1 Gluteraldehit → **elastaz inkübasyon süresi 30 dakika**

4 - 7,5 mg jelatin + 18 unite glukoz oksidaz + 1 mg CNT + %1 Gluteraldehit → **elastaz inkübasyon süresi 40 dakika**

5 - 7,5 mg jelatin + 18 unite glukoz oksidaz + 1 mg CNT + %1 Gluteraldehit → **elastaz inkübasyon süresi 60 dakika**

6 - 7,5 mg jelatin + 18 unite glukoz oksidaz + 1 mg CNT + %1 Gluteraldehit → **elastaz inkübasyon süresi 90 dakika**

### **3.4.3 Glukoz oksidaz konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi**

En uygun jelatin miktarı ve elastaz için inkübasyon süresi belirlendikten sonra, glukoz oksidaz konsantrasyonuna biyosensör cevaplarına etkisinin belirlenmesi amacıyla; diğer tüm değerler sabit tutularak biyosensör farklı glukoz oksidaz konsantrasyonları kullanılarak biyosensör hazırlandı.

Hazırlanan biyosensörlerle yapılan ölçümlerden standart grafikler elde edildi. Bu grafikler yardımıyla en uygun glukoz oksidaz konsantrasyonu tespit edildi. Bu amaçla aşağıda belirtilen oranlar kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Ölçümler potansiyeli 0,4 V (600 saniye) seçilmiş olup ölçümler 50 mM sitrat monohidrat içeren ve ölçüm için redoks probu sunan 25 mM  $K_3Fe(CN)_6$  çözeltisi içerisinde gerçekleştirilmiştir. 1M'lık 60 $\mu$ l glukoz eklenerek kronoamperometrik ölçüm alındı.

### **Elastaz biyosensörünün glukoz oksidaz konsantrasyonu optimizasyonu için hazırlanan sensörler**

1 - 7,5 mg jelatin + **9 unite glukoz oksidaz** + 1 mg CNT + %1 Gluteraldehit

2 - 7,5 mg jelatin + **18 unite glukoz oksidaz** + 1 mg CNT + %1 Gluteraldehit

3 - 7,5 mg jelatin + **36 unite glukoz oksidaz** + 1 mg CNT + %1 Gluteraldehit

4 - 7,5 mg jelatin + **72 unite glukoz oksidaz** + 1 mg CNT + %1 Gluteraldehit

5 - 7,5 mg jelatin + **108 unite glukoz oksidaz** + 1 mg CNT + %1 Gluteraldehit

### **3.4.4 Karbonnanotüp miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi**

En uygun jelatin miktarı, elastaz için inkübasyon süresi, glukoz oksidaz konsantrasyonu belirlendikten sonra, karbonnanotüp (CNT) miktarının biyosensör cevaplarına etkisinin belirlenmesi amacıyla; diğer tüm değerler sabit tutularak biyosensör farklı karbonnanotüp miktarları kullanılarak biyosensör hazırlandı.

Hazırlanan biyosensörlerle yapılan ölçümlerden standart grafikler elde edildi. Bu grafikler yardımıyla en uygun karbonnanotüp (CNT) miktarı tespit edildi. Bu amaçla aşağıda belirtilen oranlar kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Ölçümler potansiyeli 0,4 V (600 saniye) seçilmiş olup ölçümler 50 mM sitrat monohidrat içeren ve ölçüm için redoks probu sunan 25 mM  $K_3Fe(CN)_6$  çözeltisi içerisinde gerçekleştirilmiştir. 1M'lık 60µl glukoz eklenerek kronoamperometrik ölçüm alındı.

#### **Elastaz biyosensörünün CNT miktarı optimizasyonu için hazırlanan sensörler**

1 – 7,5 mg jelatin + 9 unite glukoz oksidaz + **0,2 mg CNT** + %1 Gluteraldehit

2 – 7,5 mg jelatin + 18 unite glukoz oksidaz + **0,5 mg CNT** + %1 Gluteraldehit

3 – 7,5 mg jelatin + 36 unite glukoz oksidaz + **1 mg CNT** + %1 Gluteraldehit

4 – 7,5 mg jelatin + 72 unite glukoz oksidaz + **2 mg CNT** + %1 Gluteraldehit

### **3.4.5 Çalışma potansiyelinin biyosensör cevabı üzerine etkisi**

Bitki dokusu temelli biyosensörlerin optimum potansiyeli belirlenmesi için 0.2 V, 0.4 V, 0.5 V, 0.75 V gibi potansiyeller uygulanarak kronoamperometrik ölçümler alındı. Ölçümler 50 mM sitrat monohidrat içeren ve ölçüm için redoks probu sunan 25 mM  $K_3Fe(CN)_6$  çözeltisi içerisinde gerçekleştirilmiştir. 1M'lık 60µl glukoz eklenerek kronoamperometrik ölçüm alındı.

### **3.4.6 NaHCO<sub>3</sub> tamponunun pH'ının biyosensör cevabı üzerine etkisi**

Enzim hidroliz temelli biyosensörlerin NaHCO<sub>3</sub> tamponunun optimum pH'ının belirlenmesi için pH' ı 7.0, 7.4, 7.8, 8.3, 8.5 ve 8.8 olan 50 mM NaHCO<sub>3</sub> tamponu kullanılarak en iyi biyosensör cevabının hangi pH değerlerinde elde edildiği belirlendi. Ölçümler elastaz biyosensörü için 25 °C de 1 saat farklı pH'lı NaHCO<sub>3</sub> tamponunda bekleterek ölçümler alındı.

### **3.4.7 En uygun sıcaklık değerinin belirlenmesi**

Biyosensörlerin cevabı üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi amacıyla 4, 25, 35, 45<sup>0</sup>C'de düşük sıcaklıktan yüksek sıcaklığa doğru optimum pH tamponunda ölçümler gerçekleştirildi.

### **3.5 Biyosensörün Karakterizasyonu**

Enzim temelli biyosensörlerde kullanılmış olan biyobileşenlerin immobilizasyon parametrelerinin ve çalışma koşullarının optimizasyonları yapıldıktan sonra biyosensörlerin karakterizasyonu çalışmalarına geçildi.

#### **3.5.1 Biyosensörün lineer ölçüm aralıkları**

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

#### **3.5.2 Biyosensör cevaplarının tekrarlanabilirliği**

Enzim temelli biyosensörlerin ölçüm sonuçlarının güvenilirliği ve tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi amacıyla, pH 5,5 - 50 mM sitrat monohidrat içeren ve ölçüm için redoks probu sunan 25 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> çözeltisi içerisinde 25<sup>0</sup>C' de gerçekleştirildi. Denemelerde, elastaz biyosensörü ile 1 M'lık 60 µl glukoz eklenerek arka arkaya ara vermeksizin aynı sensörle ölçümler yapıldı. Ölçümlere ilişkin R<sup>2</sup>' lerine göre değerlendirme yapıldı.

#### **3.5.3 Biyosensör cevaplarının tekrar üretilebilirliği**

Enzim temelli biyosensörün ölçüm sonuçlarının tekrar üretilebilirliğinin belirlenmesi amacıyla, pH 5,5 - 50 mM sitrat monohidrat içeren ve ölçüm için redoks probu sunan 25 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> çözeltisi içerisinde 25<sup>0</sup>C' de gerçekleştirildi. Her deneme için farklı elektrot hazırlandı. Elastaz biyosensörü ile 1 M'lık 60 µl glukoz eklenerek ara vermeksizin ölçümler alındı. Ölçümlere ilişkin R<sup>2</sup>' lerine göre değerlendirme yapıldı.

### **3.5.4 Elektrokimyasal impedans karakterizasyonu**

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), sistemlerin kompleks elektriksel dirençlerini, yüzey hassasiyetlerini ve miktarlarındaki değişimleri analiz etmede kullanılan çok etkili ve kullanışlı bir metottur.

### **3.5.5 Biyosensörün gerçek örneklerle uygulanabilirliğinin incelenmesi**

Elastaz biyosensörünün gerçek örneklerle uygulanabilirliği, iki farklı yöntemle gerçek serum örneğine uygulandı. Geliştirilen yeni biyosensör gerçek serum örneklerinde elastaz tayini için uygulandı. Bu çalışmalar iki şekilde uygulandı. İki çalışmada da kan örneği santrifüj yapılarak serumu alındı.

İlk çalışmada her bir konsantrasyon için 0,0303U/ml, 0,0425U/ml, 0,0546U/ml, 0,0607U/ml, 0,0729U/ml'lik elastaz çözeltisi ve 100µl serum içinde (pH 8,5, ve 50 mM NaHCO<sub>3</sub> tamponu)1 saat inkübasyona bırakıldı. Her bir sürenin sonunda 1M'lık 60µl glukoz eklenerek tekrar kronoamperometrik ölçüm alındı.

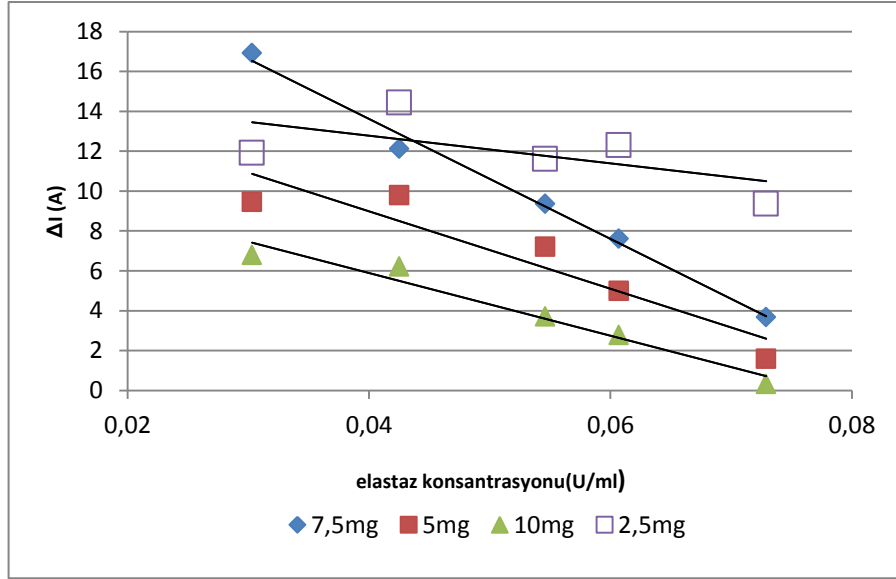
İkinci çalışmada ise sadece serum örneği kullanıldı. Serum örneğinden 100µl, 140µl, 180µl, 200µl, 240µl alınarak (pH 8,5, ve 50 mM NaHCO<sub>3</sub> tamponu)1 saat inkübasyona bırakıldı. Her bir sürenin sonunda 1M'lık 60µl glukoz eklenerek tekrar kronoamperometrik ölçüm alındı.

## 4.ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

### 4.1 Biyosensörlerin Hazırlanma Koşullarının Optimizasyonuna Ait Bulgular

#### 4.1.1 Jelatin miktarının biyosensör cevapları üzerine etkisi

Çalışmanın bu kısmında immobilizasyon için kullanılan jelatin miktarlarının biyosensörlerin cevabı üzerine etkisi incelendi. Biyosensörlerin hazırlanmasında kullanılan jelatin miktarları ile biyosensör cevapları arasındaki ilişki Şekil 4.1’de verildi.



Şekil 4.1. Elastaz biyosensörü için jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Tablo 4.1. Jelatin miktarı optimizasyonunun grafiklerinin R<sup>2</sup> leri ve denklemleri

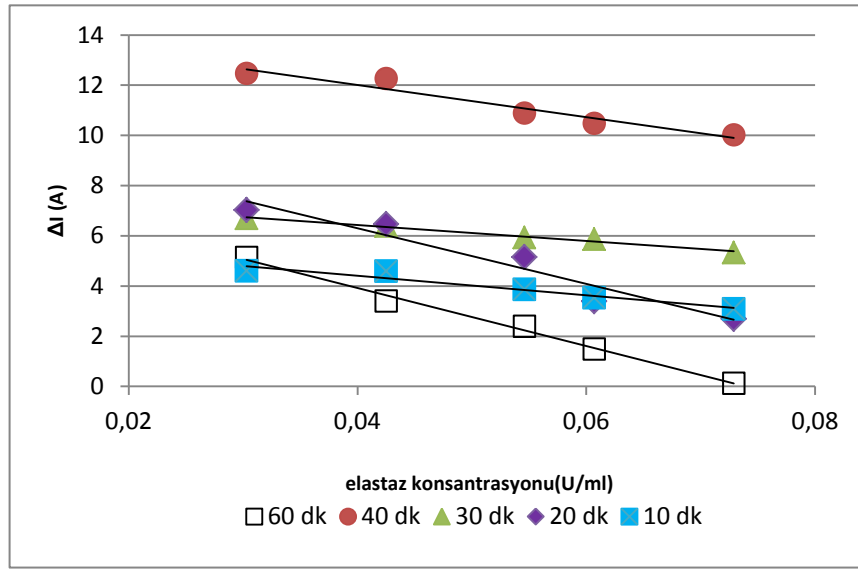
Jelatin miktarı (mg)	R <sup>2</sup>	Denklem
10 mg	0,9601	y = -157,19x + 12,171
7,5 mg	0,9923	y = -300,74x + 25,6
5 mg	0,8747	y = -193,83x + 16,732
2,5 mg	0,3961	y = -69,296x + 15,541

Biyoaktif tabakadaki jelatin miktarının artması biyoaktif tabaka yoğunluğunu arttırarak hem oksijen hem de substrat için difüzyonu zorlaştırır. Denemelerdeki biyosensörlerde de jelatin miktarındaki artış ile biyosensör cevabının düşmesi beklenen bir sonuçtur. Tablo 4.1’ de görüldüğü gibi R<sup>2</sup> ve denklemleri belirlendi. Jelatin miktarının; elastaz biyosensöründe 5 mg’ dan 7,5 mg’ a yükseltilmesiyle farklı elastaz konsantrasyonlarında biyosensör cevabının da yüksek olması, biyoaktif tabakanın yeterli yoğunlukta olmaması nedeniyle substrat ve oksijen kaçışlarının olabileceği göz önüne alındığında olası bir sonuçtur.

Şekil 4.1'den de görülebileceği gibi doğrusal aralığı en iyi olan biyosensör cevabı, biyoaktif tabakada; elastaz biyosensörü için 7,5 mg jelatin içerecek şekilde hazırlanmış olan biyosensörler ile alındı.

#### 4.1.2 Elastaz inkübasyon süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi

Çalışmanın bu kısmında elastaz inkübasyon süresinin biyosensörün cevabı üzerine etkisi incelendi. Biyosensörün inkübasyona bırakılan süreler ile biyosensör cevapları arasındaki ilişki Şekil 4.2.'de verildi.



Şekil 4.2. Elastaz biyosensörü için inkübasyon süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi

Tablo 4.2. Elastaz inkübasyon süresi optimizasyonu grafiklerinin R<sup>2</sup>'leri ve denklemleri

Elastaz inkübasyon süresi (dk)	R <sup>2</sup>	Denklem
60 dk	0,9939	y = -115,32x + 8,5318
40 dk	0,9388	y = -64,329x + 14,584
30 dk	0,9859	y = -31,589x + 7,6913
20 dk	0,9342	y = -110,73x + 10,725
10 dk	0,9324	y = -38,849x + 5,9589

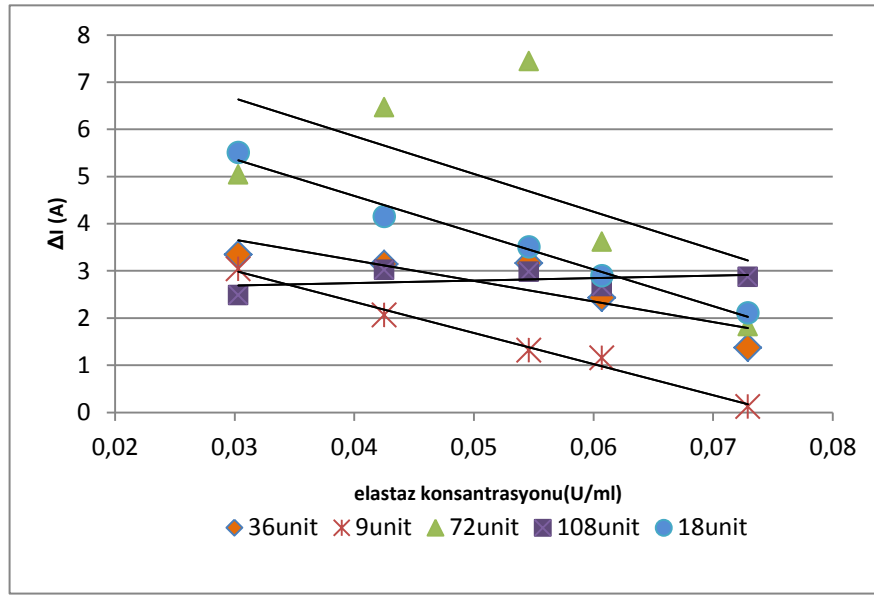
Elastaz inkübasyon süreleri 60 dakikadan az olduğunda elastaz enzimi tam olarak parçalama işlemini gerçekleştiremediğinden akım farklarındaki azalma çok az olduğu gözleniyor. 60 dakikadan fazla örneğin 90 dakika inkübasyona bırakıldığında da iki ölçümden sonra biyoaktif tabakanın düştüğü gözlemlendi. Tablo 4.2' de görüldüğü gibi R<sup>2</sup> ve denklemleri



hesaplandı. Akım farklarına ve  $R^2$  lerine bakılarak en uygun inkübasyon süresi 60 dakika olarak belirlendi.

#### 4.1.3 Glukoz oksidaz konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi

Çalışmanın bu kısmında immobilizasyon için kullanılan glukoz oksidaz konsantrasyonu biyosensörlerin cevabı üzerine etkisi incelendi. Biyosensörlerin hazırlanmasında kullanılan glukoz oksidaz konsantrasyonları ile biyosensör cevapları arasındaki ilişki Şekil 4.3’de verildi.



Şekil 4.3. Elastaz biyosensörü için glukoz oksidaz konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi

Tablo 4.3. Glukoz oksidaz konsantrasyon optimizasyon grafiklerinin  $R^2$ leri ve denklemleri

Glukoz oksidaz konst.(unite)	$R^2$	Denklem
9 unite	0,9788	$y = -63,177x + 4,8641$
18 unite	0,9848	$y = -77,954x + 7,706$
36 unite	0,7715	$y = -43,551x + 4,9648$
72 unite	0,3468	$y = -80,214x + 9,0661$
108 unite	0,1513	$y = 5,297x + 2,5289$

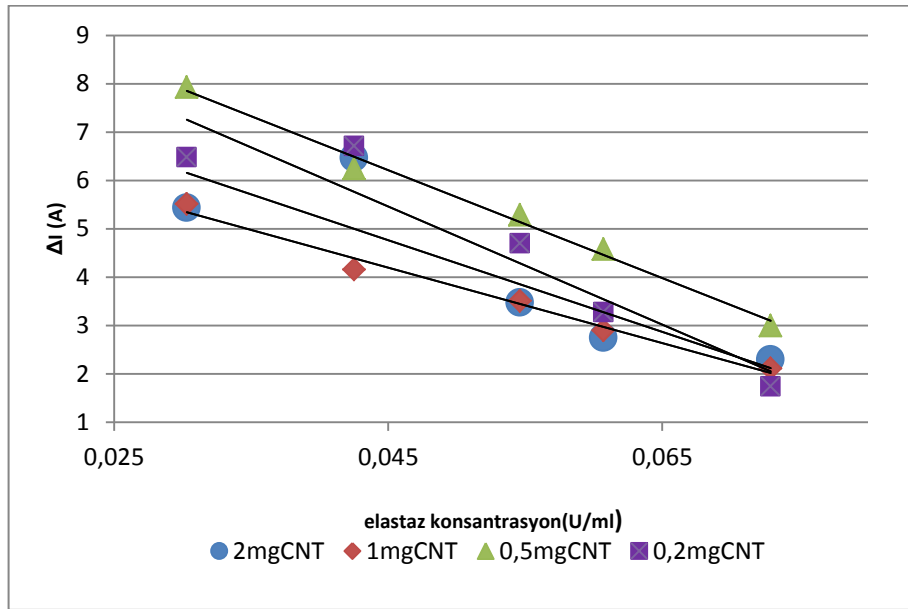
Biyoaktif tabakadaki glukoz oksidaz konsantrasyonunun artması biyoaktif tabaka yoğunluğunu bozmaktadır. Tablo 4.3’ de görüldüğü gibi  $R^2$  ve denklemleri hesaplandı. Denemelerdeki biyosensörde de glukoz oksidaz konsantrasyonunun artması ile biyosensör

yüzeyinin bozulup  $R^2$ ' lerinin azalması beklenen bir sonuçtur. 9 unite gibi düşük konsantrasyonlarda da akım farklarının az olduğu gözlemlendi.

Şekil 4.3.'den de görülebileceği gibi doğrusal aralığı en iyi olan biyosensör cevabı, biyoaktif tabakada; elastaz biyosensörü için 18 unite glukoz oksidaz içerecek şekilde hazırlanmış olan biyosensörler ile alındı.

#### 4.1.4 Karbonnanotüp miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Çalışmanın bu kısmında immobilizasyon için kullanılan glukoz oksidaz konsantrasyonu biyosensörlerin cevabı üzerine etkisi incelendi. Biyosensörlerin hazırlanmasında kullanılan glukoz oksidaz konsantrasyonları ile biyosensör cevapları arasındaki ilişki Şekil 4.4'de verildi.



Şekil 4.4. Elastaz biyosensörü için karbonnanotüp miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

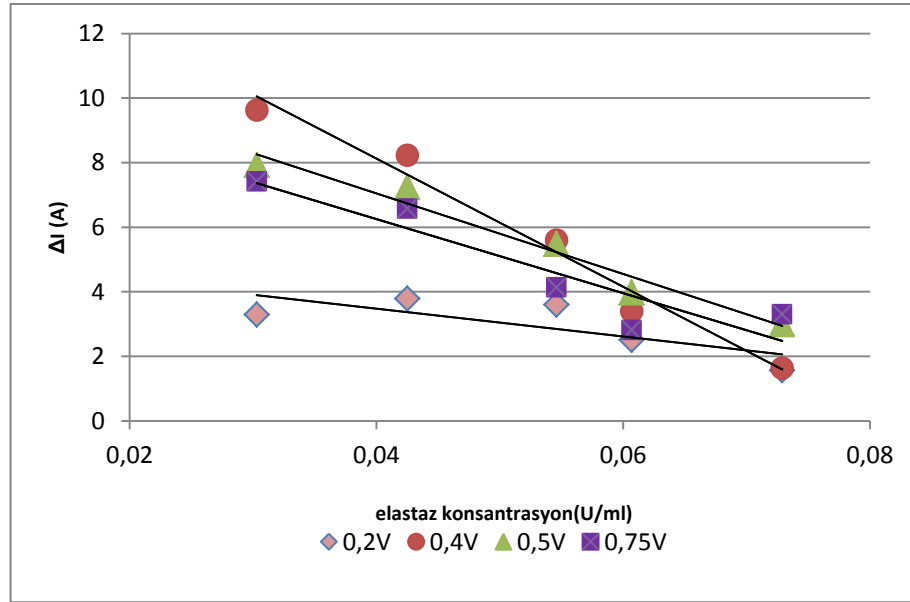
Tablo 4.4. Karbonnanotüp miktarı optimizasyonu grafiklerinin  $R^2$ 'leri ve denklemleri

Karbonnanotüp miktarı(mg)	$R^2$	Denklem
2 mg	0,7590	$y = -94,896x + 9,0358$
1 mg	0,9848	$y = -77,954x + 7,706$
0,5 mg	0,9914	$y = -111,51x + 11,228$
0,2 mg	0,8980	$y = -122,07x + 10,952$

Biyoaktif tabakadaki karbonnanotüp miktarının artması biyoaktif tabaka yoğunluğunu azaltarak hem oksijen hem de substrat için difüzyonu arttırdığından yüzeyinin bozulmasına neden olur. Tablo 4.4’ de görüldüğü gibi  $R^2$  ve denklemleri hesaplandı.  $R^2$ ’leri birbirine yakın 1 mg ve 0,5 mg CNT içeren biyosensörler bakıldığında akım farkı yüksek olan biyosensör seçildi. Ayrıca elektrokimyasal açıdan karbonanaotüp miktarı az olanı seçmek daha doğru olur.

#### 4.1.5 Çalışma potansiyelin biyosensör cevabı üzerine etkisi

Çalışmanın bu kısmında hidroliz temelli biyosensörün kronoamperometrik ölçümler de uygulanan potansiyele biyosensörün cevabı incelendi. Biyosensöre uygulanan potansiyel ile biyosensör cevapları arasındaki ilişki Şekil 4.5.’de verildi.



Şekil 4.5. Elastaz biyosensörü için potansiyelin biyosensör cevabı üzerine etkisi

Tablo 4.5. Potansiyel optimizasyon grafiklerinin  $R^2$ ’leri ve denklemleri

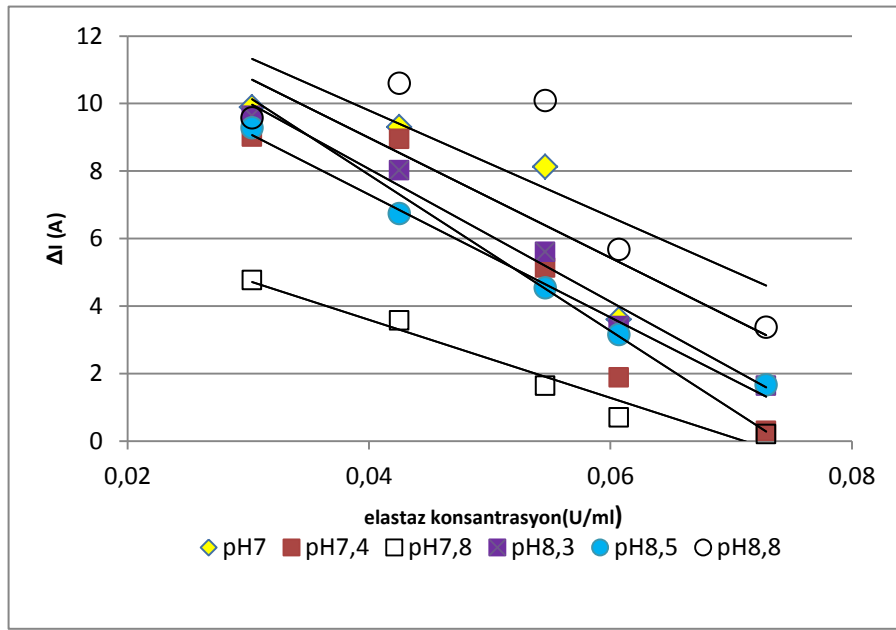
Potansiyel (V)	$R^2$	Denklem
0,2 V	0,5949	$y = -42,933x + 5,1941$
0,4 V	0,9758	$y = -198,64x + 16,074$
0,5 V	0,9614	$y = -124,77x + 12,04$
0,75 V	0,8569	$y = -114,93x + 10,852$

Potansiyel optimizasyonunda kronoamperometri ölçümlerimde 0,2V, 0,4V, 0,5V ve 0,75V potansiyelleri uygulandı. Bu denemeler sonucunda düşük potansiyel 0,2V ile yüksek

potansiyel 0,75V potansiyelleri istediğimiz gibi sonuç vermemiştir. Tablo 4.5’ de görüldüğü gibi  $R^2$  ve denklemleri hesaplandı. Buna göre 0,4V ve 0,5V potansiyelleri birbirine çok yakın olduğundan  $R^2$ ’leride birbirine çok yakın çıkmıştır. Bu nedenle yüksek potansiyelde daha fazla girişimler olabileceğinden çalışma potansiyeli 0,4V olarak belirlendi.

#### 4.1.6 NaHCO<sub>3</sub> tamponunun pH değişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisi

Çalışmanın bu kısmında biyosensörün 1 saatlik inkübasyona bırakıldığı NaHCO<sub>3</sub> tampon çözeltisinin pH’ının biyosensörün cevabı üzerine etkisi incelendi. NaHCO<sub>3</sub> tamponunun pH değişimi ile biyosensör cevapları arasındaki ilişki Şekil 4.6.’de verildi.



**Şekil 4.6.** Elastaz biyosensörü için inkübasyonun gerçekleştirildiği NaHCO<sub>3</sub> tamponunun pH’ının biyosensör cevabı üzerine etkisi

**Tablo 4.6.** NaHCO<sub>3</sub> için pH optimizasyon grafiklerin  $R^2$  leri ve denklemleri

NaHCO <sub>3</sub> için pH değerleri	$R^2$	Denklem
pH 7	0,7057	$y = -177,69x + 16,087$
pH 7,4	0,9086	$y = -231,21x + 17,132$
pH 7,8	0,9618	$y = -115,6x + 8,2134$
pH 8,3	0,9805	$y = -196,7x + 15,93$
pH 8,5	0,9906	$y = -181,98x + 14,58$
pH 8,8	0,6654	$y = -157,65x + 16,096$

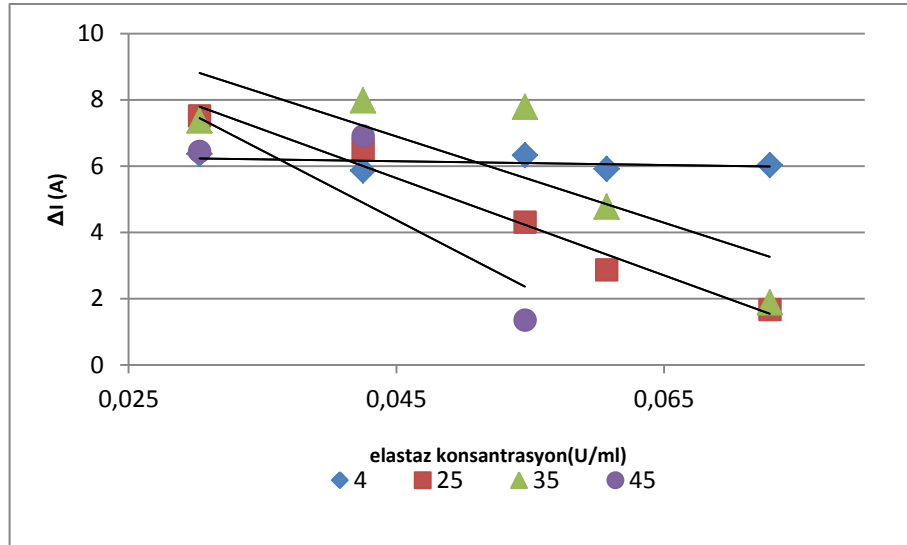
Elastaz enzimi bazik pH' da çalışan bir enzimdir. Literatürlerde elastazın pH 7-8,8'de aktivitelerinin daha yüksek olduğunu söylenmektedir. Bu nedenle denemelerde 7-7,4-7,8-8,3-8,5-8,8 pH'larda NaHCO<sub>3</sub> çözeltisi kullanılmıştır. Tablo 4.6' da görüldüğü gibi R<sup>2</sup> ve denklemleri hesaplandı. R<sup>2</sup>'lerine bakıldığında pH 8,3 ve pH 8,5'in daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu nedenle elastaz enziminin en aktif olduğunu düşündüğümüz pH 8,5 seçilip, diğer optimizasyonlar da bu değer değiştirilerek çalışmalar gerçekleştirildi.

#### **4.1.7 Sıcaklığın biyosensör cevabı üzerine etkisi**

Biyosensörlerin performanslarının ve kararlılıklarının sıcaklığa bağımlılıkları çok iyi bilinmektedir. Bundan dolayı en uygun çalışma sıcaklığının belirlenmesi kısa ve uzun vadede hem biyosensörün performansının hem de kararlılıklarının korunması açısından çok büyük önem arz etmektedir. Buradaki sistemde çalışma sıcaklığının belirlenmesi, iki enzimle birlikte çalışılması nedeniyle ayrı bir önem taşımaktadır. Aktivitesi tayin edilecek olan elastaz ve biyosensörde immobilize edilmiş olan GOD için ortak uygun bir çalışma sıcaklığı saptamak çok önemlidir. Bu amaç için gerçekleştirilen deneme sonuçları Şekil 4.7'de verilmiştir.

Optimum sıcaklığının belirlenmesine yönelik olarak çizilen grafikten de görüldüğü üzere biyosensör cevabı belli bir sıcaklığa kadar artış göstermiştir. 25<sup>0</sup>C' den sonra ise düşmeye başlamıştır.

Çünkü geleneksel bir biyosensör sistemiyle çalışıldığında bu düşüş çoğu zaman substratın yüksek sıcaklıkta bozunabileceği durumlar haricinde biyosensörde immobilize halde olan enzimin optimum sıcaklıktan uzaklaşılmasından kaynaklanacaktır. Ayrıca enzim içeren sistemlerde yüksek sıcaklıklarda çalışmak yarı ömürleri oldukça düşürebildiğinden pek tercih edilmez. Bu yüzden öncelikle hangi enzimde aktivite kaybı olabileceğini bulmak için hem elastaz enzimi hem de GOD temelli biyosensörler farklı sıcaklıklarda inkübasyona tabi tutularak ölçümler gerçekleştirildi.



Şekil 4.7. Elastaz biyosensörünün sıcaklığa karşı biyosensör cevabı üzerine etkisi

Tablo 4.7. Sıcaklık optimizasyon grafiklerinin  $R^2$  leri ve denklemleri

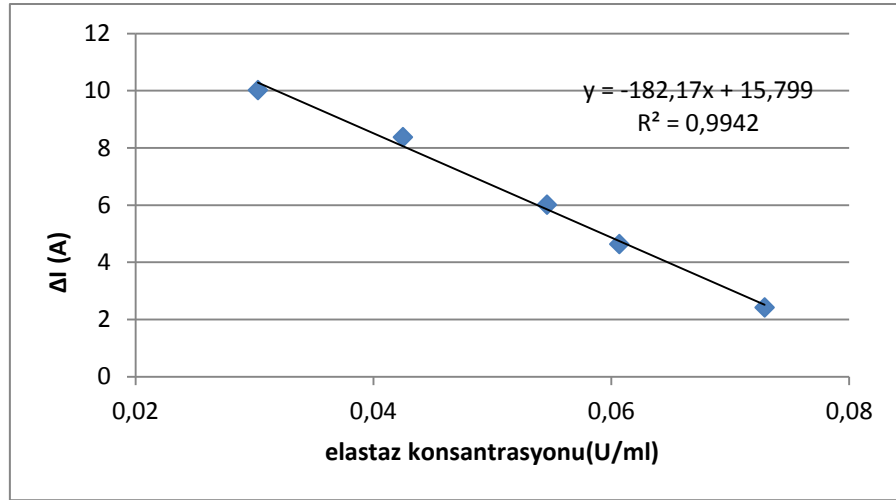
Sıcaklık değerleri ( $^{\circ}\text{C}$ )	$R^2$	Denklem
4 $^{\circ}\text{C}$	0,1582	$y = -5,668x + 6,3993$
25 $^{\circ}\text{C}$	0,9755	$y = -146,62x + 12,235$
35 $^{\circ}\text{C}$	0,6675	$y = -130,17x + 12,755$
45 $^{\circ}\text{C}$	0,6792	$y = -208,92x + 13,776$

Elde edilen bulgular sonucunda sıcaklık artırıldıkça biyosensörün biyoaktif tabakasında bozunmalar olduğu görülmüştür. 45 $^{\circ}\text{C}$ ' de biyoaktif tabaka ikinci ölçümden sonra düştüğü için diğer ölçümler alınamadı. 35 $^{\circ}\text{C}$ ' de ise enzim aktivitesinin kaybolduğu gözlemlendi. Tablo 4.7' de görüldüğü gibi  $R^2$  ve denklemleri hesaplandı. Bu nedenle elastaz biyosensörü için tabloda da görüldüğü gibi  $R^2$  si en yüksek olan en uygun sıcaklık 25 $^{\circ}\text{C}$  olarak belirlendi.

## 4.2 Biyosensör Karakterizasyonu

### 4.2.1 Biyosensörün lineer ölçüm aralıkları

Bu amaçla; optimize edilen immobilizasyon parametrelerine göre hazırlanan biyosensörlerle farklı elastaz konsantrasyonlarında ölçümler yapılarak, elastaz ölçüm aralıkları belirlendi. Ölçümler optimum koşullarda gerçekleştirildi. Ölçüm sonuçlarından  $R^2$ lerine göre enzimin 0,0303U/ml – 0,0729U/ml konsantrasyonu aralığında kalibrasyon grafiği belirlendi.



Şekil 4.8. Kalibrasyon grafiği

#### 4.2.2 Biyosensörün tekrarlanabilirliği

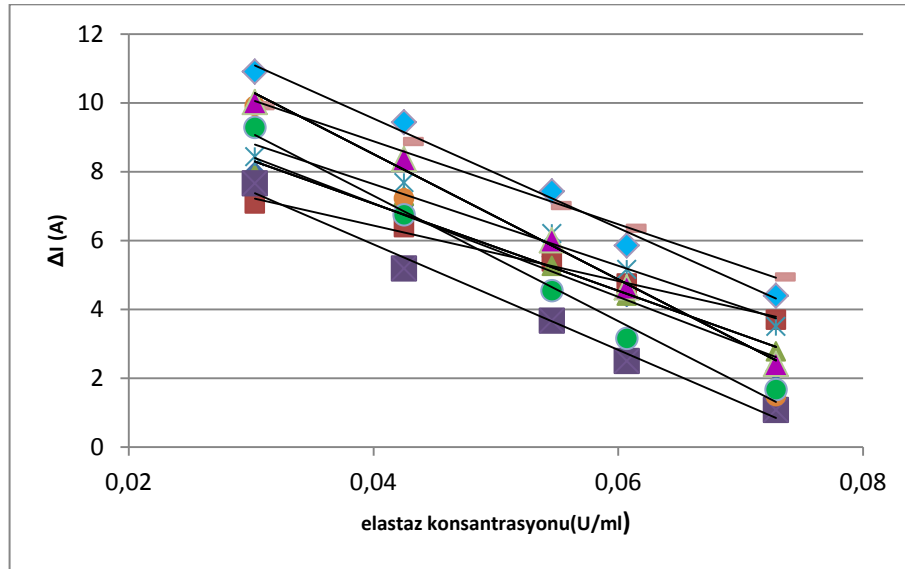
Biyosensörün en önemli karakterizasyon çalışmalarından bir tanesi de tekrarlanabilirlik denemeleridir. Bir biyosensörden beklenen en önemli performans kriterlerinden birisi onun tekrarlanabilir sonuçlar veriyor olmasıdır. Tekrarlanabilirlik en genel anlamıyla ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının bir ifadesidir. Geliştirilen biyosensörün üç farklı elastaz konsantrasyonu için standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı. Bu veriler aşağıdaki tabloda gösterilmiştir. (Tablo 4.8.)  $R^2$ 'lerde görüldüğü gibi elde edilen bulgular, geliştirilen biyosensörün elastaz aktivitesinin tayini için, oldukça uygun bir yöntem olabileceğini göstermiştir. Ayrıca standart sapma yardımıyla istatistik t değeri kullanılarak güven aralığıda hesaplandı.

**Tablo 4.8.** Elastazın üç farklı konsantrasyonu için hesaplanan ortalama değer, standart sapma, varyasyon katsayı ve güven aralığı değerleri

Elastaz Konsantrasyonu	Ortalama Değer (Xi)	Standart Sapma (Ss)	Varyasyon Katsayısı ( C.V)	t.s/ $\sqrt{N}$
0,0303	0,0374 U/mL	$\pm 0,00272$ U/mL	% 7,27	$\pm 0,0019$
0,0541	0,0594 U/mL,	$\pm 0,0043$ U/mL	% 7,23	$\pm 0,0030$
0,0728	0,0864 U/mL	$\pm 0,0042$ U/mL	% 4,86	$\pm 0,0030$

### 4.2.3 Biyosensörün tekrar üretilebilirliği

Biyosensörlerinin rutin analizlerde kullanılabilirliklerinin mümkün kılınabilmesi onların doğru, güvenilir ve aynı standartta tekrar tekrar üretilip üretilmedikleriyle ilişkilidir. Dolayısıyla yeni bir biyosensör geliştirildikten sonra incelenmesi gereken en önemli karakteristik özelliklerden bir tanesi de o biyosensörün tekrar üretilebilirliğinin ne düzeyde standart olabildiğidir. Bu amaca yönelik yapılan çalışmanın sonuçları Şekil 4.9’ de gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Biyosensörün tekrar üretilebilirliği

Tablo 4.9. Biyosensörün tekrar üretilebilirliği grafiklerinin  $R^2$  leri ve denklemleri

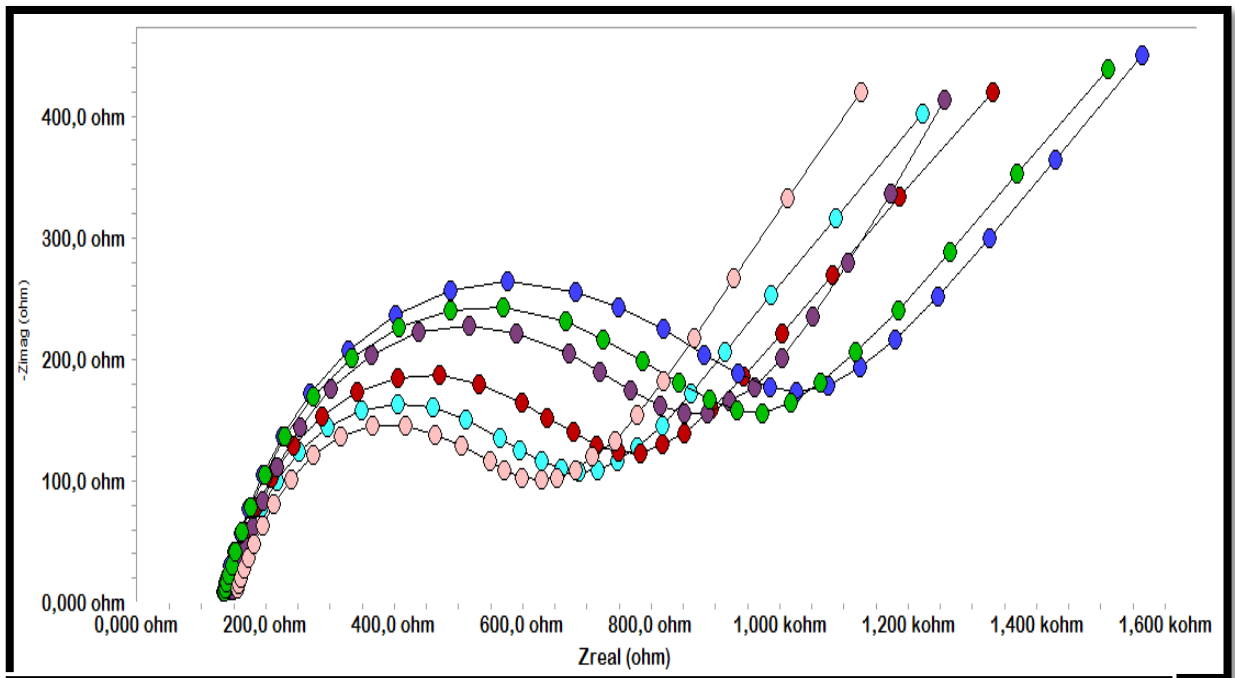
Tekrar üretilebilirlik	$R^2$	Denklem
1	0,9901	$y = -202,77x + 15,839$
2	0,9881	$y = -158,92x + 15,897$
3	0,9942	$y = -182,17x + 15,799$
4	0,9926	$y = -120,38x + 13,698$
5	0,9906	$y = -181,98x + 14,58$
6	0,9754	$y = -118,43x + 12,376$
7	0,9904	$y = -80,537x + 9,6609$
8	0,9744	$y = -126,44x + 12,13$
9	0,9706	$y = -135,83x + 12,516$
10	0,9891	$y = -153,32x + 12,022$



Şekil 4.9.'da görüldüğü gibi her bir biyosensör için elde edilen elastaz aktivitesine ilişkin standart grafikler hem tayin alt sınır değerleri hem de doğrusal tayin aralıkları bakımından birbirine oldukça benzer çıkmıştır. Tablo 4.9' da görüldüğü gibi  $R^2$  ve denklemleri hesaplandı. Bu tabloya göre her birinin  $R^2$  değerleri de hem çok iyi hem de birbirine çok yakındır. Bu sonuçlar biyosensörün tekrar üretilebilirliğinin oldukça iyi olduğunu göstermektedir.

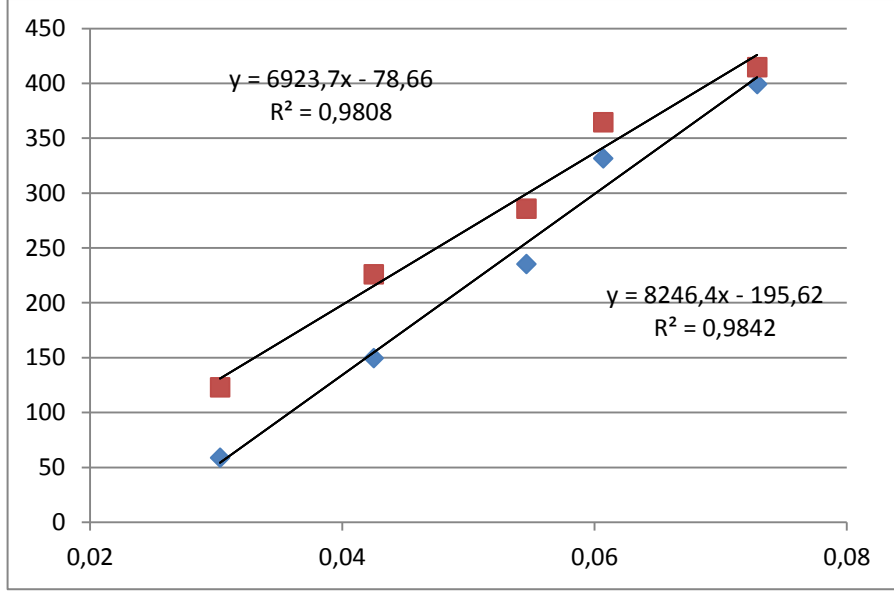
#### 4.2.4 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Karakterizasyonu

Geliştirilen biyosensör aynı ölçüm sırasıyla hazırlanarak kronoamperometrik ölçümlerin sonrasında Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi uygulanmıştır. Üretilen biyosensör sistemi Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi ve kronoamperometride tutarlı sonuçlar vermiştir. Kronoamperometrik ölçümde elastaz yüzeyi bozduğundan sinyal azalmaktadır. Bu nedenle Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisinde de redoks probunun difüzyonunu bozduğu için elektrotransfer direncinde sinyallerde artış görülmektedir. (Şekil 4.10). Şekil 4.11' de görüldüğü gibi yapılan EIS uygulamalarındaki  $R^2$  değerlerinde birbirine yakındır.



● jelatin+GOD+CNT ● 0,0303 U/ml elastaz ● 0,0425 U/ml elastaz ● 0,0546 U/ml elastaz ● 0,0607 U/ml elastaz ● 0,0729 U/ml elastaz

Şekil 4.10. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi



Şekil 4.11. EIS'nin  $R^2$ 'leri ve denklemleri

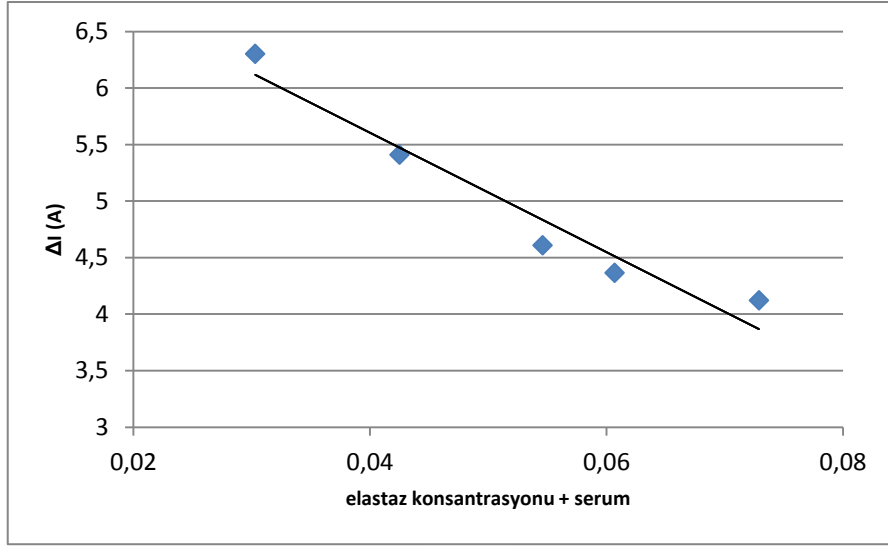
#### 4.2.5 Biyosensörün gerçek örneklerle uygulanabilirliğinin incelenmesi

Tez çalışmasının son kısmını elastaz aktivitesinin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörle, gerçek serum örneklerinde elastaz aktivitesinin belirlenmesini oluşturmaktadır. Geliştirilen yeni biyosensör gerçek serum örneklerinde elastaz tayini için uygulandı. Bu çalışmalar iki şekilde gerçekleştirildi. İki çalışmada da kan örneği santrüfuj yapılarak serumu alındı.

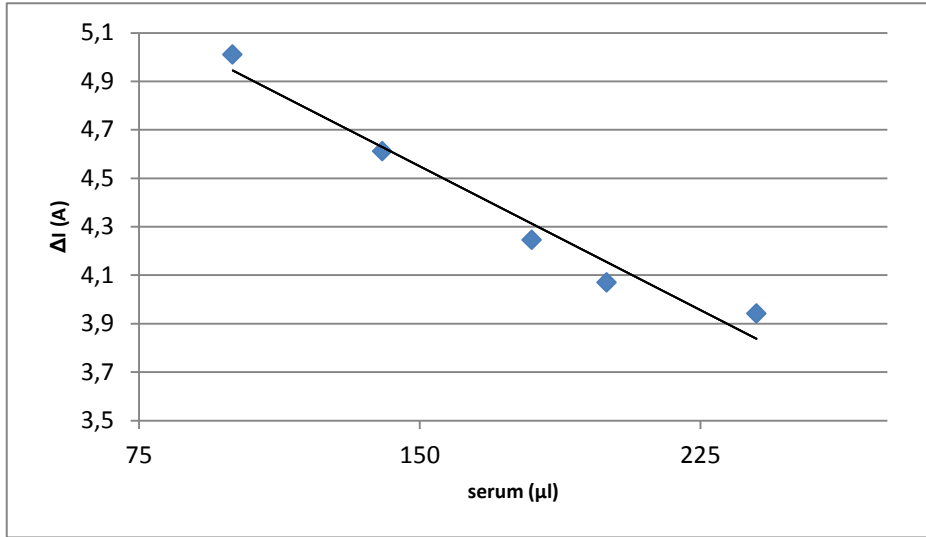
İlk çalışmada her bir konsantrasyon için 0,0303U/ml, 0,0425U/ml, 0,0546U/ml, 0,0607U/ml, 0,0729U/ml'lik elastaz çözeltisi ve 100µl serum içinde (pH 8,5, ve 50 mM NaHCO<sub>3</sub> tamponu)1 saat inkübasyona bırakıldı. Her bir sürenin sonunda 1M'lık 60µl glukoz eklenerek tekrar kronoamperometrik ölçüm alındı.

İkinci çalışmada ise sadece serum örneği kullanıldı. Serum örneğinden 100µl, 140µl, 180µl, 200µl, 240µl alınarak (pH 8,5, ve 50 mM NaHCO<sub>3</sub> tamponu)1 saat inkübasyona bırakıldı. Her bir sürenin sonunda 1M'lık 60µl glukoz eklenerek tekrar kronoamperometrik ölçüm alındı.

Gerçek serum örneklerinin standart grafikleri çizilerek (Şekil 4.12),  $R^2$  değerleri ve denklemleri hesaplandı (Tablo 4.10). Gerçek serum örnek uygulamalarında elastaz enziminin kanda aktif olarak bulunduğunu gözlemlendi.



a)



b)

**Şekil 4.12.** Geliştirilen biyosensörün gerçek serum örneklerinde uygulanabilirliğini inceleme (a) elastaz + serum örneği (b) serum örneği

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

Gerçek örnek	$R^2$	Denklem
Elastaz + serum	0,9449	$y = -52,789x + 7,7164$
Serum	0,9646	$y = -0,0079x + 5,7356$

## 5. SONUÇLAR

Proteinlerin dönüşümünü, sentezini ve aktivasyonunu kontrol ederek fizyolojik süreçlerin en önemli düzenleyicisi olan proteazlar; gebeliğin başlaması, doğum, sindirim, gelişme, olgunlaşma, yaşlanma ve hatta tüm organizmaların ölümünde çok önemli düzenleyici rol oynarlar. Proteazlara lizozomlarda protein yıkımından hücre bölünmesine kadar çeşitli biyolojik sistemlerde rastlanmıştır. Ayrıca proteazlar virüsler ve omurgalılar gibi çeşitli organizmalarda bulunmaktadır. Proteaz mekanizmaları, 10 kDa'lık monomerlerden multimerik komplekslere kadar olan peptidlerin ve proteinlerin amid bağlarının kırılmasını katalizlemektedir. Bu özellikleri proteazların biyolojik katalizörler olarak önemini zaten açıklamaktadır. Proteazlar; protein katabolizması, kanın pıhtılaşması, hücre büyümesi ve göçü, doku düzenlenmesi ve zimojenlerin aktivasyonu, öncül proteinlerden hormonların ve farmakolojik olarak aktif peptidlerin ayrılması, proteinlerin membranlardan geçişini sağlanması gibi birçok fizyolojik ve patolojik proseste çok önemli rol oynamaktadır.

Elastaz ve tripsinin aktif yerine geri dönüşümsüz olarak bağlı olan akut fazdaki protein  $\alpha$ -1-antitripsin (A1AT), tarafından inhibe edilir. A1AT, normal olarak serum içinde karaciğer hücreleri tarafından salgılanır.  $\alpha$ 1-antitryspin eksikliği (A1AD) elastaz tarafından elastik lifin yıkımına yol açar.

Sonuç olarak, elastaz enziminin yetersiz sentezlenmesi, metabolizma açısından ciddi rahatsızlıklara neden olmaktadır. Bu hatalıkların her aşamasında çok detaylı bir şekilde incelenip aydınlığa kavuşturulabilmesi ve etkili tedavi yollarının bulunabilmesi için ilgili enzimin öncelikle buldukları ortamdaki aktivitelerinin doğru ve hassas bir şekilde tayin edilmesi önem taşımaktadır.

Bu çalışmada enzim elektrotları yoluyla enzim aktivitesi tayinine yönelik biyosensör geliştirilmesi hedeflenmesi açısından biyosensör teknolojilerine yeni ve orijinal bir açılım sunması yönüyle de ayrıca önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında da elastaz akitivitesi tayini için spesifik, ekonomik ve duyarlı yeni bir biyosensör geliştirildi. Elastaz, glukoz oksidazın biyo aktif tabakasını hidrolizleyerek enzimin aktivitesiyle doğru orantılı bir aktivite kaybı gerçekleştirmiştir.

Yapılan optimizasyonlarda da jelatin miktarı 7,5 mg, elastaz inkübasyon süresi 60 dk, glukoz oksidaz konsantrasyonu 18 unite, karbonnanotüp miktarı 0,5 mg, elastaz inkübasyonun yapıldığı NaHCO<sub>3</sub> tamponunun pH'ı 8,5, çalışma potansiyeli 0,4 V ve optimum sıcaklıkta 25<sup>0</sup>C olarak belirlenmiştir.

Kronoamperometrik çalışmaların yanı sıra, biyosensörün elektrokimyasal impedans spektroskopisi karakterizasyonu da yapıldı ve çalışma neticesinde ürettiğimiz biyosensör sistemi gerçek örneklere uygulandı. Elde edilen sonuçlar, kullanılan biyosensör sisteminin tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirliğinin mevcut olduğunu ve ileriki çalışmalarda bu özelliğinin kullanılabileceğini göstermektedir.

Üretilen biyosensör sistemi Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi ve kronoamperometride tutarlı sonuçlar vermiştir. Kronoamperometrik ölçümde elastaz yüzeyi bozduğundan sinyal azalmaktadır. Bu nedenle Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisinde de redoks probunun difüzyonunu bozduğu için elektrotransfer rezidansında sinyallerde artış görülmektedir.

Elastaz aktivitesi tayinine yönelik olarak geliştirilen biyosensörün yüksek tekrarlanabilir cevaplar vermesi bu anlamda çok önemli bir avantaj oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra her bir biyosensörün tekrar üretilebilirlikleri de çok iyidir. Bu avantaj biyosensörün fabrikasyonu açısından çok büyük önem taşımaktadır. Kolay hazırlanabilmesi ve ölçüm alınabilmesi de söz konusu biyosensörlerin rutin analizlerde kullanım pratikliğini artırmaktadır. Önemli noktalardan bir tanesi de biyosensörün maliyetinin düşük olmasıdır.

## 6.KAYNAKLAR

- Aiba, S., Humphrey, A.E. and Miles, N.F. (1973). *Biochemical Engineering*, Academic.
- Anonim (2011). İnternet: “Enzymes Business”  
<http://report2010.novozymes.com/Menu/Novozymes+Report+2010/Report/Sales+and+markets/Enzyme+Business>. (Erişim tarihi 23.05.2014)
- Anonim (2011). İnternet: “Enzymes in Industrial Applications: Global Markets”  
<http://www.marketresearch.com/product/display.asp?ProductID=6060223>. (Erişim tarihi 23.05.2014)
- Anonim (2011). “Endoproteases”.  
[http://www.nature.com/nature/journal/v459/n7245/box/nature08146\\_BX1.html](http://www.nature.com/nature/journal/v459/n7245/box/nature08146_BX1.html)  
(Erişim tarihi 14.04.201)
- Anwar, A., Saleemuddin M. (1998). “Alkaline proteases: a review”, *Bioresource Technology*, 64: 175-183.
- Bailey, J.E., and Ollis, D.F. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd Edition, McGraw Hill, New York.
- Bartlett, P.N. (1990). *Biosensors*, (Cass, A.E.G. ed.), Oxford University Press, Oxford, 42.
- Berggren C, Bjarnason B, Johansson G (2001). Capacitive biosensors. *Electroanalysis*, 13: 173-180.
- Burtis, C. A., Ashwood, E. R. (2007). “Klinik Kimyada Temel İlkeler, 5.baskı”, D., Aslan, Palme Yayıncılık, Ankara, 159-160
- Coulet PR (1991). *Biosensor principles and applications*. Marcel Dekker Inc., New York, 1-6.
- Daniels JS, Pourmand N (2007). Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges. *Electroanalysis*, 19: 1239- 1257.
- Devlin, T. M. (2006). “Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, 6th ed.”, Wiley Liss pub., Hoboken, 367, 390
- Dinçkaya, E. (1999). *Biyosensörler*, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir, 81–142 s.
- Friebe A, Lisdat F, Moritz W (1993). Polymer Membranes on Chemical Semiconductor Devices-Their Electrical Influence on Sensor Characterization. *Sens Mater*, 5: 65-82.
- Genckal, H., Tari, C (2006). “Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats”, *Enzyme and Microbial Technology* 39: 703–710.
- Grudkowska M., Zagdańska B. (2004). “Multifunctional role of plant cysteineproteinases”, *Acta Biochimica Polonica*, 51(3): 609-624.
- Guan JG, Miao YQ, Zhang QJJ (2004). *Bioscience and Bioengineering*, 97: 219-225.

- Gupta, R., Beg, Q. K., Lorenz, P. (2002). "Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications", *Appl Microbiol Biotechnol* 59: 15– 32.
- Hall EAH (1990). *Biosensors, Ch.1: Biosensors in context*, Open University Press, İngiltere; 3-30.
- Joo, H.-S., Kumar, C.G., Park, G.-C., Paik, S.R., and Chang, C.-S. (2003). "Oxidant and SDS stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: production and some properties", *Journal of Applied Microbiology*, 95: 267–272.
- J.P. Chambers, B.P. Arulanandam, Matta LL, Weis A, Valdes JJ. Biosensor recognition elements. *Curr Issues Mol Biol* 2008; 10(1-2):1-12.
- Kazan, D., Denizci, A. A., Kerimak Oner, M. N., Erarslan, A. (2005). "Purification and characterization of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42", *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 32: 335–344.
- Kato T, Yamagata Y, Arai T, Ichishima E. (1992). "Purification of a new extracellular 90-kDa serine proteinase with isoelectric point of 3.9 from *Bacillus subtilis* (natto) and elucidation of its distinct mode of action", *Biosci Biotech Biochem*, 56:1166– 1168.
- Katz E, Willner I (2003). Nanoparticle arrays on surfaces for electronic, optical, and sensor applications. *Electroanalysis*, 15: 913-947.
- Kleppet, K. (1966). The effect of hydrogen peroxide on glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochemistry* 5:139–143
- Koolman, J., Roehm, K. H. (2005). "Color Atlas of Biochemistry, 2nd ed", Thieme, Stuttgart,151.
- Krause S (2007). *Encyclopedia of electrochemistry*. Wiley VCH, Weinheim.
- Kumar, C.G., Takagi, H.(1999). "Microbial alkaline proteases: From abioindustrial viewpoint", *Biotechnology advances*, 17: 561-594.
- Macdonald JR (1987). Impedance spectroscopy and its use in analyzing the steady-state AC response of solid and liquid electrolytes *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 223: 25-50.
- Maurer, K. H.(2004). "Detergent Proteases", *Current Opinion in Biotechnology*, 15: 330-334.
- Montgomery, R., Conway, T. W., Spector, A. A. (2000). "Biyokimya Olgu Sunumlu Yaklaşım 6. baskı", N., Altan, Palme Yayıncılık, Ankara, 74.
- Moritz W, Szeponik J, Lisdat F, Friebe A, Krause S, Hintsche R, Scheller F (2001). Diversiform applications of LaF<sub>3</sub> for chemical semiconductor sensors. *Sens Actuators B* 7: 497-501
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W.(1998). "Harper"ın *Biyokimyası*, 24. Baskı" , Barış Kitabevi, İstanbul, 68-69.

- Nakamura, S., Fujiki, S. (1968). Comparative studies on the glucose oxidases of *Aspergillus niger* and *Penicillium amagasakiense*. *J Biochem* 63:51–58.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. (2005). “Biyokimyanın İlkeleri, 3.baskı”, N. Kılıç, Palme Yayıncılık, Ankara, 115, 244-246, 266.
- Nilegaonkar, S.S., Zambare, V.P., Kanekar, P.P., Dhakephalkar, P.K., Sarnaik, S.S.(2007). “Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326”, *Bioresource Technology*, 98: 1238– 1245.
- Onat T, Emerk, K.(1997). “Temel Biyokimya”, Saray Medikal Yayıncılık, İzmir 785-802.
- Otin, C. L., Bond, J. S.(2008). “Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease”, *The Journal of Biological Chemistry*, 283(45): 30433-30437.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., and Deshpande, V. V.(1998). “Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases”, *Microbiology and Molecular Biology reviews*, 62(3): 597-635.
- Rawlings N. D., Morton, F. R., and Barrett, A. J.(2007). “An Introduction to Peptidases and the MEROPS Database” *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*, Springer, Dordrecht, 161-171.
- Rubinstein I (1995). *Physical electrochemistry Methods and Principles*. Marcel Dekker, New York.
- Saby C, Jaffrezicrenault N, Martelet C, Colin B, Charles MH, Delair T, Mandrand B (1993). Immobilization of antibodies onto a capacitance silicon-based transducer. *Sensors and Actuators B:Chemicals*, 16: 458-462.
- Shen H, Chou K (2009). Identification of proteases and their types. *Analytical Biochemistry*, 385 : 153-160.
- Singh, J., Vohra, R.M., Sahoo, D.K.(1999). “Alkaline protease from a new obligate alkalophilic isolate of *Bacillus sphaericus*” *Biotechnology Letters* 21: 921– 924.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. (1997). *Principles of Instrumental Analysis*, Brooks/Cole, p. 325.
- Sonuç, M.N. (2011). *Bacillus Subtilis* M33’den Hücre Dışı Alkali Proteaz Enziminin Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kimya, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Sookkheo, B., Sinchaikul, S., Phutrakul, S., and Chen, S.T. (2000). “Purification and Characterization of the Highly Thermostable Proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33”, *Protein Expression and Purification* 20: 142– 151.



- Swoboda, B.E.P., Massey, V. (1965). Purification and properties of the glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *J Biol Chem* 240:2209– 2215.
- Tekman, Ş., Önder, N (1987). “Genel Biyokimya, 4 baskı”, İstanbul üniversitesi yayınları, İstanbul, 356.
- Telefoncu, A., (1999). Mikrobiyal Biyosensörler, Biyosensörler (Ed. Azmi Telefoncu) 178-185, Ege Üniversitesi yayınları.
- Timur, S. Pazarlıoğlu, N., Pilloton, R., Telefoncu, A., (2003). Detection of phenolic compounds by thick film sensors based on *Pseudomonas putida*. *Talanta*, 61, 87-93.
- Tong, L. (2002). “Viral Proteases”, *Chem. Rev.*, 102: 4609–4626.
- Turner APF (1987). "Biosensors: Fundamentals and Applications", Oxford University Press, Oxford, 5-7.
- Tsuge, H., Natsuaki, O., Ohashi K. (1975). Purification, properties, and molecular features of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *J Biochem* 78:835–843.
- Turk, B (2006) “Targeting proteases: successes, failures and future prospects”, *Nature Reviews*, 5: 785-799.
- Vlassara H, Brownlee M. Cerami A: High affinity receptor mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins: a potential mechanism for the removal of senescent macromolecules. *Proc. Natl. Acad Sci.* 82; 5588.
- Yetim, A (2011). Karbon nano tüpler. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Wilson, R., Turner, A.P.F. (1992). Glucose oxidase: an ideal enzyme. *Biosens. Bioelectron.* 7:165–185.

## **ÖZGEÇMİŞ**

Şükran Gülden YEŞİLLER, 04 Ekim 1990 Bergama/İZMİR doğumludur. İlköğretimini Ali Rıza Eroğlu İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimini Akif Ersezgin Anadolu Lisesi'nde 2008 yılında, lisans öğrenimini ise Namık Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde 2012 yılında tamamlamıştır.