

Tirozinaz Enziminin Kompetitif İnhibitörlerinin Tayinine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi

Banu ERGÜN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Kimya Anabilim Dalı

Temmuz 2010

Development of a Biosensor for Determination Competitive Inhibitors of Tyrosinase

Banu ERGÜN

**MASTER OF SCIENCE THESIS**

Department of Chemistry

July 2010

Tirozinaz Enziminin İnhibitörlerinin Tayinine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi

Banu ERGÜN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca  
Kimya Anabilim Dalı  
Biyokimya Bilim Dalında  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Yrd. Doc. Dr. Temir Ali DEMİR

Temmuz 2010

## ONAY

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Banu ERGÜN'ün YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Tirozinaz Enziminin Kompetitif İnhibitörlerinin Tayinine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

**Danışman** : Yrd. Doç. Dr. Temir Ali DEMİR

**İkinci Danışman** : Doc. Dr. Erol AKYILMAZ

**Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:**

Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Bu çalışmada tirozinaz enziminin kompetitif inhibitörlerinin tayini için tirozinaz temelli enzimatik biyosensör geliştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda tirozinaz enzimi immobilizasyon materyali olarak jelatin ve çapraz bağlayıcı reaktif olarak glutaraldehid kullanılarak çözünmüş oksijen probu membranı yüzeyinde immobilize edildi. Substrat olarak fenol kullanıldı. Hazırlanan biyosensörde öncelikle kompetitif inhibitör denemeleri yapıldı. İnhibitör olarak sistein, sodyum metabisülfid, tiyoüre, glutationun denenmiş olup inhibitör davranışları gözlemlendi. Optimizasyon çalışmalarında en iyi inhibitör cevabı alınan sistein kullanıldı. Yapılan çalışmalarda en uygun enzim miktarı 53 U/cm<sup>2</sup>, jelatin miktarı 5 mg jelatin/cm<sup>2</sup>, glutaraldehid yüzdesi % 2,5 belirlendi. Çalışma koşullarının optimizasyonu için yapılan denemelerde optimum çalışma ortamı olarak (50 mm) pH:7 olan potasyum fosfat tamponunun kullanılmasına ve ölçümlerin 35°C'de yapılması gerektiğine karar verildi. Geliştirilen biyosensörün karakterizasyon çalışmaları sonucunda 250 mM ve 1000 mM inhibitör konsantrasyonu aralığında doğrusal sonuçlar alındı. Aynı enzimin operasyonel kararlılığı da belirlendi.

Anahtar Kelimeler : Biyosensör, Tirozinaz, Fenol, Tirozinaz inhibisyonu ,Oksijen elektrodu

## SUMMARY

In this study, a tyrosinase based biosensor was developed for determination of the competitive inhibitors of tyrosinase. To construct the biosensor tyrosinase enzyme was immobilized by using gelatine and cross-linking agent glutaraldehyde on a dissolved oxygen probe covered with a teflon membran which is sensitive for oxygen. Phenol is used as a substrate. Firstly examine the inhibitors cysteine, sodium metabisulfite, thiourea and glutathione. In the optimization studies cysteine was used because its inhibitor effect showed the best result. The optimum enzyme activity  $53\text{U}/\text{cm}^2$ , 5mg gelatine and 2.5% glutaraldehyde concentration was determined. Optimum pH and temperature were found at pH 7 and  $35^\circ\text{C}$ . The inhibitor concentrations between 250 mM to 1000 mM showed linear results with this biosensor. Operational stability was studied for this enzyme.

**Key Words:** Biosensor, Tyrosinase, Phenol, Tyrosinase inhibition, Oxygen electrode.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım günden itibaren danışmanlığımı üstlenen, her adımda beni yönlendiren, bana olan güvenini göstererek çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için her türlü imkanı sağlayan Danışman Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Temir Ali DEMİR'e minnet ve şükranlarımı sunarım.

Lisans eğitimimde olduğu gibi yüksek lisans eğitimimde de bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Erol AKYILMAZ'a minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarımı yürütebilmem için imkan sağlayan hocalarım Sayın Doç. Dr. Tamer AKAR'a ve Sayın Doç. Dr. Sibel AKAR'a teşekkürler ve saygılar sunarım.

Hayatımın her aşamasında bana büyük emekler vererek bugünlere gelmemi sağlayan, gösterdikleri sabır, ilgi ve sevgiyle her durumda beni destekleyen babam Ali ERGÜN'e ve annem Gülderen ERGÜN'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca paylaşımlarından dolayı arkadaşlarım Melike DİVRİKLİOĞLU ve Sema ÇELİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmanın gerçekleşmesinde önemli katkıları olan Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezine teşekkürlerimi sunarım.

Banu ERGÜN

## İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ .....	1
1.1. Biyosensörlere Genel Bir Bakış.....	1
1.1.1. Biyosensörler .....	2
1.1.2.İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler: .....	6
1.1.3.Biyosensör çeşitleri .....	8
1.1.4.Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz alanı.....	10
1.1.5.Biyosensörlerin Uygulamaları.....	19
1.1.6 Biyokomponentlerin immobilizasyonu .....	22
1.2 Fiziksel Tayin Yöntemleri .....	28
1.2.1 Elektrokimyasal esaslı tayinler.....	28
1.2.2 Yarı iletkenleri esas alan sensörler .....	32
1.2.3 Termometrik Esaslı Tayinler.....	33
1.2.4 Piezoelektrik Esaslı Tayinler.....	34
1.2.5 Fotometrik esaslı tayinler .....	36
1.3 Kimyasal tayin yöntemleri.....	37
1.3.1.Transformasyon reaksiyonları .....	37
1.3.2. Bağlanma reaksiyonları .....	37
1.4.Fenol ve Tirozinaz .....	38
1.5 Enzim Sensörünün Genel çalışma ilkesi.....	39
1.6.Jelatin.....	40
1.7.Glutaraldehid .....	41
2. MATERYAL METOD .....	42
2.1. Materyal .....	42
2.1.1. Araç – Gereçler.....	42
2.1.2. Kimyasallar.....	42
2.2. Çözünmüş Oz Probenun Çalışma İlkesi .....	42
2.3. Tirozinaz Enziminin Kompetitif İnhibitörlerinin Tayinine Yönelik .....	44
Geliştirilen Biyosensörün Çalışma İlkesi .....	44



## İÇİNDEKİLER (devam)

2.3.1. Tirozinaz Enziminin Kompetitif İnhibitorlerine Yönelik Biyosensör Hazırlanması .....	45
2.3.2. Enzim Temelli Biyosensör ile Tirozinaz Kompetitif İnhib. Tayini için Ölçüm düzeneği.....	46
2.4. Tirozinaz Enziminin Kompetitif İnhibitorlerinin Tayini: .....	46
2.5. Tirozinaz Enziminin Kompetitif İnhibitorleri Tayinine Yönelik Geliştirilen Biyosensörün Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyonu.....	47
2.5.1 Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi .....	47
2.5.2 Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi .....	47
2.5.3 Glutaraldehid miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	48
2.6 Tirozinaz Enziminin Kompetitif İnhibitorlerinin Tayinine Yönelik Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonu .....	49
2.6.1. Optimum pH değerinin belirlenmesi: .....	49
2.6.2. Optimum sıcaklığın belirlenmesi: .....	49
2.7 Tirozinaz Enziminin Kompetitif İnhibitor Tayinine Yönelik Biyosensör Karakterizasyonu: .....	49
<b>3. BULGULAR VE TARTIŞMALAR .....</b>	<b>51</b>
3.1. Tirozinaz Enziminin Kompetitif İnhibitorlerinin Tayinine Yönelik Bulgular .....	51
3.2. Tirozinaz Enziminin Kompetitif İnhibitorlerinin Tayinine Yönelik Biyosensörde Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyonuna İlişkin Bulgular.....	52
3.2.1 Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin incelenmesi: .....	52
3.2.2 Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi .....	53
3.2.3 Glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisi .....	54
3.3 Tirozinaz Enziminin Kompetitif İnhibitorlerinin Tayinine Yönelik Geliştirilen Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonuna Yönelik Bulgular: .....	56
3.3.1. Optimum pH.....	56
3.3.2. Optimum sıcaklık .....	57

**İÇİNDEKİLER (Devam)**

3.4 Tirozinaz Enziminin Kompetitif İnhibitörlerin Tayinine Yönelik Biyosensörün Karakterizasyonuna Yönelik Bulgular .....	58
3.4.1. Tirozinaz enzimin kompetitif inhibitörlerinin tayin aralığı .....	58
3.4.2. Operasyonel kararlılık .....	58
4. Sonuç .....	60
<b>KAYNAKLAR DİZİNİ .....</b>	<b>61</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b><u>Sekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
1.1. Biyosensörün genel şematik gösterimi .....	3
1.2. Biyosensörlerin çalışma prensibi .....	4
1.3. Sistematik biyosensör şeması .....	5
1.4. Biyosensörlerin çalışma prensibinin şematik gösterimi .....	5
1.5. Biyoafinite esaslı biyosensör .....	8
1.6. Transmembran esaslı biyosensör .....	9
1.7. Biyokatalitik esaslı biyosensör ve immobilize hücre esaslı biyosensör .....	10
1.8. Hücre ve doku temelli biyosensörlerin çalışma şekli .....	13
1.9. İçme sularının doğal kaynaklarının analizi için geliştirilen doku biyosensörü sistemleri .....	16
1.10. İmmüno biyosensörlerin çalışma şekli .....	17
1.11. Temel immobilizasyon yöntemleri .....	22
1.12. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması .....	23
1.13. Biyosensörlerin biyoaktif tabakalarında biyoaktif bileşen immobilizasyonunda kullanılan genel teknikler .....	28
1.14. Potansiyometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi .....	29
1.15. Potansiyometri esaslı biyoaktif bileşen olarak enzimlerin kullanıldığı bir grup biyosensör .....	31
1.16. Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi .....	31
1.17. Enzim olan etki transistorunun şematik gösterimi .....	33
1.18. Termal enzim sensörünün şematik gösterimi ve bazı enzim katalizli reaksiyonların molar entalpi değerleri .....	34
1.19. Piezoelektrik esaslı enzim sensörünün şematik gösterimi .....	35
1.20. Piezoelektrik esaslı enzim sensörünün virüslerin tayininde kullanımının şematik gösterimi .....	35
1.21. Optik esaslı enzim sensörünün şematik gösterimi .....	36
1.22. Bazı fenolik bileşikler .....	38
1.23. Enzim sensörünün genel çalışma ilkesi .....	40
2.1. Çözünmüş oksijen probunun şematik gösterimi .....	43

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<b><u>Şekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.2. Oksijenin reaksiyon ortamından katoda ulaşana kadar karşılaştığı difüzyon engellerinin şematik gösterimi .....	44
3.1. Tirozinaz enzimine inhibitör etkisi gösteren maddelerin incelenmesi .....	51
3.2. Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi .....	52
3.3. Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi .....	53
3.4. Glutaraldehid miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi .....	55
3.5. pH değerlerinin oksijen konsantrasyonu üzerinde etkisi .....	56
3.6. Sıcaklık değerinin oksijen konsantrasyonu üzerinde etkisi .....	57
3.7. Tirozinaz inhibitörünün uygun konsantrasyon aralığı .....	58
3.8. Biyosensörün zamana bağlı operasyonel kararlılığı .....	59

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

<b><u>Çizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
1.1. Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz alanları .....	22
1.2. İmmobilizasyonda kullanılan taşıyıcıların genel özellikleri .....	26
1.3. Genel aktivasyon/bağlanma şeması .....	27

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b><u>Simgeler</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
°C	Santigrat derece
pH	Çözeltideki hidrojen iyonu molar derişiminin eksi logaritması
pI	İzoelektrik nokta
U	Unit
$\Delta\text{Ç1}$	Çözünmüş oksijen değişimi
$\Delta\text{H}$	Entalpi değişimi
$\Delta\text{O}$	Oksijen miktarındaki değişim
$\Delta\text{I}$	İlk ölçümde alınan oksijen miktarındaki değişim

<b><u>Kısaltmalar</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
$\mu\text{m}$	Mikrometre
ADP	Adenindifosfat
ATP	Adenintrifosfat
BOİ	Biyolojik Oksijen İhtiyacı
Cys	Sistein
GA	Gluteraldehit
NADH	Nikotin amid di hidrojen
Mg	Miligram
mm	Milimetre
mM	Milimolar
Red	Redüktant
Ox	Oksidant
ISFET	İyon seçimli alan etki transistorleri
ENFET	Enzim alan etki transistorleri
IMFET	İmmunolojik alan etki transistörleri

## 1.GİRİŞ

### 1.1.Biyosensörlere Genel Bir Bakış

Biyosensörler çoklu komponent örneklerini önceden ayırmaksızın, doğal matrixlerde, analitleri seçici olarak ölçebilecek şekilde tasarlanan farklı analitik aletlerdir. İlk biyosensör uygulaması 1962 yılında Clark ve Lyons'un glukoz oksidaz enzimini oksijen elektrodu ile kombine ederek kanın glukoz düzeyini ölçmeyle başlamıştır. Biyosensörler (biyo-alıcılar, biyolojik dedektörler) biyolojik materyallerin alıcılar ile tesbit edilip ölçülebilir sinyallere dönüştürüldüğü aletlerdir. Alıcılar tarafından tesbit edilen tanımanın sinyale dönüştürülmesinde kullanılan metodlara göre, bu biyosensörleri kabaca (1) optik sensörler ve (2) elektrokimyasal sensörler olarak iki gruba ayırabiliriz. Son yıllarda optik sensörler biraz daha geliştirilmiş ve biyokimyacılar için çok önemli araçlar haline gelmiştir. Sensörlerde kullanılan biyolojik materyalleri tanıma elementlerini genel olarak şöyle sıralanabilir: enzimler, mikroorganizmalar, bitkisel ve hayvansal dokular, antikorlar, reseptörler, nükleik asitler. Tesbit edilmesi gereken materyale ilgisi olan, alıcı element (veya elementler) biyosensör yüzeyine kimyasal metodlar ile sabitlenir, yani immobilize edilir. Daha sonra ortam içerisinde istenen molekül veya mikroorganizma olan çözelti ilave edildiğinde, alıcı ile bu biyolojik materyal birbirlerine bağlanırlar. Bu bağlanma ise kullanılan sensör cinsine göre elektrik veya optik metodlarla sinyale dönüştürülerek algılanır. Eğer ortamda istenen biyokimyasal materyal yok ise, sinyal gönderilmez. Biyosensörlerin çalışma mekanizması biyolojik elementler arasındaki ilgiye dayanır. Örneğin, hücre içindeki pek çok hayati faaliyette yer alan proteinler arasında anahtar-kilit ilişkisine benzer ilişkiler vardır. Hücre içindeki faaliyetler hep birbirine bağlanan veya bağlanamayan proteinlerin oluşturdukları biyokimyasal sinyaller ile devam eder. Protein ailesinin üyelerinden olan antikorların vazifesi organizmaya giren yabancı molekülleri tesbit edip bunlara bağlanmaktır. Antikorlar vücudun savunma sisteminin en önemli elemanlarıdır. Yine duyularımız tarafından hissedilen verilerin kimyasal ve elektriksel sinyallere dönüştürülüp, beynin değerlendirilmesine sunulması gibi örnekler canlı sistemlerin mükemmel biyosensörlerle donatıldığı gerçeği ile karşılaşılacaktır.(Telefoncu, 1999)

Örneğin köpeklerin insanlara göre koku almada oldukça duyarlı olmaları, kelebeklerin partnerlerini yaydıkları birkaç molekül ile onları hissedebilmeleri, algilerin zehirli maddelere karşı duyarlı olmaları canlıların olağanüstü duyarlılığa sahip olduğunun kanıtıdır. Bu canlılarda ilgili mesajları algılamayı sağlayan biyolojik maddelerin, analiz sistemleri ile kombinasyonu biyosensörleri oluşturmuştur. Biyosensörler, biyolojik proseslerin izlenmesi yanında pek çok endüstriyel ve medikal alanda uygulamaya sahiptir.(Telefoncu,1999)

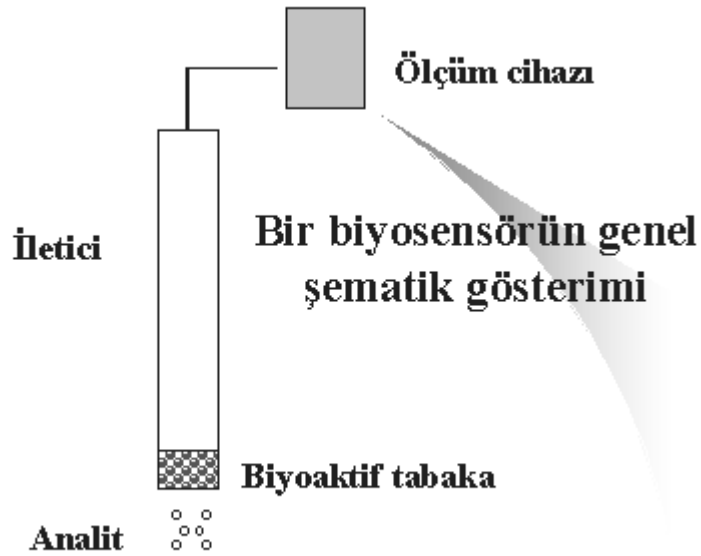
Bu çalışmada tirozinaz enzimine kompetitif etki gösteren inhibitörlerin tayinine yönelik biyosensör tasarlanması amaçlanmıştır.Bu biyosensörün biyoaktif tabaka bileşenleri ve en uygun çalışma koşullarının tesbit edilmesi hedeflenmiştir.

### **1.1.1. Biyosensörler**

Biyosensörler (biyoalgılayıcılar), bünyesinde biyolojik bir duyurgacı bulunan ve bir fizikokimyasal çevirici ile birleştirilmiş analitik cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Biosensör biyolojik materyalin sensor özelliğinin kullanıldığı bir sensör sistemidir. Biyokomponentin spesifik olarak analit ile reaksiyonu sonucunda oluşan kimyasal ve fiziksel değişim ölçülebilir. Bir biyosensörün amacı, bir veya bir grup analitin (analiz edilecek madde) miktarı ile orantılı olarak sürekli sayısal elektrik sinyali üretmektir (Sharma et al.2003). Biyokomponentleri immobilize halde kullanılan, çeşitli gaz, iyon, çözünmüş gaz ve biyolojik maddelerin teşhisi, kantitatif tayini ve orijinal sistemlerde izlenmesi amacıyla geliştirilmiş problemlere biyosensör denilmektedir. Biyosensör sistemi üç temel bileşenden oluşmaktadır.

- Duyarlı biyolojik materyal: doku, mikroorganizma, organel, hücre reseptörü, enzim, antikor, nükleik asit gibi biyolojik materyaller veya biyomimik.
- Çevirici: biyoajanın incelenen madde ile etkileşimi sonucu oluşan fiziko kimyasal sinyalleri elektronik sinyaller dönüştürülebilir
- Dedektör (fizikokimyasal olarak çalışır; optik, elektrokimyasal, termometrik, piezoelektrik veya manyetik.)





**Şekil 1.1** Biyosensörün genel şematik gösterimi

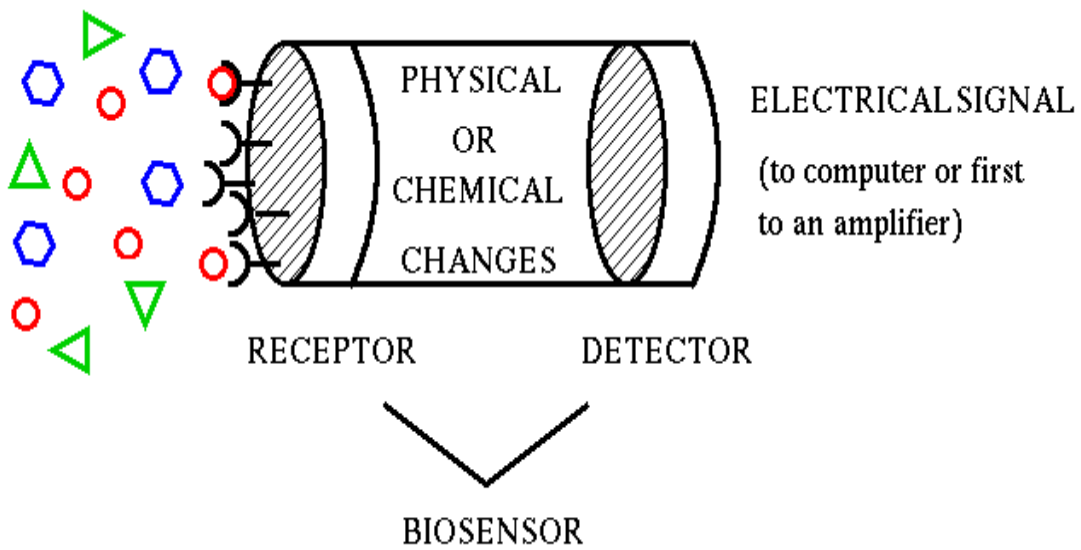
Şekil 1.1’den de görüleceği gibi biyosensörler; genel anlamda bir biyoaktif tabaka, sinyal iletici sistem ve kaydediciden oluşur. Biyoaktif tabaka; uygun bir sinyal iletim sistemiyle ya da diğer bir deyişle uygun bir sensörle birleştirilen ve analizlenecek maddeyi tanıma veya spesifik olarak dönüşüme uğratma yeteneğine sahip biyolojik kökenli yapılardır.(Dinçkaya, 1999)

Biyosensör sistemlerinin en önemli avantajı diğer sensörük sistemlere göre çok daha fazla seçici ve duyarlı olmasıdır. Bu ise biyosensör sistemlerinin dizaynına bağlıdır ve çok farklı reseptör-dedektör kombinasyonları vardır. Örneğin enzim reseptörleri oksijen elektrodu, hidrojenperoksit sensörleri veya termistör sistemlere ile kombine olmuş olabilir.

Biyosensörlerle yapılan ölçümlerde, belirlenecek olan analitin konsantrasyonu ile doğru orantılı olacak şekilde bir sinyal eldesi sözkonusudur.

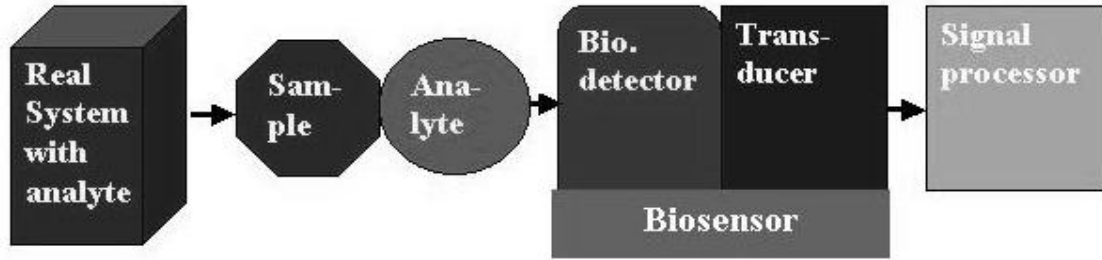
Bu bileşenlerden en önemlisi, tayin edilecek maddeye karşı son derece seçimli fakat tersinir bir şekilde etkileşime giren, duyarlı biyolojik ajandır. Bir başka deyişle

biyosensörler, genel olarak analizlenecek madde ile seçimli bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bir bileşenin bu etkileşim sonucu ortaya çıkan sinyali ileten bir iletici sistemle birleştirilmesi ve bunların bir ölçüm sistemi ile kombinasyonu ile oluşturulurlar.(Habermuller et.al, 2000)



**Şekil 1.2** Biyosensörlerin çalışma prensibi

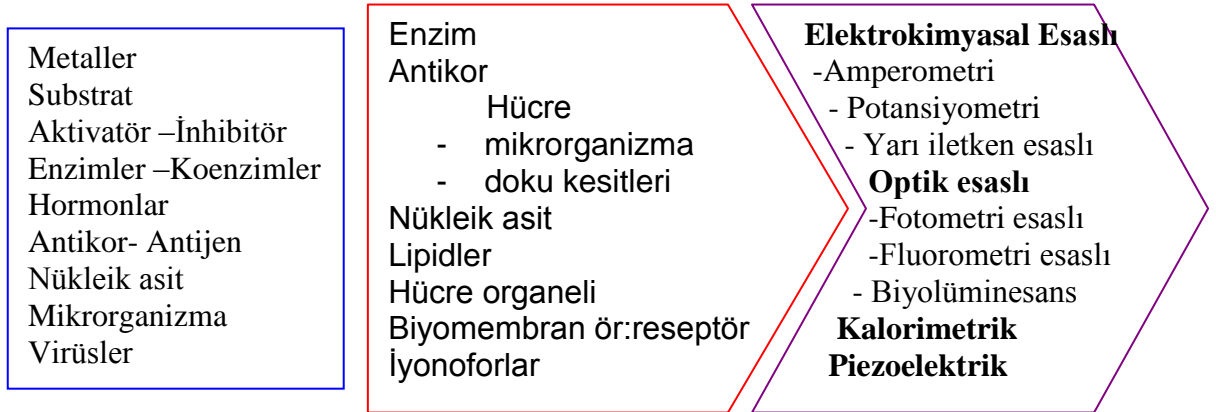
Genel olarak biyoajanlar, biyoaffinite ajanları ve biyokatalitik ajanlar olarak iki alt gruba ayrılırlar. Biyoaffinite ajanları olan antikorlar, hormon almaçları, DNA, lektin gibi moleküller, antijenlerin, hormonların, DNA parçacıklarının ve glikoproteinlerin moleküler tanımlanmasında kullanılırlar. Kompleks oluşum sonucunda tabaka kalınlığı, kırınım indeksi, ışık eminmesi ve elektriksel yük gibi fizikokimyasal parametrelerin değişimine neden olurlar. Biyokatalitik ajanlar ise, analit üzerinde moleküler değişime neden olmakta ve bu dönüşüm sonucu ortamda azalan yada artan madde miktarı takip edilerek sonuca gidilmektedir. Bu amaçla saf enzim sistemleri, mikroorganizmalar ve bitkisel yada hayvansal doku parçaları kullanılır.



Şekil 1.3 Sistemik biyosensör şeması

#### ANALİT

#### BİYOKOMPONENETLER SİNYAL İLETİCİ SİSTEM



Şekil 1.4 Biyosensörlerin çalışma prensibinin şematik gösterimi

Çeviriciler oluşan sinyali elektriksel verilere dönüştürürler ve sinyal elektriksel olarak okunur. Kullanılan çevirici sistemler ise;

- 1) Elektrokimyasal
- 2) Optik
- 3) Pizoelektrik
- 4) Termometrik
- 5) Manyetik
- 6) Akustik

özelliğindeki gruplardan oluşabilir.(Dinçkaya, 1999)

Enzim ve hücre temelli biosensörlerin her ikisinde Michaelis-Menten enzim kinetiği modeline uygunluk gösterir. Biosensörlerin “enzim elektrodu” olarak adlandırılmasının nedeni elbetteki enzimlerin bu sistemlerdeki önemli rolüdür. Enzimler bir membrana immobilize edilerek tanımda görev alırlar. Elektrod tipi önemlidir, enzim tabakası ve orta kısım birbirinden ya 2 membran yada 1 membran ile ayrılır. Eklenen bu bariyerler enzim kinetiğini etkilemesinde difüzyona olan etkisi göz önünde tutulmalıdır. Enzim sensörlerinin uygulanmasını etkileyen diğer etkiler, inhibitörler, sıcaklık ve pH değişimleridir ve tüm bunlar sensör sinyalin oluşumunu zorlaştırır.

### 1.1.2. İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler:

- **Seçicilik:** İdeal bir biyosensörde en önemli parametrelerden birisi seçicilik özelliğidir. Eğer yeterli seçicilik mevcut değilse bu eksikliği giderecek uzun ek işlemler gerekir.
- **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 affinitesi, 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.

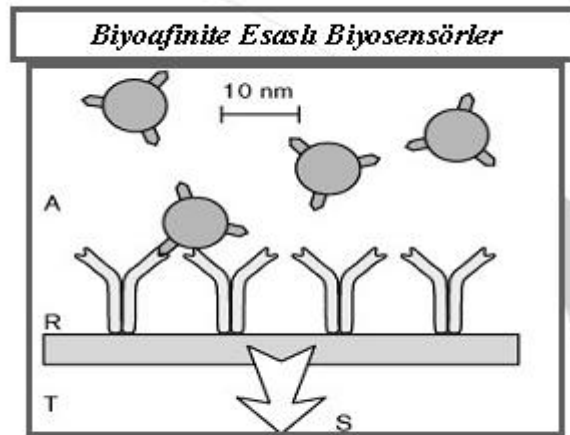
- **Küçültülebilirlik ve Sterilize edilebilirlik:** Elektrotlarının sterilize edilebilmesi ve boyutlarının küçültülmesi biyosensör tasarımında önemlidir. Buna karşın, biyosensör yapısına giren biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, sterilizasyonu kısıtlayan en önemli parametredir.

(Sezgintürk, M.K, 2007)

### 1.1.3. Biyosensör çeşitleri

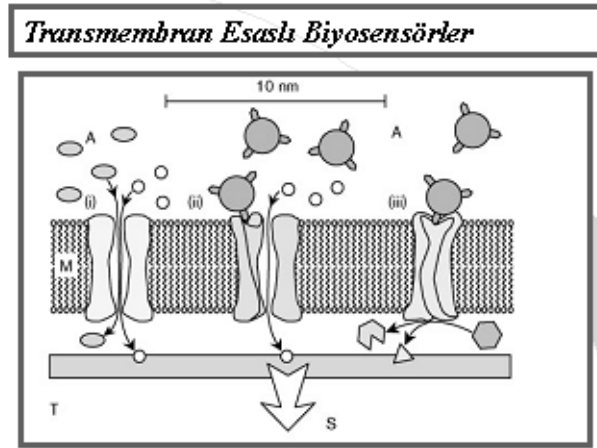
Biyosensörler farklı bir bakış açısıyla Analizlenecek Madde-Biyoaktif Bileşen ilişkisine göre aşağıdaki şekilde de sınıflandırılabilirler; (Dinçkaya, 1999)

**1.1.3.1 Biyoafinite esaslı biyosensörler** (örneğin; iletici sistem üzerinde antikor immobilizasyonu ile antijenlerin tayini)



Şekil 1.5 Biyoafinite esaslı biyosensör

**1.1.3.2 Transmembran esaslı biyosensör** : (örneğin; çeşitli moleküllere spesifik reseptör veya farklı membran proteinlerini içeren hücre membranlarının iletici sistem üzerinde immobilizasyonu söz konusu moleküllerin seçimli bir şekilde tayinleri.)

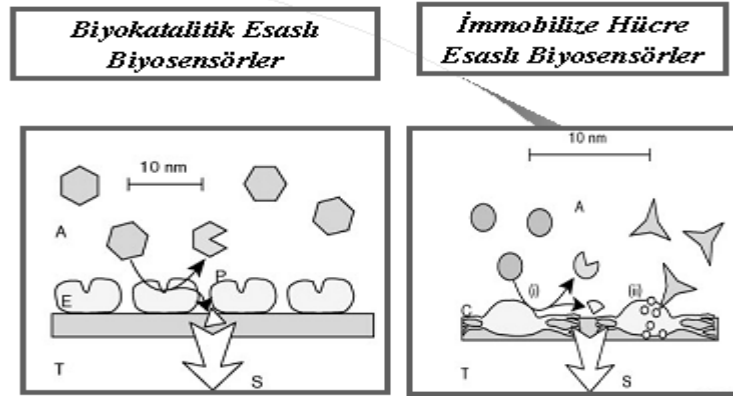


**Şekil 1.6** Transmembran esaslı biyosensör

**1.1.3.3 Biyokatalitik Esaslı Biyosensörler** (örneğin; iletici sistem üzerinde enzim immobilizasyonu ile enzimin substratı, inhibitörü, aktivatörü veya koenzimi olan çeşitli kimyasal maddelerin tayini)

**1.1.3.4 İmmobilize Hücre Esaslı Biyosensörler** (örneğin; iletici sistem üzerinde hücrelerin immobilizasyonu ile o hücreler tarafından metabolize edilen çeşitli maddelerin tayini)

**1.1.3.5 Transmembran Esaslı Biyosensörler** (örneğin; çeşitli moleküllere spesifik reseptör veya farklı membran proteinlerini içeren hücre membranlarının iletici sistem üzerinde immobilizasyonu söz konusu moleküllerin seçimli bir şekilde tayinleri.)



Şekil 1.7 Biyokatalitik esaslı biyosensör      İmmobilize hücre esaslı biyosensör

#### 1.1.4. Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz alanı

##### 1.1.4.1. Mikrobiyal biosensör:

Bugün bir *E. coli* hücresinde bile 3000 den fazla enzim olduğu kabul edilmektedir. Gelişmiş hücrelerdeki enzim sayısının çok daha fazla olacağı açıktır. Saf enzimlerle gerçekleştirilen biyotransformasyon reaksiyonları elbette bu enzimi içeren hücre ile de gerçekleştirilebilir. Bunun için ana koşul hedeflenen biyotransformasyon reaksiyonunun hücrenin içerdiği diğer enzimler tarafından etkilenmesidir. Enzimler ile hazırlanan biyosensörler yerine mikroorganizmalar ile hazırlananların kullanılmasının birçok avantajı vardır.

- Enzimler ortamlarında bulunacaklarından dış etkilere karşı daha dayanıklıdır,
- Koenzimle çalışan enzimler için dışardan koenzim ilavesi gerekmez, ayrıca koenzimlerin rejenerasyonu da hücre içinde gerçekleşir,
- Enzim elektrodlarından daha uzun ömürlüdürler,
- Enzim izolasyonu ve saflaştırılması çok yorucu ve masraflı bir iştir. Bu sebeple saf enzim yerine hücre kullanılması çok ekonomiktir.
- Ayrıca intrasellüler enzimler durumunda tek enzim yerine birçok enzimin katıldığı bir reaksiyon dizisi incelenecekse enzim yerine hücre kullanılması yine önemli bir avantajdır.



Ancak mikrobiyal biyosensörlerin bazı dezavantajları vardır.

- Hücre membranı bir difüzyon bariyeri oluşturduğundan makromoleküler ve membrandan geçemeyen moleküller için uygun biyosensörler hazırlanamaz,
- Mikrobiyal sensörlerin cevap süresi ve kullanımdan sonra temel sinyal düzeyine dönüş süresi enzim sensörlerinden uzundur.
- Hücre birçok enzim içerdiğinden hedeflenen tayin reaksiyonunun diğer enzimler tarafından etkilenmesi söz konusu olabilir.(Telefoncu, A., 1999)

Mikroorganizma temelli biyosensörler 3 temel mekanizma için kullanılabilir. Birinci mekanizma, solunabilen kirletici maddeler içindir. Mikroorganizma temelli biyosensör çevreye zarar vermeden toprakta kolayca çözünebilir organik maddeleri(biyodegradabil) biyolojik oksijen isteğinden (BOI) giderek belirler. Endüstriyel atık sularda bulunan biodegradabil maddelerin miktarı için BOI indikatör olarak kullanılır. Standart prosedüre göre, çevresel veya endüstriyel atık su örneklerinin, kirli ortamlarda bulunabilen mikroorganizmalar ile 5 günlük bir süre zarfında inkübasyona bırakılır ve oksijen tüketimindeki son ölçümün değerinden gidilir. Mikroorganizma temelli biyosensörün kullanıldığı diğer bir mekanizma ise solunum ile ilgili analit ile inhibe etmeye dayanır. Mikrobiyal solunum çeşitli çevresel kirleticiler ile inhibe olur ve bu optikal ve elektrokimyasal yöntemlerin beraberce kullanımıyla ölçülür.

İzole edilmiş enzim yerine mikroorganizma kullanılır ve bu da işlem kolaylığı sağlar. Bu yöntem hem ucuz hemde pH ve sıcaklık değerleri bakımından geniş aralıklarda çalışma imkanı verir.

Mikrobiyal biyosensörler su analizlerinde oldukça çekici bir alternatif yöntemdir. Bu sistemlerin en önemli avantajı canlı hücrelerde gerçekleşen değişimlerin direkt olarak izlenmesini sağlar. Örneğin hücrelerin solunum aktivitelerinin çevresel kirlenme sebebi ile değişmesi.

Fizikokimyasal analiz metodları ile karşılaştırıldığında, mikrobiyal biosensörlerde tek başına bir analiti belirlemek için optimum bir çözelti genellikle sağlanamaz. Ama, bu sensörük sistemler sırasıyla çevreyle ilgili bileşikleri ve onların komplekslerinin etkilerini belirlemede yarar sağlar. Bu sebeble, mikrobiyal sensörler çeşitli bileşiklerin ilişkilerini içeren çevresel kirliliğin derecesinin integral değerlendirmesine izin verir.

Bundan başka, bazı durumlarda mikroorganizmalardaki bazı metabolik yollar kullanılır ve sonuç olarak basit enzim reaksiyonları ile ölçülemeyen bileşik veya kirlilikleri seçici bir şekilde analiz eden mikrobiyal sensörler geliştirilir.

Mikrobiyal biyosensörler, yaşayan veya yaşamayan immobilize mikrobiyal hücreler ile birleştirilen çevirici sistemlerden oluşur. Yaşayamayacak durumda olan hücreler saflaştırmadan sonra elde edilir veya tüm hücreler preplazmik enzimler içerir ki bunlar enzimlerin yerine kullanılan ekonomik birimlerdir.

Yaşayan hücreler, hücrelerin solunum ve metabolik fonksiyonlarını yerine getirir ve bu prosesinde izlenen analit, ya substrat ya da inhibitördür.

#### **1.1.4.2 Hücre temelli biyosensör**

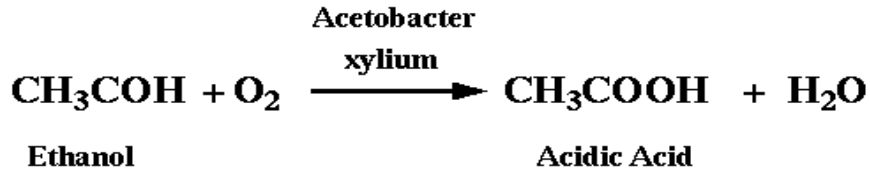
Hücre temelli biyosensör, yaşayan biyolojik hücreleri içeren ve bunların toksik madde, patojen veya diğer ajanlar gibi çevresel zararlılarla fizyolojik değişiminin izlenebildiği portatif sistemlerdir.

Fizyolojik değişimin belirlenmesi için kullanılan metotlar, ekstraselüler elektriksel değişimin kaydedilmesi, optik ölçümler ve gelecekte de genomik fonksiyonlar ve proteomiktir.

Tarım uygulamalarında kullanılacak biyosensörler için pek çok teknik gelişme meydana gelmektedir.

Örneğin bir hücre temelli biyosensör incelenirse, *Acetobacter Xylium* bir oksijen elektroduna immobilize ederek çevredeki etanolü ölçmek mümkün olur. Bu ölçüm

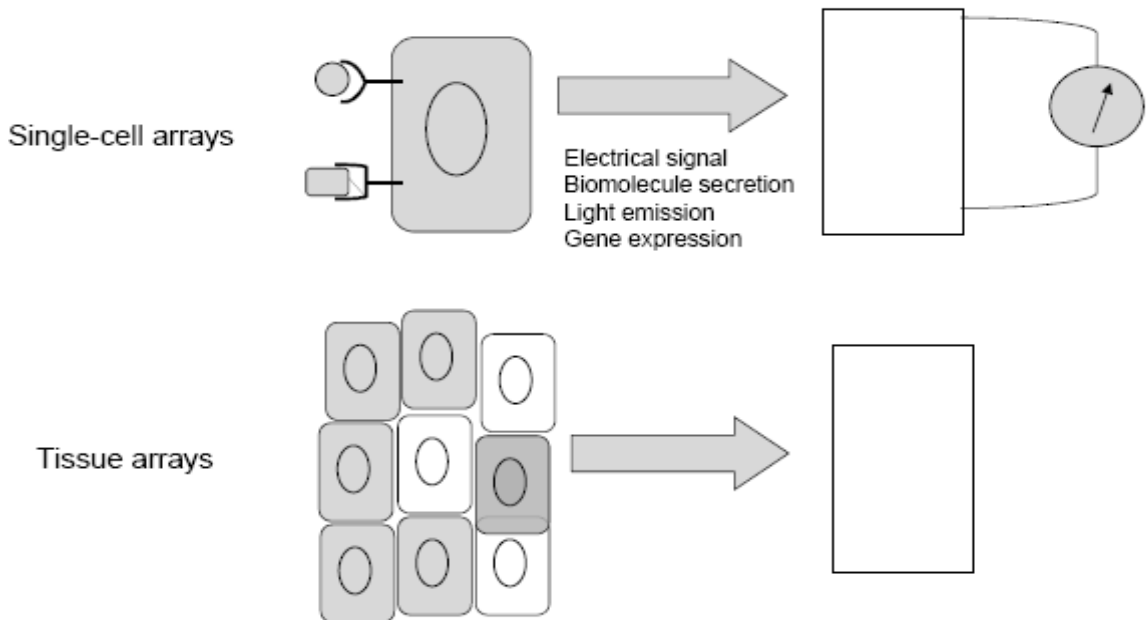
bakterinin solunum aktivitesinin belirlenmesinde avantajdır. İmmobilize bakteri membranının arkasında etanolü oksijen ile metabolize ederek asetik asit ve suya dönüştürür. Ve elektrod yardımıyla biyokatalitik tabakada azalan oksijen miktarının azalışının tesbiti yapılır.



Hücre temelli biyosensörler çok duyarlıdır. Bu sensörler birincil transduserler (hücreler) ve ikincil transduserler (hücresel cevabı biyokimyasal okunabilir cevaba dönüştüren aletler) den oluşur.

İkincil transduserler elektriksel veya optiktir. Etkileşim şu şekilde olabilir.

- Toksin-] hücre stresi -] gen ekspresyonunda değişim
- Analit -] hücre metabolizması -] ekstraselüler asidifikasyon hızında değişim



**Şekil 1.8** Hücre ve Doku temelli biyosensörlerin çalışma şekli

Hücre temelli biyosensörün avantaj ve dezavantajları :

- Hücre temelli biyosensörün, hücrenin kompleks karışımında cevap oluşturmasını sağlama yeteği vardır.
- Reseptör, kanal ve enzim bu fizyolojik durumu hücre mekanizması ile sürdürür.
- Gelecekte hayvansal testler için alternatifler sağlayacaktır.

### 1.1.4.3 Doku Biyosensörleri

1981’de ilk defa bitki dokusu temelli elektrod hazırlanmasından itibaren, birçok bitki dokusu temelli biyosensör geliştirilmiştir (Baouxin, Zhujun, Yan, 2002) Bitki doku materyalleri kullanılarak hazırlanan biyosensörler, izole enzimlere bir alternatiftir (Sidwell et.al., 1986).

Hayvansal ve bitkisel dokuların organellerin kimi enzimlerce özellikle zengin olduğu bilinmektedir. İşte bu enzimler yerine bol buldukları kaynaklar biyosensör hazırlanmasında kullanılır ve dolayısıyla ölçümlere avantaj getirir. En başta enzimin saflaştırılma zorunluluğunu ortadan kaldırır ve doku biyosensörleri bazı enzimler için doğal ortamda karanlık ve düşük maliyet gibi avantajlara sahiptirler. Doku kesitleri kullanıldığı zaman genelde biyosensörün cevap süresi uzundur. Bu süreyi kısaltmak için doku kesiti yerine bir havanda dokunun ezilmesi ile hazırlanan ve iyice homojenize edilen kısım kullanılır (Telefoncu, 1999).

Biyoteknolojik araştırmalarda ve klinik teşhiste biyolojik hücrelerin karakterizasyonunun yapılmasında etkili metotlar istenir. Güncel olarak mevcut sistemler iki boyutlu hücre tabakasına dayalıdır. Üç boyutlu doku modelleri iki boyutlu hücre tabakasından daha iyi bir şekilde in vivo şartlara ayna oluşturur işte tüm bu sebeplerden dolayı test sistemleri Üç boyutlu doku veya doku modelleri üzerine kurulmuştur.

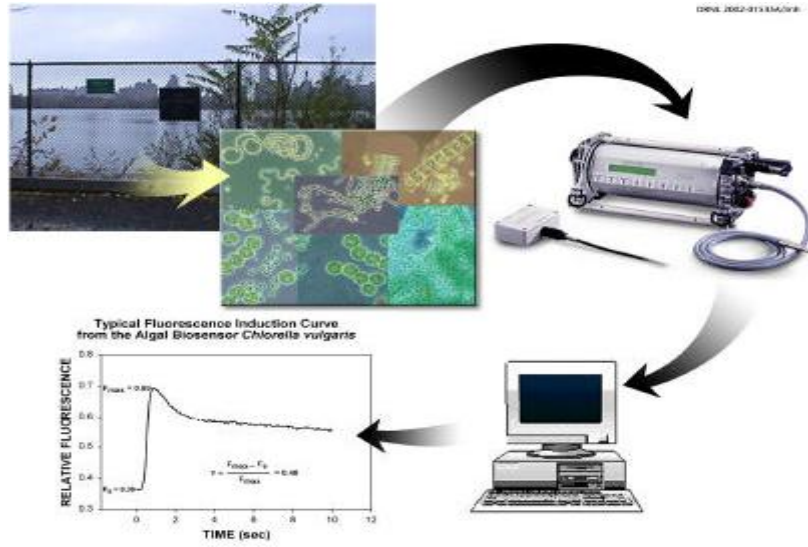
İn vitro doku modellerinden elektriksel impedans spektroskopisi ile kapiller test sistemleri geliştirilmiştir. Dokunun elektriksel özellikleri onun fizyolojik ve morfolojik

özelliklerinden belirlenir ve bundan dolayı biyolojik dokuların fizyolojik olayları ve morfolojik özellikleri elektriksel impedans spektroskopisi ile belirlenir. Doku örnekleri huni şeklindeki açıklık ile dikey ölçüm kapillerine yerleştirilir. 2 elektrod huni şeklindeki açıklığın aşağısına ve yukarısına yerleştirilecek şekilde düzenlenir. İmpedansın ölçümü için, akım dış elektrodlarca sağlanır ve sonuçta iç elektrodlar yardımıyla düşen voltaj kaydedilir. Böylece 4 elektrod düzeniyle ölçüm sağlanır. Geliştirilen test sistemleri, kalp kası dokusu veya sinir dokusu modellerinden alınan örnekler gibi elektrofizyolojik olarak aktif potansiyel alana sahip örneklerin kaydedilmesi için uygundur.

Uygulamalarından biri, kapiller ölçüm hücrelerinin, 3-D in vitro tümör modellerinin kullanıldığı yeni antikanser terapilerinde değerlendirilmektedir. Tümör modellerinin empedans tayfları kaydedilir. Kanser tedavilerinde hedef, hücre çoğalmasını durdurmak ve apoptosisi sağlamaktır. Her iki etkide, ekstraselüler hacim oranını artırır ve bundan dolayı da ekstrasellüler rezistans azalır.

Bir başka uygulaması ise; doku temelli biosensörler, sudaki kimyasal antagonistleri belirlemek için bulunan duyarlı maddeler gibi doğada kendiliğinden oluşan ve suda yaşayan fotosentetik dokuları da kullanan bir sistemdir.

Bu alanda algler her örnek için çok başarılıdır, yapılan araştırmalarda alglerin karakteristik fuloresans değişim eğrileri rahatlıkla izlenmiştir. Sensör materyali dış algılama cihazıdır ve sürekli yenilenmelidir. Güneş ışığına maruz kalan içme sularındaki zararlı kimyasal ajanların ölçümü için biosensörler devamlı olarak hızlı-uyarıcı sensör olarak kullanılabilir.



**Şekil 1.9** İçme sularının doğal kaynaklarının analizi için geliştirilen doku biyosensörü sistemleri

#### 1.1.4.4 Protein Temelli Biyosensör

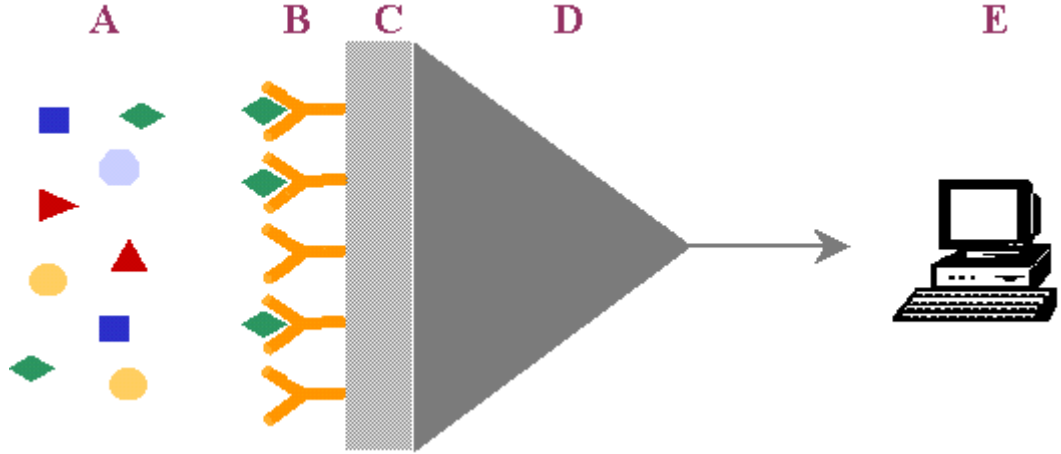
Mikrobiyal güvenlikleri giderek daha tehlikeli noktalara giden, farmakolojik preparatları, endüstriyel atıkları, mandıra ürünlerini, suları ve besinleri, salgınlardan ve enfeksiyonlu hastalıklardan korunmak için kalite güvencesi veren, hızlı, duyarlı, spesifik, güvenilir ve nicel ölçüm metotlarıdır. Mikroorganizmaların ölçümünde kullanılan pek çok metot vardır örneğin immunomanyetik ayırma, kuartz kristal, yüzey akustik dalgalanma.

Tehlikeli çevresel atıkların tesbitinde, yeşil floresan proteinler ile geliştirilen biosensörler popüler olarak tercih edilirler.

#### 1.1.4.5 İmmünosensörler

Antikor temelli biyosensörler ya da diğer ismiyle immünosensörler, antikora bağlanan antijen gibi analitlerin ölçümünde kullanılır. Virüs ve bakteri gibi antijenlere karşı vücutta üretilen maddelere antikor denilir. Antikorlar karakteristik bağlantı noktalarına sahiptir ve sadece karşı gelen antijene bağlanırlar. Bu antikorlar sensörük yapılarba bağlandığı zaman hormonların, ilaçların, virüslerin, bakterilerin ve diğer kimyasalların ölçümünde hızlı yöntemler olarak karşımıza çıkar. Biyomedikal

maddeleri, pestisit gibi çevresel zararlıların tayini, döllenme için gerekli kadımsal hormonların seviyelerinin belirlenmesi gibi çok daha geniş bir aralıkta ölçüm yapılması için bu yöntem genişletilmiştir.



**Şekil 1.10** İmmuno biyosensörlerin çalışma şekli

A: Çevresel örnek

B: Antijene uygun ve seçici olarak bağlanabilecek antikor,biyolojik element

C: Transducer: antijen antikor birleşmesi sonucu oluşan biyokimyasal cevabı elektriksel sinyale dönüştüren

D: Elektronik komponent, bilgisayarda(E) değerlerin görüntülenmesinde görev yapar.

#### 1.1.4.6 DNA Sensörleri

Hibridizasyon, amplifikasyon ve rekombinasyon gibi DNA tekniklerinin hepsi DNA'nın ikili yapısını ele alırlar. Nükleik asitlerin hibridizasyonu DNA biyosensörlerinin en önemli prensibidir (Junhui et.al., 1997).

DNA sensörlerinde tek zincirli DNA sensör yüzeyine; adsorbsiyon, çapraz bağlama, enkapsülasyon, avidin- biyotin kompleksleri ile veya kovalent bağlanma yöntemi kullanılarak immobilize edilir (D'arizio, 2003).

DNA biyosensörleri ölçüm yöntemine göre optik, elektrokimyasal, piezoelektrik olarak sınıflandırılabilirler (Junhui et. al., 1997) .

Son yıllarda birçok bileşiğin tayini amacıyla nükleik asitlerin kullanımında artış gözlenmektedir. DNA biyosensörleri kalıtsal hastalıkların tesbiti, patolojik enfeksiyonların hızlı bir şekilde tayini, moleküler biyolojide DNA kolonilerinin taranması gibi amaçlarla klinik alanda kullanılırlar (Asha et. al., 2003).

Ayrıca gıda, toprak ve bitki örnekleri DNA'sının kanserojenler, ilaçlar ve mutajenik kirleticilerin varlığındaki yapısal farklanmasının bulunmasında da kullanılmaktadır (Mascini et.al., 2001).

Biyosensör tasarımında kullanılan dizi tanıma yüzeyleri, Analitik Kimya alanında yeni ve ilgi çekicidir. Bu tür tanıma yüzeyleri, sahip olduğumuz bilinen elektrokimyasal biyosensörlere yeni boyutlar kazandıracak ve gelecekte hasta başında veya doktor gözetimindeki analizlerde önemli bir rol oynayacaktır .

Tanıma yüzeyi olarak DNA'nın kullanıldığı biyosensörlere DNA biyosensörleri adı verilir. DNA tanıma yüzeyleri, dizisi belli hibridizasyon olaylarının izlenmesinde veya bu yüzey ile etkileşime giren analizlenecek maddelerin (karsinojen maddeler, ilaçlar, vb.) tayininde kullanılabilir.

#### **1.1.4.7 Enzim Sensörleri**

Biyosensör teknolojisinin tarihsel gelişimine bakıldığında bu alandaki ilk çalışmaların enzim sensörleri ile başladığı görülmektedir. 1962'de Clark ve Lyons ve 1967'de Updike ve Hick tarafından rapor edilen glukoz tayinine yönelik glukoz oksidaz enzim elektrodları bu konudaki ilk örnekleri oluşturmaktadır (Dinçkaya, 1999).

Temel bilimlerdeki ilerlemeler enzimlerin yanı sıra diğer biyolojik materyallerin fonksiyonlarının da çok daha ayrıntılı bir şekilde ortaya çıkmasına imkan vermiştir. Bu ilerlemelerin doğal bir sonucu olarak farklı biyolojik materyallerin ve iletim sistemlerinin kombinasyonuyla çok çeşitli biyosensörler geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam etmektedir. Bugünkü sonuca bakıldığında hangi temel iletim sistemi söz konusu olursa olsun ki elektrokimyasal esaslı olanların tartışılmaz bir ağırlığı söz konusudur,



pratik ve ticari uygulamalarda enzim elektrodlarının büyük bir üstünlüğü vardır. Bu sonuçtaki en büyük etmen canlı sistemlerle ilgili hemen hemen her türlü maddenin doğrudan veya dolaylı olarak analizinde kullanılacak binlerce enzimin varlığıdır. Bilinen enzimlerin yanı sıra bilinmeyenlerin potansiyel varlığı, piyasada yüzlerce enzim ve preparatın bulunabilirliği ve bu sayının her geçen gün yükselmesinin enzim sensörlerinin tartışılmaz üstünlüğünün devam edeceğinin bir göstergesidir (Dinçkaya 1999).

Bu çeşit biosensörler, biosensöre bağlı enzime bağlanan immunosorbentlerin tayininde kullanılır İngilizce yazımının(enzyme-linked immunosorbent assays) baş harflerini alarak bu yöntemle ELİSA denir. ELİSA antijen – antikor reaksiyonlarının belirlenmesinde kullanılır, enzime immobilize antikora bağlanan antijenin serbest haldeki rölatif miktarını, bağlı miktarını ve enzimik reaksiyonun hızını ölçer.

Enzimlerin yüksek tunover sayıları vardır bu yüzden hızlı cevap oluştururlar. Yöntemlerin duyarlılığı ise fuloresans, renk reaksiyonları ve biyoluminesans esaslı reaksiyonlar gibi daha yüksek cevaplar veren enzim katalizli reaksiyonlar kullanıldığı zaman artar.

### **1.1.5. Biyosensörlerin Uygulamaları**

Biyosensör teknolojisi her ne kadar yeni gibi görünse de ilk biyosensörler 1960'lı yıllarda yapılmıştır. Bugüne baktığımızda biyosensörlerin 3 temel uygulama sahasıyla karşılaşırız.

- 1) Çevresel uygulamalar
- 2) Askeri uygulamalar
- 3) Medikal uygulamalar.

Biyosensörler çevresel uygulamalarda "bioremediation" işlemlerinde devreye girmektedir. Örneğin biyosensörler sayesinde modern moleküler genetik teknikleriyle değiştirilmiş bakterilerin toluene tüketimleri gözlenebilmektedir. Toluene, bakterice

üretilen "*luciferase*" enzimi ile metabolize olurken "yeşil floresan bir protein" üretilmekte ve spektral emisyon analizleriyle bu tüketim görüntülenmektedir. Benzer şekilde bu biyoreportörler yoluyla petrol sızıntıları, yeraltı sularındaki uranyum miktarı, zehirli atıkların, kanserojenlerin ve içme sularını kirleten mikroorganizmaların konsantrasyonları belirlenmektedir.

Askeri amaçlı uygulamaların ilki biyolojik savaşlarda kullanılan bakterilerin kendilerine özgü lipid karakterine dayanan tanımlamalara yöneliktir. Bir başka uygulama da askerlerin savaş esnasında fizyolojik durumlarını belirleyen ve bu bilgileri hem yaralılara müdahale edeceklere hem de strateji belirleme konumundaki birimlere ileten sistemlerin yapımına ilişkindir.

Biyosensörlerin en geniş uygulama sahası medikal sahadır. "Medikal telesensörler" olarak da adlandırılan çipler vücut ısısını, nabızı, kan basıncını, kandaki şeker ve oksijen miktarlarını ve vücuttaki bazı metallerin konsantrasyonlarını ölçebilmektedir.

Optik biyopsi sensörleri sayesinde ise ağrısız, iyileşme süresi kısa operasyonlarla kanserli dokular teşhis edilmektedir. Dokular 400-700 nm dalgaboyu aralıklarında aydınlatılmakta kanserli ve normal hücrelerin emisyon karakterleri karşılaştırılıp, kanserli dokular tanımlanmaktadır.

Bu sahadaki en son yeniliklerden birisi medikal uygulamaların yanında diğer sahalarda da kullanılan "lab on a chip" diye adlandırılan sistemlerdir. Çip, mikroskop slaydı üzerinde meydana getirilmiş 50 – 100µm'lik kanalcıklardan oluşmaktadır. Kanallarda gereken maddeler karıştırılmakta, elektrik potansiyel farkı oluşturularak bunların kanal boyunca tepkime hızları ölçülüp meydana gelen ürünler ayrıştırılmaktadır ve çeşitli görüntüleme sistemleriyle reaksiyon süreci gözlenmekte, ayrıştırılan ürünlerin konsantrasyonu ölçülmektedir.

Diyabetli hastalarda glukoz miktarının tayini, patojenlerin tayini, biyolojik geri dönüşümden önce veya sonra toksik maddelerin tayinini yapabiliriz. Biyolojik geri dönüşüm enzimler veya mikroorganizmaların yardımıyla ve kontaminatların doğaya orijinal forumlarında döndürüldüğü reaksiyonlardır.

Sadece biyo-silahların tesbitinde değil, aynı zamanda biyolojik mekanizmaların, proteinler arası ilişkilerin anlaşılmasında ve insan genom projesinin devamı olan proteomik çalışmalarında da biyosensörlerin büyük önemi vardır. İnsan genom projesi ve patojenik bakteri ve mikroorganizmaların genetik kodlarının ilaç geliştirme çabaları için belirlenmesi, bazı kötü niyetli insanların ilaç yerine zehir yapmasına da yardım etmektedir.

Son olarak medikal uygulamalar başlığı altında ele alınması gereken yenilik ise "gene chip" teknolojisidir. Bu teknoloji sayesinde genomik, polimorfik analizler yapılmakta organizmaların baz dizilimleri daha kolay belirlenebilmekte, hibridizasyonun yanısıra gen ifade sistemleri çalışılmaktadır.

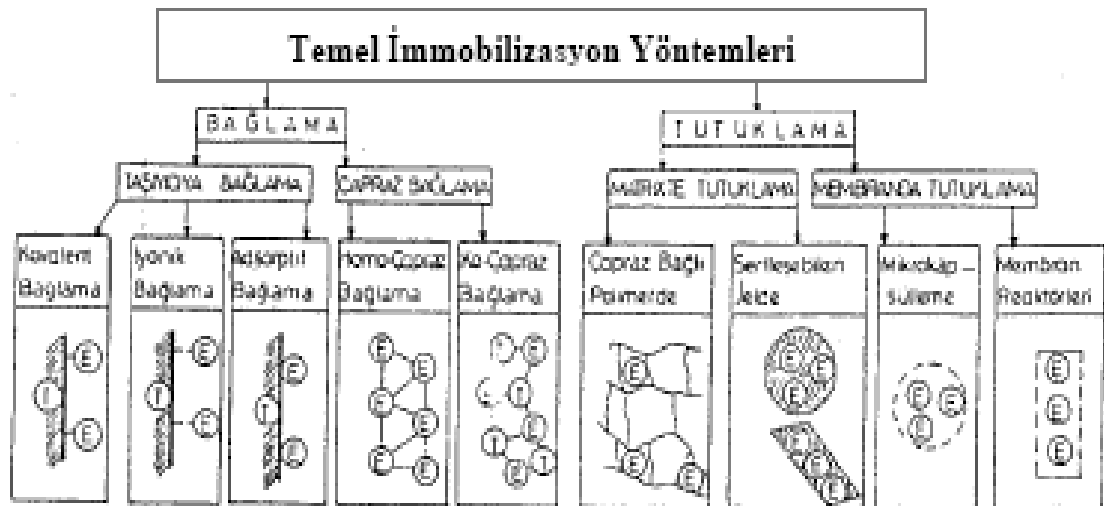
Özet olarak biyosensör teknolojisi, biyokimyanın, gen mühendisliğinin kaydettiği gelişmelerle yeni boyutlar kazanmakta uygulamalar da çeşitlenmektedir. Bu teknolojinin sınırları hayalgücüyle sınırlı görünmektedir. Bunların yanında gıda, eczacılık, endüstriyel aktivitede özellikle otomasyon, kalite kontrolü, durum tesbiti ve enerji saklanması çok önemli rol oynarlar. Bugüne kadar 180 den fazla farklı madde için biyosensör hazırlanmış olup bunlardan ancak 25 kadarı ticari olarak üretilmektedir. Ticari olarak ilk üretilen biyosensör, şeker hastalığı teşhisi için kan ve idrarda glukoz tayinini mümkün kılan glukoz oksidaz elektrodudur. Bunu renal fonksiyon testleri için geliştirilen üre ve kreatinin elektroduları ile kas gücünü ölçmeye yönelik laktat elektrodu izlemiştir. Biyosensör piyasası günden güne gelişmektedir.

**Çizelge 1.1** Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz alanları

Biyosensör grubu	Analiz alanı
Enzim Sensörleri	Küçük moleküllü organik ve anorganik maddeler (metabolitler, ilaçlar, gıdalar, vitaminler, antibiyotikler, pestisitler)
Immunosensörler	Virüsler, patojenler, ksenobiyotikler
Mikrobiyal Sensörler	Enzim sensörlerinin kapsadığı alanlar, BOD, toksisite, mutajenite
DNA Sensörleri	Virüsler, patojen mikroorganizmalar

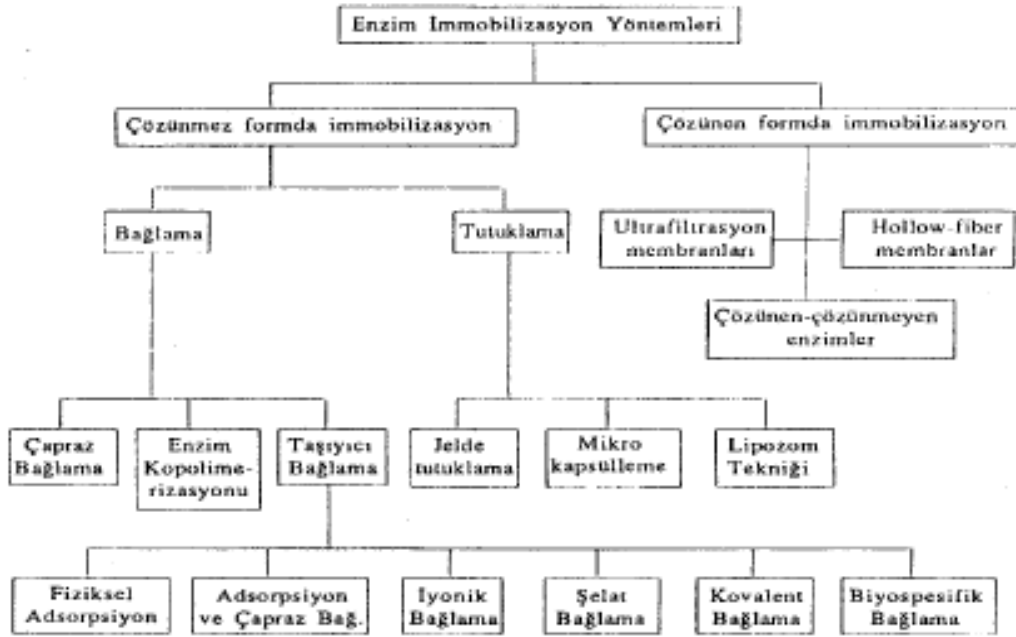
### 1.1.6 Biyokomponentlerin immobilizasyonu

1960'lı yıllardan bu yana biyolojik moleküllerin (enzim, hücre, nükleik asit gibi) immobilizasyonuna yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Temel immobilizasyon yöntemleri Şekil 1.11'de şematize edilmiştir.



**Şekil 1.11** Temel immobilizasyon yöntemleri

Biyolojik molekül olarak enzim seçildiğinde genel immobilizasyon yöntemleri ise aşağıda verilmiştir. Şekil1.12'deki immobilizasyon yöntemleri tüm biyolojik moleküllere uymayabilir.



Şekil 1.12 Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması

Analizlerin ilk basamağı, interaktın, sensörün çip yüzeyine immobilizasyonudur. Bu immobilizasyon kovalent bağla kalıcı veya geçici olarak bağlanma şeklindedir.

İmmobilizasyon teknikleri ligantların tipine (protein, şeker, DNA), kullanılan analite (büyük veya küçük olmasına) ve çalışma şekline bağlıdır (spesifiklik, konsantrasyon, affinite, kinetik) ve toplamda ligandın biyolojik aktivitesinin kullanılması lazım.

Ligandın büyüklüğü, pI, amino asit kompozisyonu, pH stabilitesi kullanılacak immobilizasyon yönteminin seçiminde en yararlı bilgiyi verir.

Büyüklik ve amino asit kompozisyonu genelde iyi bilinir. Her ikisinde, sinyalin tam alınması için nasıl ve ne kadar liganda ihtiyaç duyulduğunu belirler. pI'nın bilinmesi çok kritik bir durum değildir çünkü tam immobilizasyonda pH kolay sağlanır.

Spesifiklik esaslı yöntemlerde, neredeyse herhangi yoğunluktaki bir ligan ile iyi sinyal alınır. Konsantrasyona dayalı yöntemlerde ise ligandların yüksek yoğunlukta olmasına ihtiyaç duyulur, böylece kütle transfer limitini artırır. Toplam kütle transferi, deneysel bağlanma kontrolüne, analit konsantrasyonuna, ve bağlanmayan analitin ligan ile arasındaki kinetiğe bağlıdır. Affinite temeli olanlarda orta yoğunluktaki sensör çipleri kullanılır. Önemli olan faktör, analitin, ligan ile doyurulmuş olmasıdır. Kinetik temelli yöntemde, düşük yoğunluklu ligandlar tercih edilir ki güzel cevaplar alınabilir.

En fazla kullanılan immobilizasyon teknikleri: kovalent bağlama, adsorbsiyon, tutuklama, çapraz bağlamadır.

#### **1.1.6.1 Kovalent bağlama**

Pek çok kovalent bileşenin ligan ile immobilize olması için reaktif gruplarının müsait olması gerekir. Bu reaktif gruplar, amin(-NH<sub>2</sub>), tiol (-SH<sub>2</sub>), aldehit (COOH) vs.dir ve prosedürün gerçekleşmesinde uygundur bu reaktif grupların enzimin katalitik aktivite gösterdiği bölgede olmaması gerekir. Kovalent bileşen kararlı olması ve genelde liganın modifiye olmaması lazımdır. Immobilizasyon derecesi kolaylıkla kontrol edilir ve ligan tüketimi düşüktür.

#### **1.1.6.2 Adsorbsiyon**

En eski ve en basit immobilizasyon yöntemidir. Yöntem suda çözünmeyen bir adsorbanın immobilize edilecek biyomolekül çözeltisiyle karıştırılması, aşırısının yikanarak uzaklaştırılmasına dayanır. Adsorbanlar çok farklı olabilir.

Selüloz, silikajel, cam, hidroksiapatit ve kollagen enzimleri adsorblamak için kullanılan başlıca yapılardır. Hidrojen bağları, multiple tuz köprüleri, Van der Waals bağları ve elektron transisyon kompleksleri oluşumu sayesinde bağlanma gerçekleşir.

### **1.1.6.3. Tutuklama**

Kısaca özetlenecek olursa biyomolekülleri belirli bir mekanda tutmaya çalışmaktır. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi, geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemi kovalent bağlama ve çapraz bağlama immobilizasyonundan ayıran en önemli özellik biyomolekülün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır

Biyomolekülü içeren çözelti içinde polimerik jel hazırlandığı zaman jelin donmasıyla biyomolekül jel matriks içinde tutuklanmış olur. Poliakrilamid, nişasta, naylon ve silastik jel biyomoleküllerin tutuklanması için kullanılabilir.

### **1.1.6.4. Çapraz Bağlama**

Adsorban ile biyomoleküllerin arasında küçük moleküllü bi veya multi fonksiyonel gruplar bağlar yaparak suda çözünmeyen kompleksler oluştururlar.

Glutaraldehyd, heksametilen di-izosiyanat, 1,5-difloro, 2,4 nitrobenzen ve bis-diazobenzidin-2,2'-disulfonik asit gibi bifonksiyonel ve multifonksiyonel reaktiflerin kullanılmasıyla biyomoleküllerin intermoleküler çapraz bağlanması sağlanır. Bu reaktifler, katı desteklere biyomolekülleri bağlayabilirler.

**Çizelge 1.2** İmmobilizasyonda kullanılan taşıyıcıların genel özellikleri

• Suda çözünmeme	• Kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcıların ılımlı koşullarda reaksiyon veren gruplar taşıması
• Gözenekli ( poröz yapı )	• Mikroorganizmalara karşı dirençlilik
• Mekanik stabilite	• Ucuzluk
• Uygun partikül formu	• Zehirsizlik
• Kimyasal ve termal kararlılık	• Rejenere olabilme

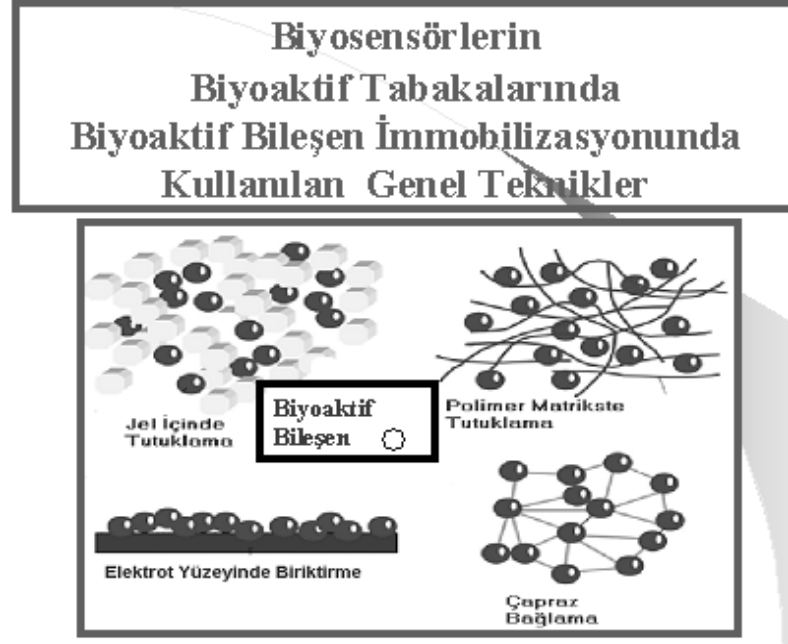
Biyolojik olarak aktif moleküllerin taşıyıcıya kovalent olarak bağlanmasında ilk adım kimyasal olarak inert olan bir taşıyıcının aktivasyonudur. Taşıyıcının aktivasyonu çeşitli reaktifler vasıtasıyla sağlanır. Bunlar CNBr, epoksit, 1,1'- karbonildiimidazol, sülfonil klorür, periyodat, triazin, diazonyum, glutaraldehid, N-hidrosisüksinimid, divinil sülfon ve nitrofenil kloroformat olarak sıralanabilir. Taşıyıcının aktivasyon düzeyi optimize edilmelidir. Taşıyıcı için uygun aktivasyon bağlama şeması Çizelge 1.3'de verilmektedir.



Çizelge 1.3 Genel aktivasyon/ bağlanma şeması

Aktivasyon Reaktifi	Reaktif Matrisi	Ligand	Bağ Türü	Reaktif Toksikitesi	Kompleks Kararlılığı	Spesifik Olmayan Etkileşimler	Aktivasyon Zamanı (saat)	Ligand Bağlama Zamanı (saat)	Bağlama pH'sı
Glutar-aldehid	-NH <sub>2</sub>	-NH <sub>2</sub>	Sekonder amin	İlmli	İyi	-	1-8	6-16	6,5-8,5
CNBr	-OH	-NH <sub>2</sub>	İzöüre imidokarbomat	Yüksek	pH<5 ve pH>10 kararsız	İyonik	0,2-0,4	2-4 oda sıcaklığı ve gece boyu	8-10
Epoksi	-OH	-NH <sub>2</sub> -OH -SH --COOH	Alkilamid eter, tiyoeter	İlmli	Mükemmel	-	5-18	15-48	8,5-12,0
CDI	-OH -NH <sub>2</sub>	-NH <sub>2</sub>	Üre bağı	İlmli	İyi	-	0,2-0,4	Gece boyu- 6 güne dek	8,0-9,5

Tresil klörür	-OH	-NH <sub>2</sub>	Alkilamin	İlmli	İyi	-	0,5-0,8	Hızlı	7,5-10,5
Diazonyum	-OH -NH <sub>2</sub>	-OH	Azo	İlmli	İlmli	Hidrofobik	-	-	-
Periyodat	-OH	-NH <sub>2</sub>	Alkilamin	İyi (toksik değil)	İyi	-	14-20	Gece boyu	7,5-8,5
Triazin	-NH <sub>2</sub>	-NH <sub>2</sub>	Triazonil	Yüksek	İyi	aromatik (hidrofobik)	0,5-2,0	4-16	7,5-9,5
DVS	-OH	-OH -SH -NH <sub>2</sub>	eter, tiyoeter sekonder amin	Yüksek	Yüksek pH' da kararsız	-	0,5-2,0	Hızlı	8-10
p-nitrofenil format	-OH	-NH <sub>2</sub>	Karbamat	-	Hidroliz, pH duyarlı	-	0,5	Hızlı	8,5-9,5



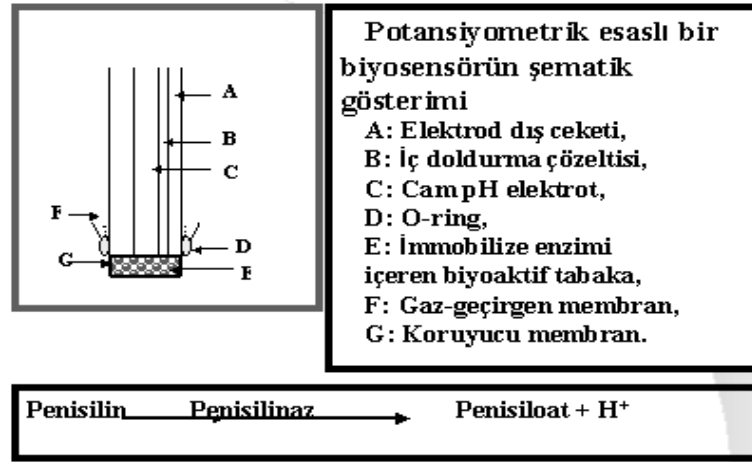
**Şekil 1.13** Biyosensörlerin biyoaktif tabakalarında biyoaktif bileşen immobilizasyonunda kullanılan genel teknikler.

## 1.2 Fiziksel Tayin Yöntemleri

### 1.2.1 Elektrokimyasal esaslı tayinler

#### 1.2.1.1 Potansiyometrik teknikler

Bir karşılaştırma elektrodu ve uygun bir çalışma elektrodu ile oluşturulan bir elektrokimyasal hücrede ölçülen gerilim değerleri yardımı ile hücre çözeltisindeki türlerin nicel analizine potansiyometri denir. Çalışma elektrodu, çözeltideki türlerden bazılarını seçimlilik gösteren ve iç kısımda bir başka karşılaştırma elektrodu ile nicel analizi yapılacak türün belli derişimdeki çözeltisi bulunan ve bir membran ile analizi yapılacak çözeltiden ayrılmış bir elektrottur.



**Şekil 1.14** Potansiyometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi.

Analizi yapılacak çözeltiliye daldırılan bu elektrot ile aynı çözeltiliye temasta olan bir karşılaştırma elektrodu arasında oluşan gerilim değeri ile analizi yapılan türün derişimi arasında logaritmik ilişki vardır. İçte ve dışta bulunan çözeltilerde analizi yapılacak türün derişimi açısından bir fark varsa membranın iç yüzeyi ve dış yüzeyi arasında bir gerilim farkı oluşur. Bu gerilim farkının değeri analizi yapılan türe ve derişimine bağlı olduğu gibi, membranın cinsine ve çözeltideki diğer bileşenlerin cins ve miktarlarına bağlıdır. Elektrotlar ve yanıtta sorumlu maddelerin konsantrasyonları arasındaki ilişkiyi Nernst eşitliği açıklar.

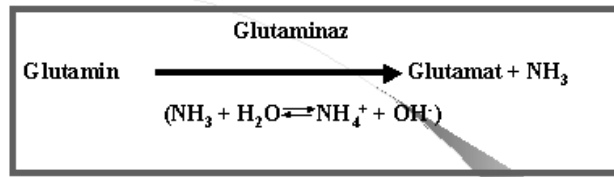
$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \left[ \frac{(\text{Ox})}{(\text{Red})} \right]$$

Bu gösterim sadece seyreltik çözeltiler için geçerlidir. İyonik konsantrasyon arttıkça, ideal termodinamik şartlardan uzaklaşır ve bu durumda konsantrasyon (C) ifadesi yerini iyonik aktiviteye bırakır.

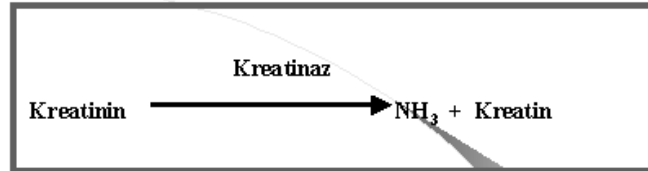
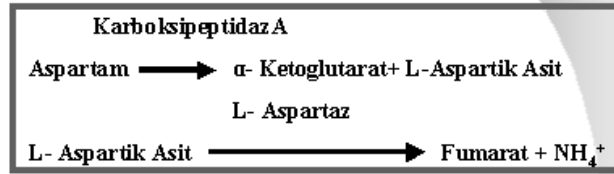
$$a = \gamma C$$

$$\gamma = \text{Aktivite katsayısı}$$

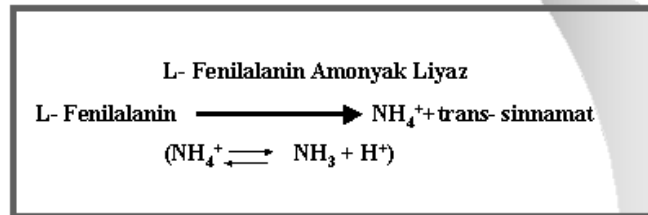
Potansiyometrik biyosensörlerde kullanılan temel sensörler pH ya da tek değerlikli iyonlara duyar cam elektrotlar, anyon yada katyonlara duyar iyon seçimli elektrotlar ve karbondioksit yada amonyağa yönelik gaz duyar elektrotlardır. Potansiyometrik sensörlerin duyarlı, dayanıklı, karalı olması ve hızlı cevap üretmesi istenir. Potansiyometri esaslı ve biyoaktif bileşen olarak enzimlerin kullanıldığı bazı biyosensörlere ilişkin örnekler aşağıda verilmiştir.

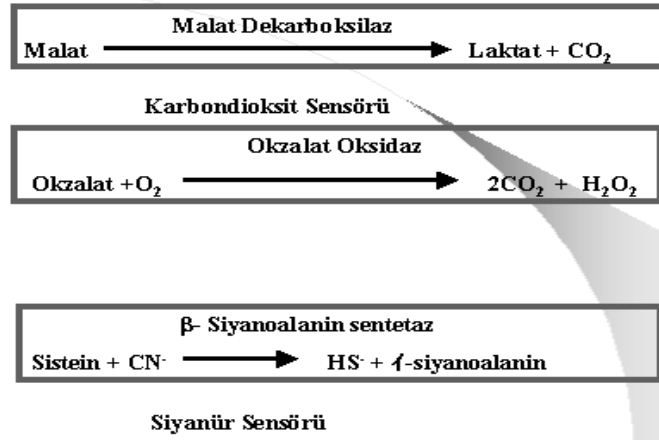


Amonyum Duyar Sensör



Amonyak Duyar Sensör

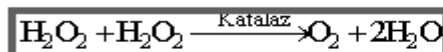
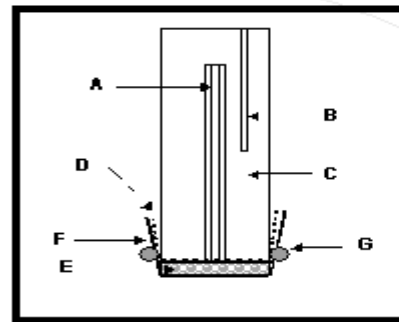




**Şekil 1.15** Potansiyometri esaslı biyoaktif bileşen olarak enzimlerin kullanıldığı bir grup biyosensör

### 1.2.1.2 Amperometrik sensörler

Bir mikro çalışma elektrodu ile bir karşıt elektrot arasına dışardan denge geriliminden farklı bir gerilim uygulanırsa, sistem yeniden dengeye ulaşmaya çalışır ve bu sırada bir elektrot tepkimesi olur yani iki elektrot arasından bir akım geçer. Bu yöntem amperometri adı verilir.



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

**Şekil 1.16** Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi.

Amperometrik ölçümlere dayanan sensörler giderek önem kazanmaktadır. Bu tür sensörlerin öncüsü ve en çok kullanılanı oksijen elektrotudur. Clark oksijen sensörü olarak da bilinen bu sistemde altın, gümüş veya platin katot, silikon ve teflondan yapılmış bir gaz geçirgen membran ile kaplıdır. Bu katot ile aynı zamanda bir karşılaştırma elektrodu olan bir gümüş anot arasına 1.5 voltluk bir pil bağlanır ve iki elektrot arasından geçen akım bunların arasına yerleştirilen bir mikroampermetre ile ölçülür. Bu elektrot sisteminin daldırıldığı çözeltide çözünmüş olan oksijen membrandan geçer ve katoda ulaşır ve uygulanan gerilimde indirgenir. İndirgenme akımı 1-10 mg/l derişim aralığında çözünmüş oksijen miktarı ile doğru orantılıdır. Bu elektrot ile gaz fazındaki oksijen miktarı tayin edilebilir.

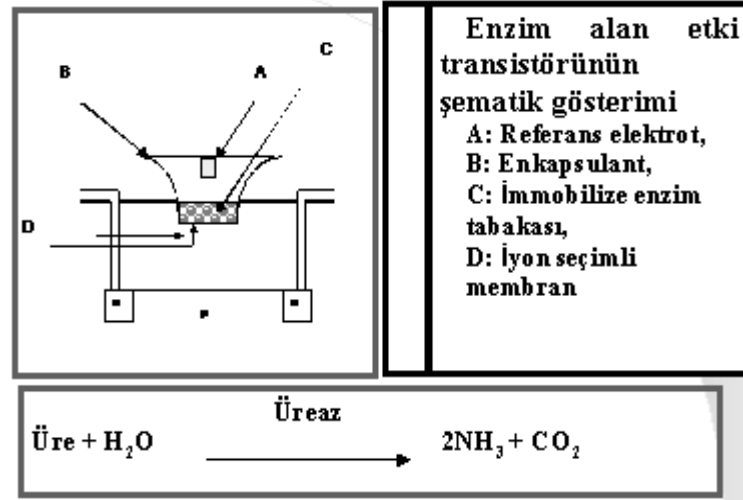
Oksijen problemleri platin bir katot ve gümüş klorür ile kaplı gümüş bir anodu içermektedir. Bunların her ikisi KCl çözeltisi içerisinde olup analit örnekten oksijen duyarlı membran aracılığı ile ayrılmaktadır. Membran boyunca difüzlener oksijen katoda indirgenir. Oluşan akım ise örnek içerisindeki oksijen miktarı ile orantılıdır. Biyolojik sistemlerin bu tip elektrotlar üzerine immobilizasyonu ile biyosensörün hazırlanması mümkündür ve enzimatik reaksiyonlarda oksijen tüketilen yada üreten enzimler bu tip sistemlerde biyolojik materyal olarak kullanılabilirler.

### **1.2.2 Yarı iletkenleri esas alan sensörler**

Temel sensör olarak metal oksit yarı iletken alan etki transistörlerini (MOSFET) yada iyon duyar alan etki transistörlerini (ISFET) esas alan bu tür enzim sensörleri, enzim ile alan etki transistörlerinin birleştirilmesini ifade edecek şekilde enzim alan etki transistörleri(ENFET) olarak adlandırılırlar.

MOSFET'lerin, gazların ölçümüne uygun hale getirilmesiyle oluşan gaz duyar sensörlerde(GASFET) adsorblanan gaz moleküllerinin disosiyasyonu ve oluşan yükün oksit tabakasına transferi temel ilkeyi oluşturur. Bu durum tabanın dielektrik sabitini

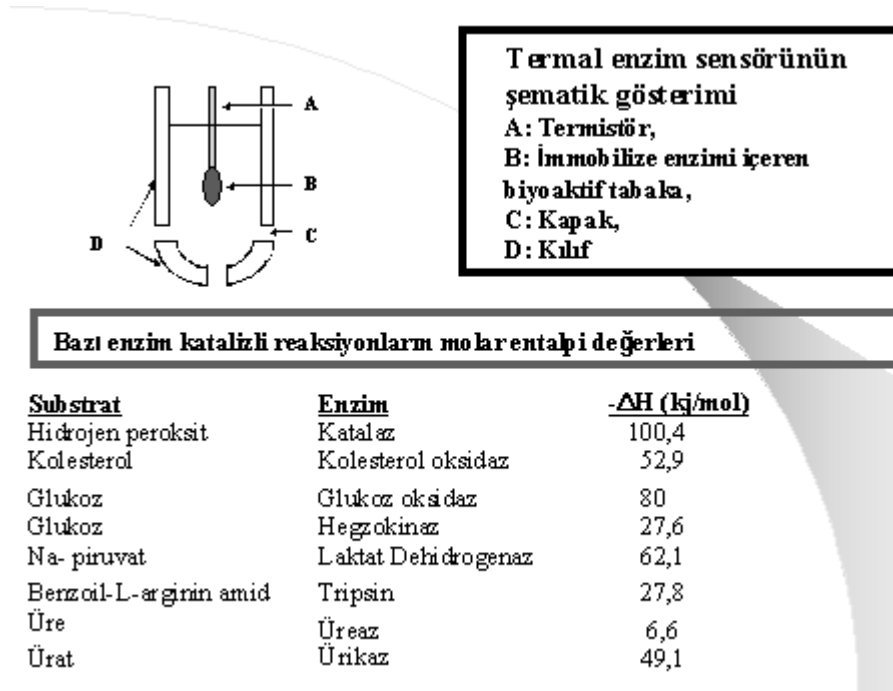
değiştirerek ve drain akımda bir modifikasyona yol acararak ölçüme imkan verir.



Şekil 1.17 Enzim alan etki transistorünün şematik gösterimi

### 1.2.3 Termometrik Esaslı Tayinler

Ekzotermik reaksiyonlarda kendiliğinden ısı açığa çıkmaktadır. Artan sıcaklık kimyasal reaksiyon sonucu koyulan substrat miktarı ile orantılıdır. *Kalorimetri* esaslı enzim sensörleri, termal enzim sensörleri, enzim termistörleri ya da entalpimetrik enzim sensörleri gibi değişik isimlerle tanımlanırlar. Temel ilkeleri bir enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanarak substrat konsantrasyonunu belirlemekten oluşur. Genel olarak enzimatik reaksiyonların ekzotermik doğasından yararlanılır. Enzimatik reaksiyon sonucu meydana gelen sıcaklık değişimi ile substrat konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca ulaşılır.



**Şekil 1.18** Termal enzim sensörünün şematik gösterimi ve bazı enzim katalizli reaksiyonların molar entalpi değerleri

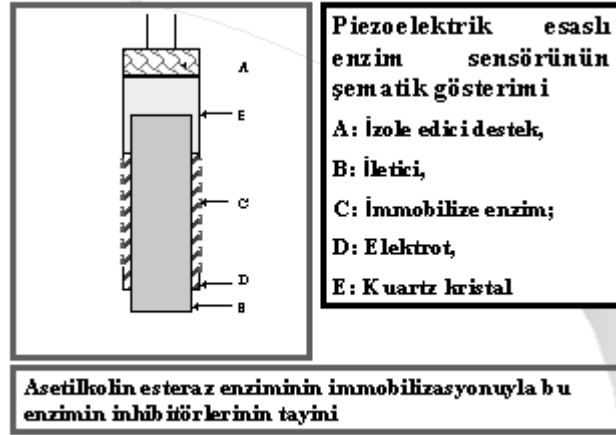
#### 1.2.4 Piezoelektrik Esaslı Tayinler

Piezoelektrik sensörler en genel anlamda karakteristik rezonans frekansındaki farklanmayı belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlelerinin ölçülmesi esasına göre çalışan gravimetrik aygıtlardır. Sensör seçiciliği, kristal yüzeyindeki madde ile spesifik bir etkileşime sahip analitin birikimiyle ilişkilidir. Sensör yüzeyinde bir madde adsorblandığı veya biriktiği zaman piezoelektrik kristalin rezonans frekansındaki farklanmanın ölçülmesiyle sonuca ulaşılır.

Bir piezoelektrik sensörün üzerinde enzim immobilizasyonu ile gerçekleştirilen piezoelektrik enzim sensörlerinde, enzim moleküllerine substratların bağlanmasından dolayı meydana gelen kütle değişimlerinin, piezoelektrik kuartz diskin vibrasyonunda sebep oldukları farklanmadan yararlanılarak madde miktarına ulaşılır.

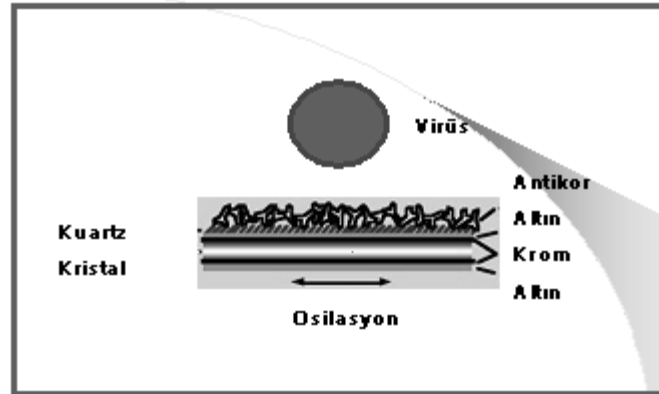
Bu prensip yardımıyla patlayıcı maddeler, tarım ilaçları, uyuşturucu maddeler veya mikroorganizmalar tespit edilebilir.





**Şekil 1.19** Piezoelektrik esaslı enzim sensörünün şematik gösterimi

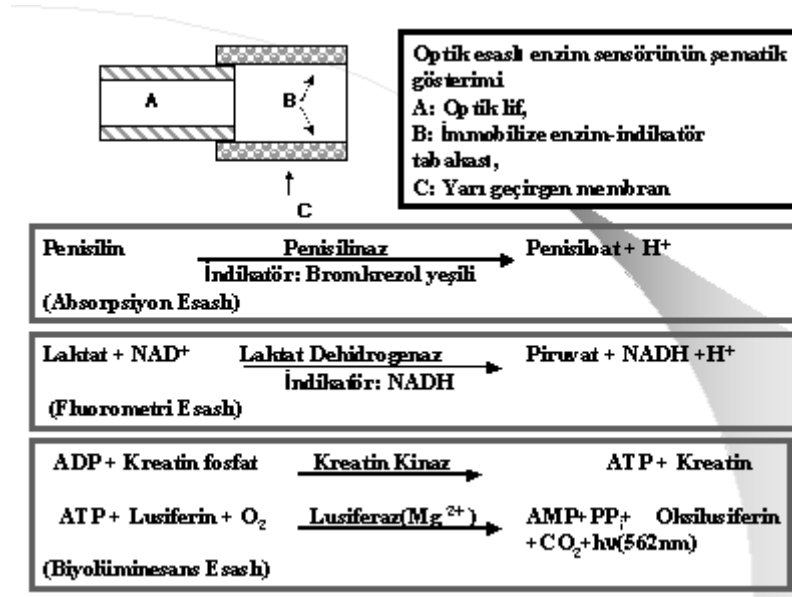
Piezoelektrik biyosensörler virüslerin tayininde de kullanılabilirler. Bu metodun dezavantajı her sensörün sadece bir defa kullanılması ve piezo kristalin maliyetinin yüksekliğidir.



**Şekil 1.20** Piezoelektrik esaslı enzim sensörünün virüslerin tayininde kullanımının şematik gösterimi

### 1.2.5 Fotometrik esaslı tayinler

Sıvılarda veya oksijen açığa çıkaran veya sarfeden enzim reaksiyonlarında optod kullanılarak oksijen miktarı belirlenir. Temel prensip floresansın izlenmesidir. Optik ölçü aparatı olarak, bir ucuna indikatör konulmuş fiber optik iletkeni kullanılır. Bu indikatörün lüminesans veya absorbe etme özelliği, aynı oksijen konsantrasyonunda olduğu gibi kimyasalın miktarına bağlıdır. Buradaki avantaj ölçüm yapılan cihaz ile optik ölçü aparatının birbirinden ayrı yerlerde bulunabilmesidir. Fiber optik iletken manyetik ve elektrik alanlardan etkilenmemektedir. Bu tip sensörlerin ucuz olması da araştırma alanı olmalarına sebep olmuştur. Biyolojik aktif madde ihtiva etmeyen optik kimyasal sensör olarak adlandırılır.



Şekil 1.21 Optik esaslı enzim sensörünün şematik gösterimi

### **1.3 Kimyasal tayin yöntemleri**

#### **1.3.1 Transformasyon reaksiyonları**

Tüm katalizatörler gibi, enzimler de belirli bir bileşenin bir transduserin belirleyebileceği ürün haline dönüşümünü sağlarlar. Buna örnek olarak penisilini penisilloik aside dönüştüren penisilnaz verilebilmektedir ki oluşan ürün bir pH elektrodu ile tayin edilebilir, oluşan sinyal ise ürünün konsantrasyonu ile orantılı olmaktadır.

Bir enzimatik reaksiyonun substratı, ayrıca tüketilen kosubstratın izlenmesi yoluyla da belirlenebilir. Bunun yanısıra, kofaktör kullanan pek çok enzimatik reaksiyonun da bu yolla izlenmesi söz konusu olmaktadır. Bu reaksiyona en güzel örnek kofaktör olarak NADH kullanan alkol dehidrogenaz verilebilir. İlgili kofaktörün flourometrik tayini ile etanol analizi mümkündür. Bununla birlikte, substratların yerine enzim inhibitörlerinin tayini gerçekleştirilebilir. Enzimatik reaksiyon hızlarına etkiyen inhibitörler, elde edilen sinyalde azalmaya sebep olacaktır ki buda inhibitör konsantrasyonu ile orantılıdır. Pestisit tayinine yönelik kullanılan kolin esteraz elektrodu buna örnek olarak verilebilir

#### **1.3.2. Bağlanma reaksiyonları**

Antijen ve antikorlar arasındaki bağlanmalar genellikle yüksek spesifikliğe sahiptir ve transduserler tarafından direkt olarak dedekte edilebilecek optik, kütleli ve elektriksel yükte farklanmaya sebep olmaktadır. Yükteki farklanmaların antikorun bir iyonofor molekül ile assosiyasyonu sayesinde potansiyometrik elektrot kullanımıyla belirlenebilmesi mümkündür. Antikorlar ve komplement sistemleri arasındaki reaksiyon kütleli farklanma oluşturur. Bağlanma süresinde oluşan kütleli farklanmalar piezoelektrik transduserler ile en kolay şekilde saptanabilir. Burada tayin sınırı oldukça düşük olup, genellikle çok düşük konsantrasyonlu olan enzim inhibitörleri yada immüno ajanların tayini için bu tip dedektörlerin kullanımı uygundur. Hem bağlanma hem de

transformasyon reaksiyonlarının belirlenmesi, immüno ajanların enzimatik olarak işaretlenmesiyle ayrıca gerçekleştirilmektedir.

## 1.4 Fenol ve Tirozinaz

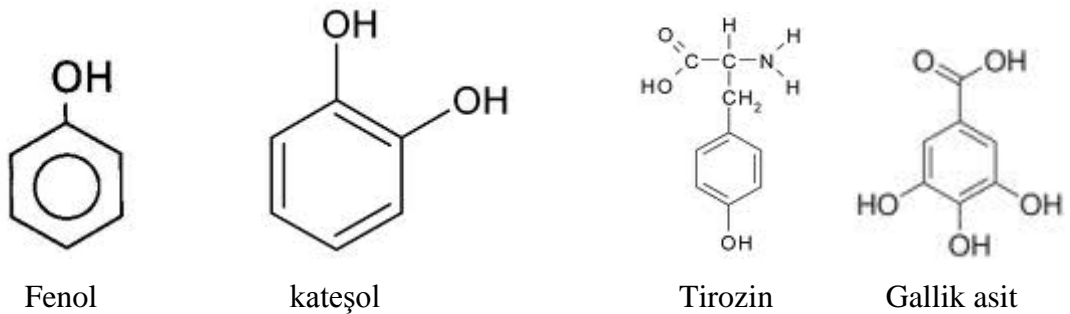
### 1.4.1 Fenol

Fenoller , aromatik halkaya bir yada daha fazla hidroksil grubunun bağlandığı , kristal yapılu organik maddelerdir.Renksizdirler ancak hava ile temas ettiklerinde renkleri kırmızıya döner.Fenoller zehirli bileşiklerdir.Birden çok polimerin (polifenoller , flavonoidler vb) çıkış maddesidir.

Bitki yaprak ve dokularında fenolik maddelerin sentezlenmesini sağlayan reaksiyonlar oluşur.Bitkilerdeki fenolik bileşiklerin birçoğu iki biyokimyasal grupta incelenir.1)Flavonoid bileşikler : Bu fenolik maddeler bitkileri UV ışınlarına ve mikroorganizmalara karşı korur 2)6 karbonlu halkanın 1 ve 3 karbon zinciri ile bunların türevlerini içerdiği bileşikler grubu (kafeik asit, gallik asit , hidrolize olabilen tanenler , tirozin, lignin).Basit fenolik bileşiklerin önemli bir kısmı fenolik asitler ve fenilpropanoidlerin sentez yollarının ara ve son ürünleridir.

Bitkilerde kararma , kimyasal olarak açıklanabilen ve çoğunlukla okside olan polifenoller nedeniyle ortaya çıkan bir olaydır.

İnsanlarda ise fenoller yapılarında bulunduran flavonoidler bağışıklık sistemini güçlendirir ve kalp krizi riskini azaltır.



**Sekil 1.22** Bazı fenolik bileşikler

### 1.4.2 Tirozinaz

Monofenol monooksijenaz (E.C Number 1.14.18.1)

Tirozinaz bütün canlılarda bulunan melanin sentezini sağlayan, saç ve deri pigment yapısının oluşmasını sağlayan enzimdir (Asav et. al, 2008).Tirozinaz fenollerin oksidasyonunu katalizler.Hayvan ve bitki dokularında tirozinin oksidasyonunu katalizleyerek melanin ve diğer pigmentlerin oluşumunu sağlar.

Stabilite : -20°C 'de 1 yıl

Moleküler Ağırlık : 125,000

İzoelektrik Nokta :4,7-5

Optimum p H :6-7

Optimum Sıcaklık :30-35 °C

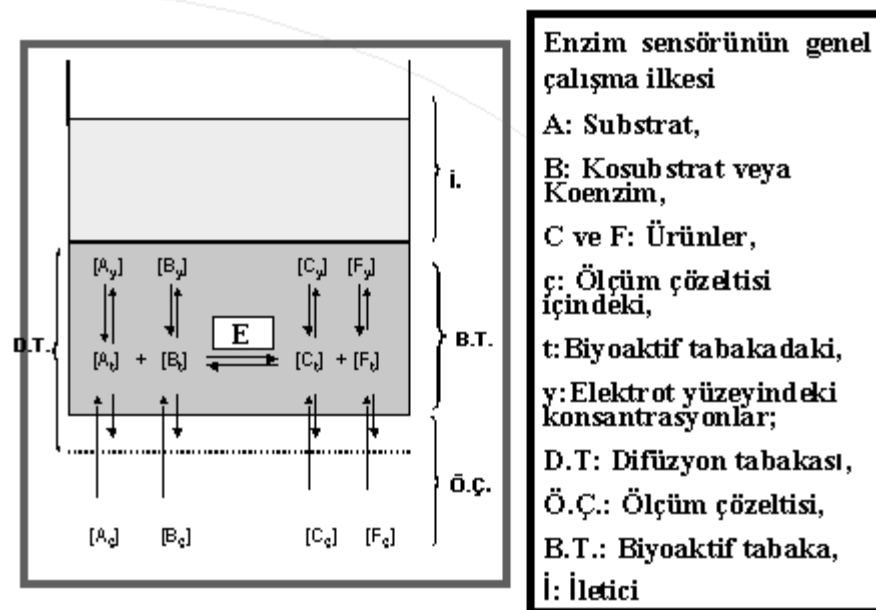
### 1.5 Enzim Sensörünün Genel çalışma ilkesi

En genel anlamda bakıldığında diğer biyosensörlerde olduğu gibi enzim sensörleri de biyoaktif tabaka, iletici ve ölçüm sisteminden oluşur. Diğer biyosensörlerden tek fark biyoaktif tabakada biyomolekül olarak enzimlerin yer almasıdır. Buna karşılık diğer biyosensörlerde olduğu gibi biyoaktif tabakanın iç ve dış yüzeylerinde membranlar, iletici ile ölçüm düzeneği arasında sinyal yükselticiler, mikroişlemciler veya ölçüm düzeneğiyle bağlantılı kaydedici veya bilgisayar sistemleri gereksinimlere göre eklenen unsurlardır.

Bir enzim sensörünün çalışma ilkesi enzim veya enzimlerin immobilize edilmiş olduğu biyoaktif tabakadaki olayların biraz daha yakından incelenmesiyle daha kolay bir şekilde anlaşılabilir. Bir enzim elektrodunda enzimi içeren biyoaktif tabaka, enzimin katalizlediği reaksiyona uygun bir iletim ve ölçüm sisteminin uzantısı olan bir iletici ile birleştirilmektedir. İletim sistemi biyoaktif tabakada gerçekleşen enzimatik reaksiyon sonucu substrat, kosubstrat (veya koenzim) konsantrasyonundaki azalış yada ürün konsantrasyonundaki artışı tesbit edebilecek şekilde seçilebilir. Konsantrasyonların hızlı

bir şekilde dengeye ulaşabilmesi için difüzyon engelini en aza indirmek amacıyla biyoaktif tabaka kalınlığının mümkün olduğunca ince olması gerekmektedir.

Bunun yanısıra biyoaktif tabakada sabit bir substrat konsantrasyonu sağlayabilmek için ölçüm çözeltisinin yeterli bir şekilde karıştırılması gerekmektedir. Doğal olarak tayin edilecek türlerin ölçüm çözeltisindeki, biyoaktif tabakadaki ve biyoaktif tabaka ilecti arayüzündeki konsantrasyonları farklı olur. İletici sistemin ölçeceği sinyal biyoaktif tabaka-iletici ara yüzündeki konsantrasyonlara ilişkindir. Ancak söz konusu konsantrasyonlar denge halinde ölçüm çözeltisindeki konsantrasyonlarla orantılı olduğu için çoğu zaman rölatif bir yolla sonuca ulaşılır. Şekil 1.26' da bir enzim sensörünün genel çalışma ilkesi, substrat, kosubstrat, ürün ve diğer bileşenlerde belirtilerek gösterilmiştir.



Şekil 1.23 Enzim sensörünün genel çalışma ilkesi

## 1.6 Jelatin

Jelatin, kollajenin hidroliziyle elde edilen bir proteindir ve karakteristik olarak yapısında yüksek oranda glisin, prolin ve hidroksiprolin amino asitlerini içerir. Bu

amino asitler jelatinin üçlü heliks bir yapı oluşturmasında ve jelleşme özelliği kazanmasında oldukça etkilidir. Ucuz ve kolay bulunur olması yanında, immobilizasyon materyali olarak kullanılan diğer polisakkaritlerin aksine jel oluşumu için herhangi bir moleküle, iyon, tuza ya da pH ayarlamasına gerek duymaması jelatinin enzim, hücre ve doku immobilizasyonunda sıklıkla tercih edilmesini sağlamaktadır. Termal ve mekanik kararlılığının artırılması amacıyla immobilizasyonda çoğunlukla çapraz bağlayıcı bir reaktif olan glutaraldehid ile birlikte kullanılır .

### **1.7 Glutaraldehid**

Glutaraldehid, özellikle enzimlerin kovalent immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan bifonksiyonel bir reaktiftir. Biyosensör geliştirilmesinde kullanılan biyoaktif materyallerin(enzim, hücre, doku, vb.), jelatin, kollajen, kitosan gibi biyolojik moleküllerle birlikte glutaraldehid ile çapraz bağlar oluşturması esasına dayalı immobilizasyon yöntemi oldukça yoğun bir şekilde kullanılmaktadır . Yöntem kolay uygulanabilir olması yanında immobilize sistemin termal ve operasyonel aynı zamanda da depo kararlılığını artırması bakımından tercih edilmektedir. Mikroorganizmalar için toksik etki göstermesine rağmen biyoaktif sisteme kazandırdığı avantajlardan dolayı % 1,0'in altındaki konsantrasyonlardaki glutaraldehidin kullanılmasıyla hücre immobilizasyonları da gerçekleştirilmektedir.

## 2. MATERYAL METOD

### 2.1. Materyal

Çalışmanın deneysel kısmında kullanılan araç – gereç ve kimyasallar aşağıda verilmiştir.

#### 2.1.1. Araç – Gereçler

- WTW Multiline P4 serisinden Oksijenmetre
- Cellox 325 Çözünmüş oksijen probu
- Volac Otomatik pipet
- Grand Termostatlı Su banyosu
- Manyetik Karıştırıcı

#### 2.1.2. Kimyasallar

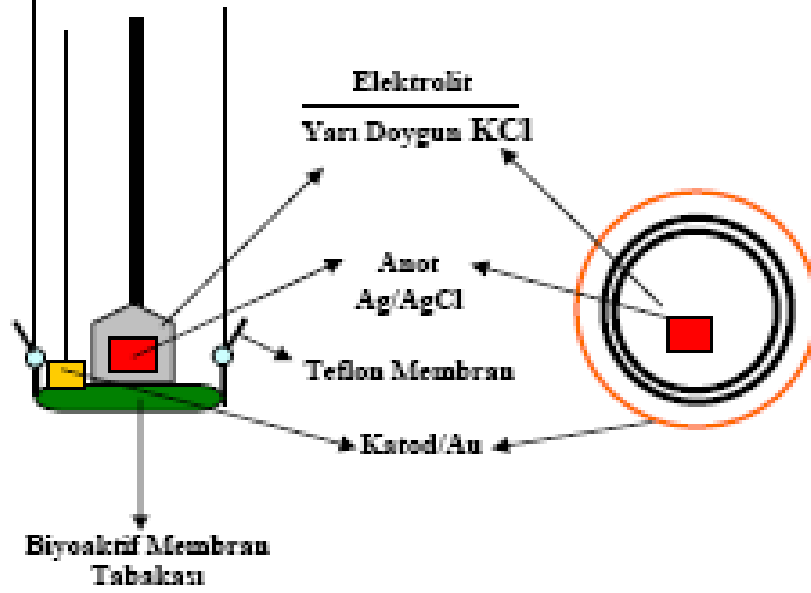
- Potasyum – fosfat tamponları
- Sitrat tamponları
- Glisin tamponları
- Tris – HCL tamponları
- Glutaraldehid ( %0,125, %0,25, %0,5 )
- Stok fenol çöz. (1000mm)
- Stok fenol çözeltileri
- İnhibitör olarak kullanılan çözeltiler
- Tirozinaz enzimi

### 2.2. Çözünmüş Oz Probonun Çalışma İlkesi

Çözünmüş oksijen problemleri amperometrik esaslı olup katod olarak altın (Au), anot olarak Ag/AgCl (Referans elektrot) ve elektrolit olarak da yarı doygun KCl çözeltisi içerir. Prob yüzeyi 0,0005" kalınlığında oksijene duyar bir teflon membran ile çevrelenir . Membran, gaz geçirgenliğinin yanısıra sensörün dış çevreden korunmasına

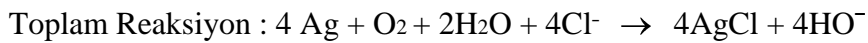
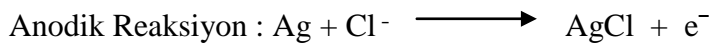
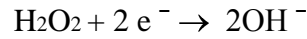
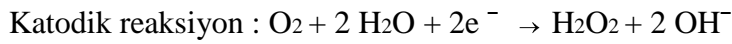


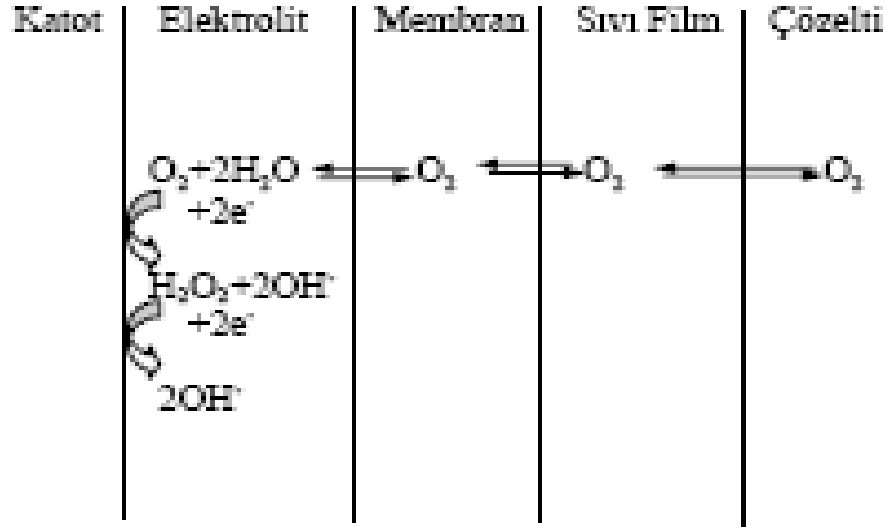
da olarak sağlar bu korunma sayesinde reaksiyon ortamında olabilecek bir takım safsızlıklardan kaynaklanması muhtemel girişim etkileri de minimize edilmiş olmaktadır.



**Şekil 2.1** Çözünmüş oksijen probunun şematik gösterimi

Sensöre polarize edici bir voltaj uygulandığında, membranı geçen oksijen katotta bir akım doğuracak şekilde reaksiyon verir. Polarografik esaslı olarak gerçekleşen toplam elektrot reaksiyonlarını aşağıdaki gibi özetlemek mümkündür;



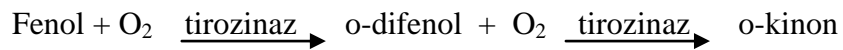


**Şekil 2.2** Oksijenin reaksiyon ortamından katoda ulaşana kadar karşılaştığı difüzyon engellerinin şematik gösterimi.

Katoda doğru difüzlenen oksijene etkiyen kuvvet membran dışındaki çözünmüş oksijen konsantrasyonu ile orantılıdır. Oksijen basıncının artmasıyla membrana doğru difüzlenen oksijen miktarı da artacak ve ortamdaki çözünmüş oksijen konsantrasyonu ile ilişkili olarak daha yüksek düzeyde bir akım elde edilecektir.

### 2.3. Tirozinaz Enziminin Kompetitif İnhibitörlerinin Tayinine Yönelik Geliştirilen Biyosensörün Çalışma İlkesi

Tirazinaz enzimiyle hazırlanan biyosensör ile okunan oksijen konsantrasyonu, prob ile biyoaktif tabaka arasındaki ara yüzey olarak tanımlanan bölgedeki çözünmüş oksijen konsantrasyonudur.



Reaksiyon ortamında substrat yokken arayüzey oksijen konsantrasyonu oksijenmetreden % olarak belirlenir. Reaksiyon ortamına substrat ilave edildiğinde oksijen harcanarak fenolden ortodifenol ve ortokinon oluşur(Evtugyn et. al, 1997) . Bu durumda katottaki sürekli oksijen indirgenmesi sonucu ara yüzeyden proba doğru

oksijen difüzyonu devam ederken oksijenin biyoaktif tabakadan arayüze difüzlendiği oksijen konsantrasyonunda bir azalma meydana gelir. Substrat ve inhibitörün birlikte ilavesiyle oksijen miktarındaki azalma daha az gözlenir.

İnhibitör artışıyla beraber biyoaktif tabakada harcanan oksijen miktarı azalır ve çözölmüş oksijen konsantrasyonundaki değışim azalır.

### **2.3.1. Tirozinaz Enziminin Kompetitif İnhibitorlerine Yönelik Biyosensör Hazırlanması**

Biyosensörün hazırlanmasında izlenen işlem basamakları şu şekildedir:

- 1) 25000 U'lık Tirozinaz enziminden fosfat tamponunda 50U'lık 210 µl'lik porsiyonlar hazırlandı.
- 2) 5 mg jelatin 210 ml'lik enzim çöz'de 38°C'lik su banyosunda çözünür duruma getirildi.
- 3) Elektrodun yüzeyi % 0,5'lik SDS ile muamele edilir.
- 4) Jelatin – Tirozinaz enzimi karışımınının 200 µl'si elektrod membronu yüzeyine yayılır.
- 5) +4°C'de 30 dakika süreyle beklemeye bırakılır.
- 6) Bekleme süresi tamamlandıca elektrod % 2,5'lik Glutaraldehid çözeltisi ile 4 dakika muamele edilir.
- 7) Glutaraldehid muamelesi sonrası elektrod saf su ile yıkanır, daha sonra çalışma sıcaklığı ve tamponunda bekletilir.

Hazırlanan elektrod biyoaktif tabakanın kurummasını önlemek amacıyla içersinde tampon bulunan kapta +4°C'de saklanır.

### 2.3.2. Enzim Temelli Biyosensör ile Tirozinaz Kompetitif İnhibitörlerinin Tayini için Ölçüm düzeneği

Biyosensör çalışma öncesi, 5 dk çalışma sıcaklığı olan 35°C’de çalışma tamponunda (pH=7 fosfat tamponu) bekletilerek polarize edilir. Polarizasyonun ardından 5 dk daha çalışma tamponu içeren reaksiyon hücresinde bekletilir. 5 dakikanın sonunda biyosensör sabit bir oksijen konsantrasyonuna ulaşmıştır ve fenol reaksiyon hücresine enjekte edilir. Enjekte edilen fenol konsantrasyonuna bağlı olarak oksijen miktarında düşme gözlenir ( $\Delta\zeta_1$ ) inhibitör ve substrat birlikte enjekte edilir ve düşme gözlenir( $\Delta\zeta_2$ ). İnhibitörün miktarı arttıkça oksijen miktarındaki düşüş azalacaktır.

10 dk boyunca 0. anda ve dakika başlarında oksijen miktarı kaydedilir, başlangıç ile 10.dakikadaki değer arasındaki oksijen farkı hesaplanır.

Ölçüm tamamlandığında biyosensör saf su ile yıkanır, tekrar polarize ortama konur, ölçüme devam edilecekse reaksiyon hücresi boşaltılır, saf su ile yıkanır ve tekrar çalışma tamponu ile doldurularak çalışma sıcaklığında bekletirilir.Eğer çalışmaya daha sonra devam edilecekse oksijen probu +4°C’de bekletirilir.

### 2.4. Tirozinaz Enziminin Kompetitif İnhibitörlerinin Tayini:

Çalışmanın bu bölümünde tirozinaz enziminin kompetitif inhibitörlerinin tayini amacıyla sistein, sodyum metabisülfid, tiyoüre ve glutatyon ile denemeler yapıldı(Gulcin et. al, 2005).

Denemeler 35°C’deki potasyum fosfat tamponunda (pH:7, 50mM) gerçekleştirildi. Substrat olarak kullanılan fenolün 250 $\mu$ m, 500 $\mu$ m, 750 $\mu$ m ve 1000 $\mu$ m’lık değişen konsantrasyonlarına bağlı olarak sabit inhibitor konsantrasyonu ile oksijen konsantrasyonundaki farklanma gözlenmiştir.

## **2.5. Tirozinaz Enziminin Kompetitif İnhibitörleri Tayinine Yönelik Geliştirilen Biyosensörün Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyonu**

Biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonu çalışması doğrultusunda; biyoaktif tabakada değişik oranlarda enzim, jelatin ve glutaraldehid içeren karışımlar kullanılarak hazırlanan biyosensörlerle ölçümler yapılarak bunların biyosensör cevabı üzerine etkileri incelendi.

### **2.5.1 Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi**

Tirozinaz enziminin kompetitif inhibitörlerinin tayinine yönelik enzimatik biyo sensörlerde enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla, jelatin miktarı 5mg ve glutaraldehid yüzdesi (%2,5) sabit tutulup farklı miktarlarda enzim miktarı kullanılmasıyla biyosensör hazırlandı.

Denemeler 35°C'deki potasyum – fosfat tamponunda (ph:7; 50mm) gerçekleştirildi. Farklı oranlarda fenol kullanılarak hazırlanan standart grafiğinin yardımıyla enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkileri incelendi.

Yapılan çalışmada, 53 U'lık porsiyonlara ayırdığımız piruvat oksidaz enzimi farklı miktarlarda potasyum – fosfat tamponunda (ph: 7; 50mm) çözündürülerek enzim miktarı farklılaştırılarak 26,5 U'lık 53 U'lık ve 106 U'lık enzimlerle ölçüm yapılmıştır. Çalışmalarda 5mg jelatin ve %2,5 glutaraldehid çözeltisi kullanılmıştır.

### **2.5.2 Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi**

Tirozinaz enziminin kompetitif inhibitörlerinin tayinine yönelik geliştirilen tirozinaz temeli biyosensörde jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi çalışmasında enzim miktarı ve glutaraldehid miktarı sabit tutuldu, bununla birlikte değişen jelatin miktarında biyosensörler hazırlanarak ölçümler gerçekleştirildi.

200ml tampon (ph:7; 50mm) + 2,5mg jelatin + %2,5 glutaraldehid

200ml tamp (ph:7; 50mm) + 5mg jelatin + %2,5 glutaraldehid

200ml tmp (ph:7; 50mm) + 10mg jelatin + % 2,5 glutaraldehid

Hazırlanan biyosensör ile yapılan ölçümlerden elde edilen standart grafiğinden yararlanılarak jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkileri incelendi. Ölçümler potasyum – fosfat tamponunda (ph: 7; 50mm) ve T: 35°C’de gerçekleştirildi.

### **2.5.3 Glutaraldehid miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi**

Biyoaktif materyalin immabilizasyonunda çapraz bağlayıcı reaktif olarak glutaraldehid kullanıldı. Glutaraldehid miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisini belirlemek amacıyla; biyoaktif tabakanın bileşenleri olan enzim ve jelatin miktarları sabit tutularak değişen oranlarda glutaraldehidin kullanıldığı biyosensör hazırlandı.

Hazırlanan biyosensörler ile yapılan ölçümlerden elde edilen std. grflerinden yararlanarak immabilizasyonda çapraz bağlayıcı reaktif olarak kullanılan glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkileri incelendi.

200ml tampon (ph=7; 50mm) +5mg jelatin + % 1,25 glutaraldehid

200ml tampon (ph=7; 50mm) +5mg jelatin + %2,5 glutaraldehid

200ml tampon (ph=7; 50mm) +5mg jelatin + %5 glutaraldehid

Ölçümler potasyum fosfat tamponunda (ph=7; 50mm) ve 35°C’de gerçekleştirildi.

## **2.6 Tirozinaz Enziminin Kompetitif İnhibitörlerinin Tayinine Yönelik Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonu**

### **2.6.1. Optimum pH değerinin belirlenmesi:**

Biyoaktif tabaka bileşenleri optimize edilen biyosensörün optimum pH'sının belirlenmesi amacıyla; pH:5 – 6 sitrat tamponu, pH:7 – 8 fosfat tamponu, pH:9 – 10 glisin tamponu kullanıldı. Ölçümler 35°C'de 500mm fenol ve 500mm Cys varlığında gerçekleştirildi.

### **2.6.2. Optimum sıcaklığın belirlenmesi:**

Bu çalışmada 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C ve 45°C'lerde ölçümler gerçekleştirildi. Ölçümler 500mM fenol ve 500mm sistein varlığında, fosfat tamponunda (50mm, pH:7) gerçekleştirildi.

## **2.7 Tirozinaz Enziminin Kompetitif İnhibitör Tayinine Yönelik Biyosensör Karakterizasyonu:**

Kompetitif inhibitörlerin tayinine yönelik tirozinaz enzim temelli biyosensörün tayin aralığı kompetitif inhibitörlerin tayinine ilişkin doğrusal tayin aralığının belirlenmesi amacıyla fenol konsantrasyonu sabit tutularak artan konsantrasyon değerlerinde inhibitörlerle ölçüm yapılır. Ölçümler sonucunda standart. grafiği elde edildi.

### **2.7.1 Operasyonel kararlık**

Geliştirilen biyosensörün operasyonel kararlılığın belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan biyosensör daha önce optimizasyonu yapılarak belirlenmiş olan çalışma sıcaklığında ve çalışma tamponunda bekletilerek her saatte bir 500mM fenol ve 500mM Cys ile ölçümler alındı.

Başlangıçta elde edilen biyosensör cevabı %100 kabul edilerek her saat başı yapılan ölçümlerde elde edilen biyosensör cevapları ile kıyaslandı.

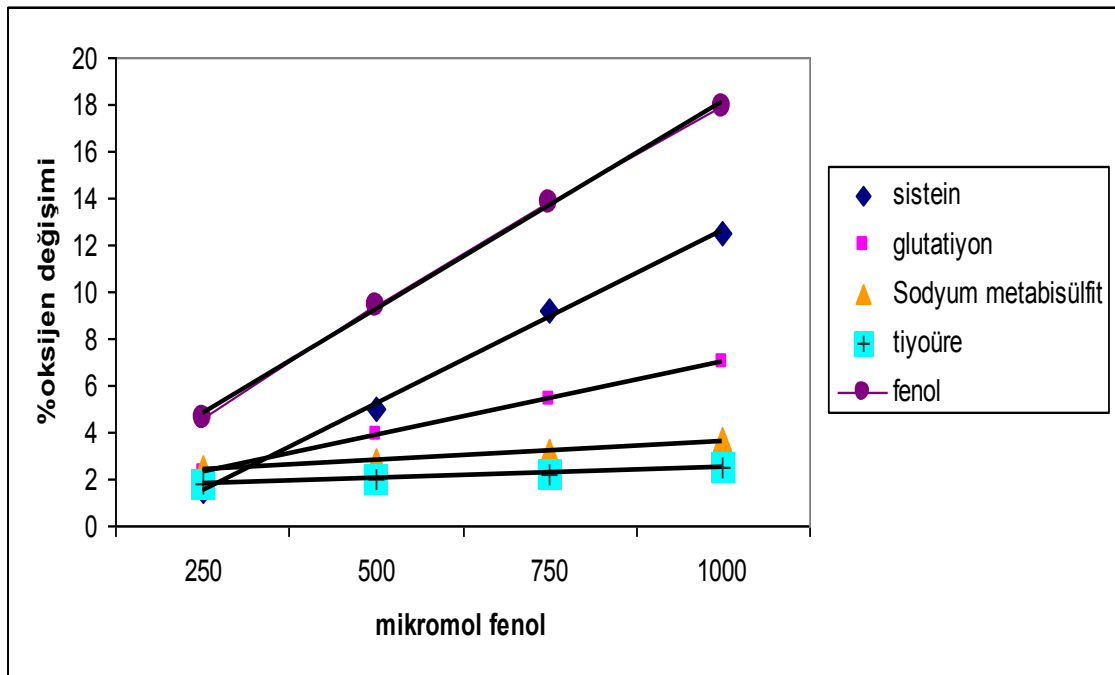


### 3. BULGULAR VE TARTIŞMALAR

#### 3.1. Tirozinaz Enzimin Kompetitif İnhibitörlerinin Tayinine Yönelik Bulgular

Tirozinaz enziminin kompetitif inhibitörlerinden tayini amacıyla sistein, sodyum metabisülfid, tiyoüre ve glutatyon ile denemeler yapılmıştır. Yapılan denemelerde inhibitör konsantrasyonları 1000 $\mu\text{m}$ 'da sabit tutulmuş, substrat konsantrasyonları ise 250 $\mu\text{m}$ , 500 $\mu\text{m}$ , 750 $\mu\text{m}$  ve 1000 $\mu\text{m}$  değerlerinde ölçümler yapılmıştır.

Ölçümler neticesinde elde edilen grafik aşağıdaki gibidir:



**Şekil 3.1** Tirozinaz enzimine inhibitör etkisi gösteren maddelerin incelenmesi

Tirozinaz enziminin kompetitif inhibitörlerinin tespiti amacıyla yapılan ölçümler sonucunda çizilen grafikte görüldüğü gibi inhibitör kullanılarak yapılan ölçümlerde oksijen konsantrasyonu yüzdesinde değişim gözlenmiştir. İnhibitör davranışının en iyi gözlemlendiği inhibitör olarak sistein bulunmuştur.

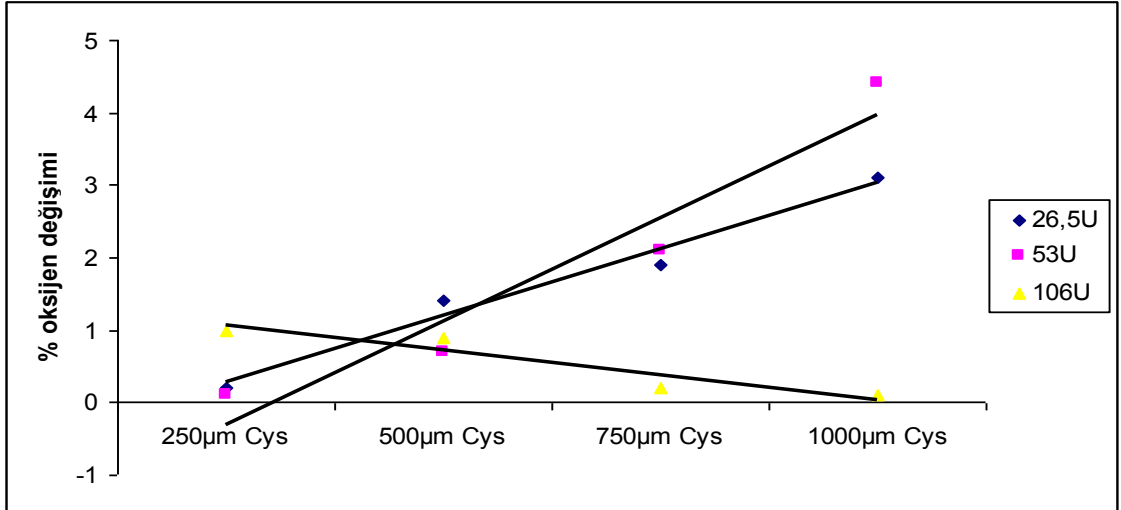
### 3.2. Tirozinaz Enziminin Kompetitif İnhibitörlerinin Tayinine Yönelik Biyosensörde Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyonuna İlişkin Bulgular

Bu bölümde tirozinaz kullanılarak hazırlanan biyosensörlerde, enzim miktarı, jelatin miktarı ve glutaraldehid oranlarının biyosensör cevabına etkilerinin incelendiği, biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonuna ilişkin sonuçlar verilmiştir.

#### 3.2.1 Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin incelenmesi:

Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla jelatin ve glutaraldehid miktarı sabit tutulup bununla birlikte biyoaktif membran tabakasında 26,5U, 53U ve 106U tirozinaz aktivitesi olacak şekilde hazırlanan biyosensörlerle yapılan ölçümler sonrası elde edilen sonuçlara ait standart grafikleri çizildi.

Hazırlanan biyosensörlerle yapılan deneyler sonrası elde edilen grafikler aşağıdaki gibidir.



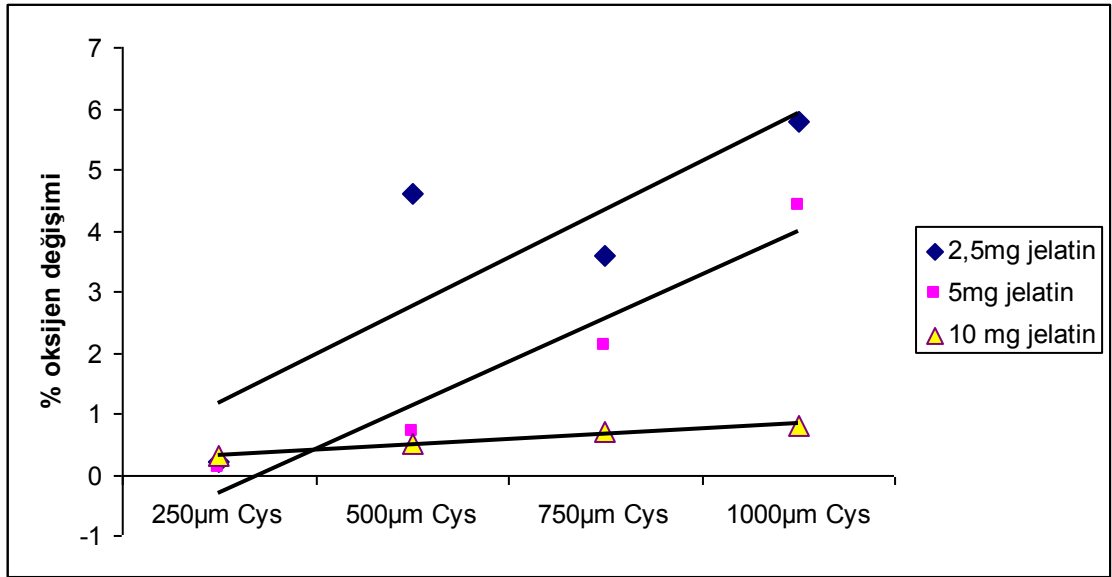
Şekil 3.2 Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerinde etkisi

Tüm bu biyosensörler için jelatin miktarı 5mg, glutaraldehit oranı %2,5'tur.

Elde edilen sonuçlar sonrası en ideal biyosensör cevabının  $53\text{U}/\text{cm}^2$  'lik tirozinaz aktivitesi olacak şekilde hazırlanan biyosensör ile alındığı belirlendi. Bu aktivitedeki tirozinaz enzimi ile hazırlanan biyosensör ile  $250\mu\text{m}$  ve  $1000\mu\text{m}$  sistein aralığında doğrusal tayin yapılabilmektedir.

### 3.2.2 Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Jelatin tabanlı tirozinaz inhibitörlerinin tayinine yönelik biyosensörleri cevabına jelatin miktarının etkisinin incelendiği çalışmada biyosensörler hazırlanırken daha önce en uygun enzim miktarı olarak belirlenen  $53\text{U}/\text{cm}^2$  aktiviteye sahip tirozinaz ve %2,5'lik glutaraldehid oranları sabit tutulup biyoaktif tabakada 2,5 – 5 – 10mg jelatin/ $\text{cm}^2$  olacak şekilde değişen oranlarda jelatin kullanıldı. Ölçümler sonrası elde edilen grafik şekil 3.3'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3 Jelatin miktarının biyosensör üzerinde etkisi

Şekilde anlaşıldığı gibi biyoaktif tabakadaki jelatin oranı arttıkça zaman biyosensörün verdiği cevapta azalma gözlemlenmiştir. 10mg jelatin kullanıldığında enzim aktivitesi üzerine hem jelatinden kaynaklı hemde inhibitörden kaynaklanan etki söz

konusu olmuştur. Jelatin miktarı arttığında biyoaktif membran tabakası kalınlaşır ve enzim engeli söz konusudur.

10 mg'ın üzerine çıkılmamasının nedeni elektrod yüzeyinin daha fazlasını taşıyamamasındandır. Jelatin miktarı 2,5mg'a düştüğü zaman, 5mg ile hazırlanan biyosensörden daha yüksek cevap alındı. Ancak doğrusallık yoktur. Jelatin miktarı azaldığında biyoaktif tabakada incelme olduğundan substrat difüzyonu probleminde azalma olur. Aynı konsantrasyonda inhibitör ve substrat değerlerinde daha yüksek sonuçlar alınmasının nedenide tabakadaki incelmedir.

2,5 mg jelatin miktarı kullanım açısından oldukça zordur. Biyosensörün hazırlama aşamasında viskozitenin oldukça düşük olması, oksijen probu yüzeyine yayma aşamasında uygulama zorluklarına neden olmuştur.

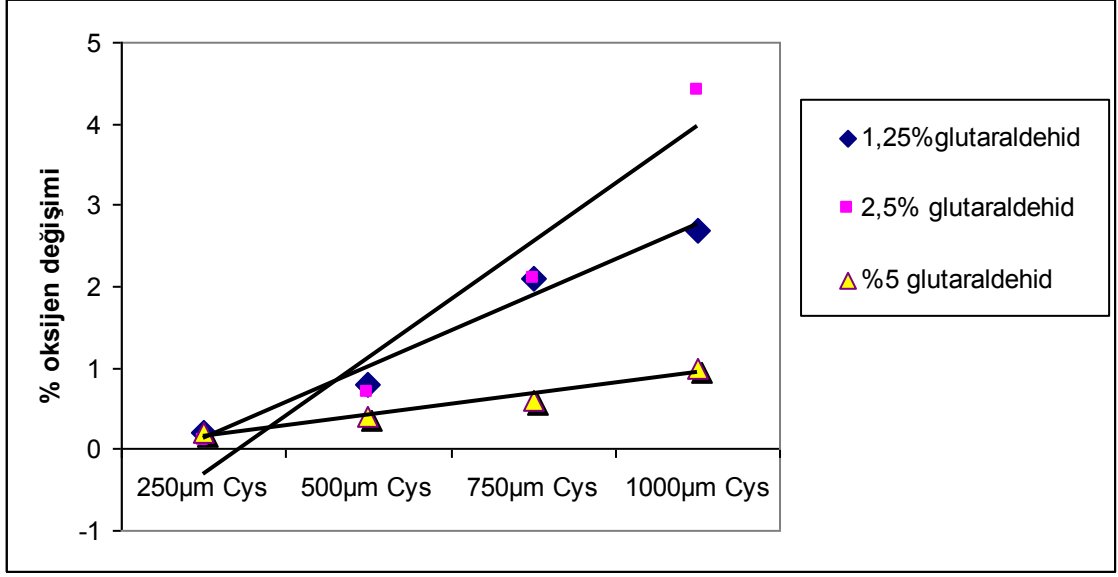
Şekil 3.3 'ü göz önüne alırsak 250mm – 1000mm inhibitör değişiminde doğrusal sonucun 5mg jelatin miktarında olduğunu söyleyebiliriz. Bu nedenle 5mg jelatin miktarı optimum olarak kabul edilmiştir.

### **3.2.3 Glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisi**

Glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla biyoaktif tabaka bileşenleri optimum değerlerde tutularak hazırlanan biyosensörde enzim miktarı 53U, jelatin miktarı 5mg'dır.

Çapraz bağlayıcı reaktif olarak kullanılan glutaraldehit oranı ise %1,25 - %2,5 - %5 şeklindedir.

Hazırlanan biyosensörle yapılan denemeler sonrası elde edilen standart grafikler şekil 3.4'de verilmiştir.



**Şekil 3.4** Glutaraldehid miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

%1,25 – %2,5 – %5 Glutaraldehid çözeltisi ile hazırlanan biyosensörler ile alınan sonuçlar Şekil 3.4'te grafiğe geçirilmiştir. Grafikten de anlaşılacağı gibi en iyi sonuçlar %2,5 Glutaraldehid çözeltisi kullanıldığı zaman elde edilmiştir. %1,25'lik glutaraldehid kullanıldığı zaman çapraz bağların açık olması sonucunda oksijenin giriş çıkışını çok kolaylaştırır. Bu yüzden yüksek sonuçlar elde edilmiştir. Grafikte görülen düşüşün tam olarak inhibitöre bağlı olduğunu söyleyemeyiz. %5 Glutaraldehid çözeltisi kullanıldığı zaman enzim – enzim, enzim – jelatin, jelatin – jelatin arası bağlar daha fazla sıkı olur ve bu da difüzyon problemine yol açar. Enzim aktivitesinde azalma gözlenebilir çünkü sterik bir engelleme söz konusudur.

Şekil 3.4'teki grafiğe bakıldığı zaman en doğrusal sonucun, çapraz bağlayıcı glutaraldehidin %2,5'lik değerinde olduğu görülmüştür. Ve bu sonuçlardan %2,5'lük glutaraldehid çözeltisinin kullanılmasına karar verilmiştir.

### 3.3 Tirozinaz Enziminin Kompetitif İnhibitörlerinin Tayinine Yönelik Geliştirilen Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonuna Yönelik Bulgular:

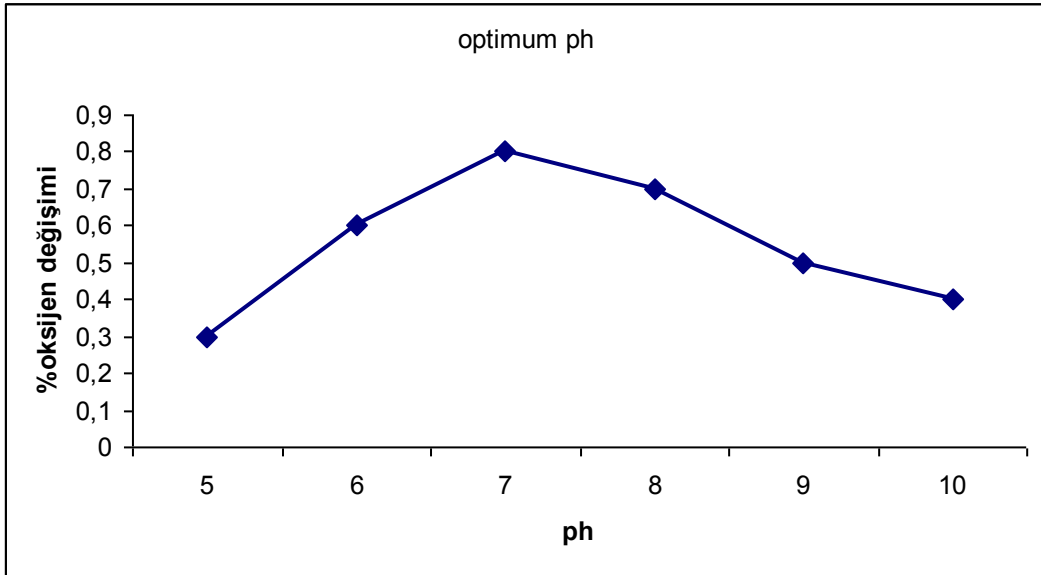
Tirizonaz kullanılarak biyosensörlerin optimum pH, optimum sıcaklık gibi çalışma koşullarına ait optimizasyon sonuçları bu bölümde verilmiştir.

#### 3.3.1. Optimum pH

Çalışma pH'sının biyosensör cevabı üzerine etkisini ve dolayısıyla biyosensörün optimum pH değerini belirlemek üzere farklı pH değerlerinde sitrat, fosfat, glisin tamponlarının kullanıldığı pH optimizasyonuna dayalı çalışmalar gerçekleştirildi.

Belirlenen pH noktalarında öncelikle substrat ile ölçümler yapıldı ( $\Delta 1$ ). Ardından substrat + inhibitörle ölçümler yapıldı ( $\Delta 2$ ).

$\Delta O = \Delta 1 - \Delta 2$  olarak belirlenmiştir ve buna bağlı olarak çizilen grafik aşağıdaki gibidir.



**Sekil 3.5** PH değerlerinin oksijen konsantrasyonu üzerinde etkisi

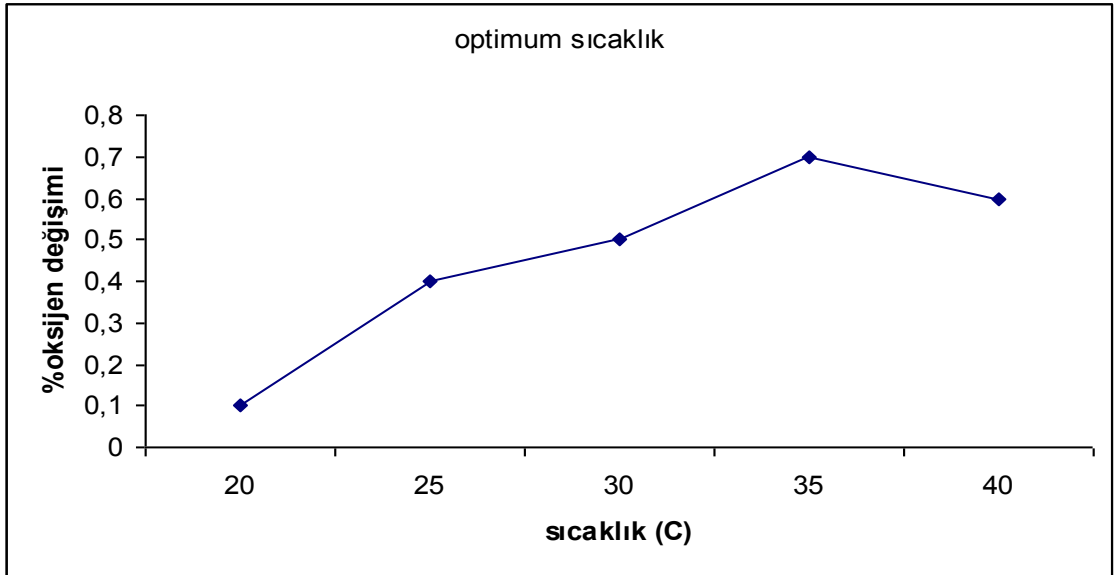
Geliştirilen biyosensör ile yapılan optimum pH denemesinde biyosensörün inhibitör tesbitine yönelik en büyük cevabı pH 7'de verdiği gözlenmiştir.

Enzimler protein yapısındandır ve proteinler aminoasitlerden oluşur. Amino asitler hem asidik, hem bazik karakterleri bir arada taşıyan amfoter yapılardır ve ortamın pH'sından çok kolay etkilenir. Dolayısıyla aminoasitlerin pH değerlerinin değişimi ile  $H^+$  alıp vermesi sonucunda enzim yapısı değişir. İnhibitör olarak kullanılan sisteinde bir aminoasittir ve enzime bağlanarak kompetitif etki göstermesi ortam pH'sına bağlıdır.

### 3.3.2. Optimum sıcaklık

Tirozinaz temelli biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyonuna dayalı çalışmalarda optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik denemeler gerçekleştirildi. Bu amaç doğrultusunda 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C 'lerde ölçüm yapılmıştır.

Belirlenen pH noktalarında öncelikle substrat ile ölçümler yapıldı ( $\Delta 1$ ). Ardından substrat + inhibitörle ölçümler yapıldı ( $\Delta 2$ ). Buna bağlı çizilen grafik aşağıdaki gibidir.



Şekil 3.6 Sıcaklık değerinin oksijen konsantrasyonu üzerinde etkisi

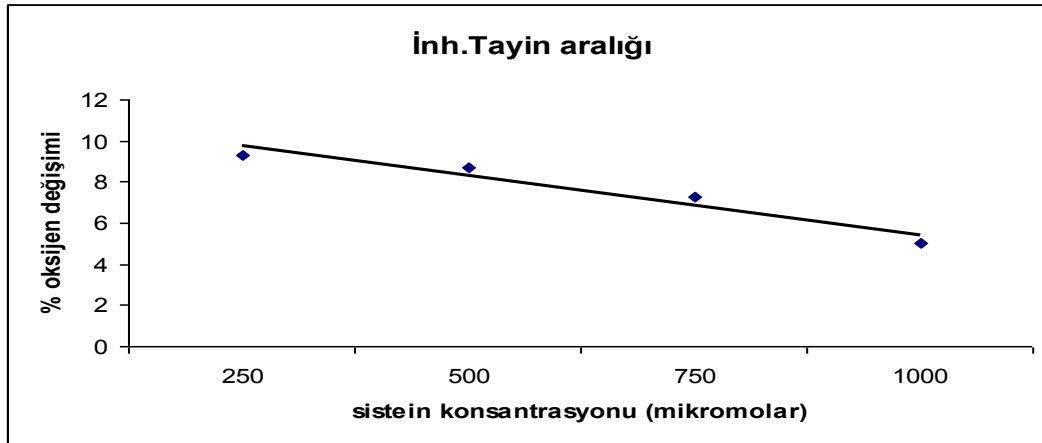
Protein yapısındaki enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri bir sıcaklık değeri vardır. Tirozinaz enzimi kompetitif inhibitörü olarak kullandığımız sisteinde

amino asit yapısındadır. Tirozinaz enziminin kompetitif inhibitörünün tayinine yönelik geliştirdiğimiz biyosensörün optimum çalışma sıcaklığı 35°C'dir.

### 3.4 Tirozinaz Enziminin Kompetitif İnhibitörlerin Tayinine Yönelik Biyosensörün Karakterizasyonuna Yönelik Bulgular

#### 3.4.1. Tirozinaz enzimin kompetitif inhibitörlerinin tayin aralığı

Tirozinaz inhibitörün gerçekleştirdiği reaksiyonun en uygun hangi inhibitör konsantrasyonu aralığında gerçekleştiğinin belirlenmesi için sabit substrat konsantrasyonunda yapılan bir dizi analiz sonucunda 250µm, 500µm, 750µm ve 1000µm aralığı uygun bulunmuştur.



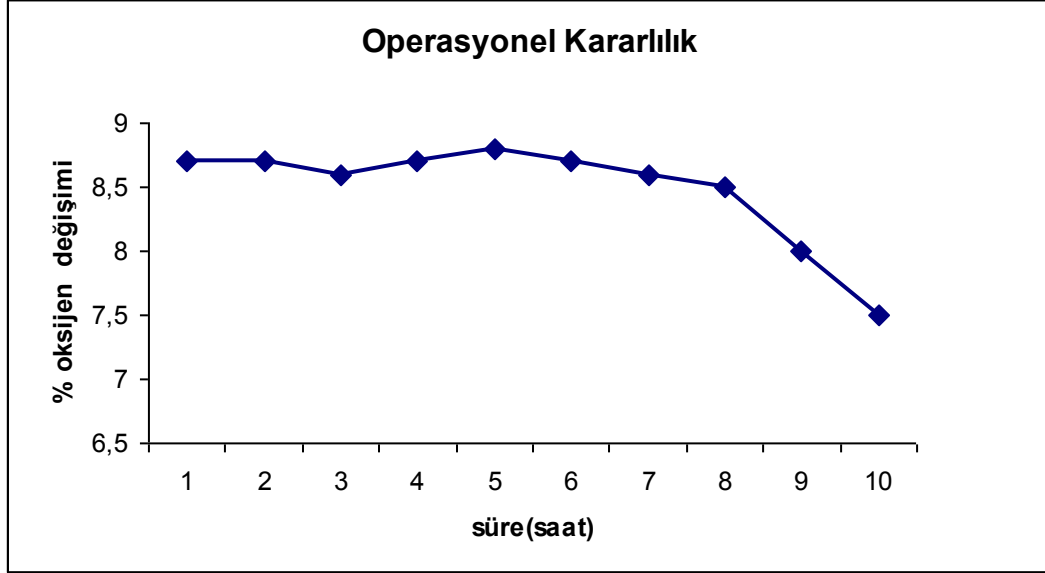
şekil 3.7 Tirozinaz inhibitörünün uygun konsantrasyon aralığı

#### 3.4.2. Operasyonel kararlılık

Biyosensörlerin operasyonel kararlılıklarının belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan biyosensör daha önce optimizasyonu yapılarak belirlenmiş olan çalışma sıcaklığında ve çalışma tamponu içinde bekletilerek bir saatlik periyotlar sonunda tirozinaz enzimi ile ölçümler yapıldı.



Bu çalışmalar süresince 500 $\mu$ m Phenol, 500 $\mu$ m Cys kullanıldı. Denemeler sonucunda elde edilen grafik aşağıdaki gibidir.



Sekil 3.8 Biyosensörün zamana bağlı operasyonel kararlılığı

Operasyonel kararlılık denemesinde ilk 9 saat boyunca bir farklılık gözlenmemiştir. 9. saatte enzim aktivitesindeki kayba bağlı olarak oksijen konsantrasyonunda azalma görülmüştür.

#### 4.SONUÇ

Bu çalışmada tirozinaz enzimi kullanılarak tasarlanan biyosensör, tirozinaz enziminin kompetitif inhibitörlerinin tayini amacıyla kullanılmıştır. Substrata ilave olarak ayrı ayrı sistein, glutatyon, sodyum metabisülfid ve tiyoüre ile yapılan ölçümler neticesinde bu maddelerin inhibitör etkisi gösterdiği bulunmuştur. Oksijen konsantrasyonunda farklanma prensibine dayanan ölçümlerde her birinin aynı konsantrasyon aralığında yapılan ölçümlerde oksijen konsantrasyonundaki değişim farklı gözlenmiştir. En iyi değişim sisteinle elde edildiğinden inhibitör olarak sistein kullanımına karar verildi. Öncelikle biyosensörün biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonu çalışılmış olup biyosensörün en iyi cevabı verdiği değerlerde enzim miktarı 53 U , jelatin miktarı 5mg , glutaraldehid çözeltisinin derişimi ise %2,5 olarak bulunmuştur. Çalışma koşulları için yapılan ölçümlerde ise en iyi sonuçlar çalışma ortamının p H 'sı 7 , sıcaklığı 35°C'de olduğunda alınmıştır. Tirozinaz enziminin kompetitif inhibitörlerinin tayin aralığını bulmaya yönelik yapılan çalışmada sabit substrat konsantrasyonu ile çalışıldı ve grafiğe dökülen veriler sonucunda en iyi inhibitör konsantrasyon değerleri 250µM, 500µM, 750µM, 1000µM olarak bulundu.

Sonuç olarak tasarlanan bu biyosensör ile tirozinaz enziminin inhibitörlerini tesbit etmek ve konsantrasyonunu tayin etmek mümkün olabilmektedir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aitken, M.D., Massey, I.J., Chen, T. , Heck, P.E., 1994, Characterization of reaction products from the enzyme catalysed oxidation of phenolic pollutants, *Wat.Res.*, 28(9) :1879 - 1889
- Akyılmaz, E., 2002, *Biosensor Development For Alcohol Analysis Ph.D in Biochemistry Supervisor: Prof.Dr.Erhan DİNÇKAYA May 2002, 198 pages*
- Asha, C., Pande, K.K., Malhotra, D.D., 2003, Application of polyaniline/sol-gel derived tetraethylorthosilicate films to an amperometric lactat biosensor, *The international journal of the Japon Society for analytical Chemistry ; 19 (11) : 1477-80*
- Asav E., Yorgancı E., Akyılmaz E., 2008, An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination, *Talanta*, 78(2009) 553-556
- Baoxin, L.;Zhujun, Z.; Yan, J., 2002, Plant tissue – based chemiluminescence flow biosensor for determination of unbound dopamine in rubbit blood with online microdialysis sampling.*Biosens.Bioelectron.*,17,585-589
- D’Orazio, P., 2003, *Biosensors in clinical chemistry.Clinica Chemica Acta*, 334, 41-69
- Dinçkaya, E.,1999, *Enzim sensörleri, biyosensörler*, 81-142
- Dinçkaya,E., Akyılmaz,E., Sezgintürk,M.K., 2003, A biosensor based on urate oxidase-peroxidase coupled enzyme system for uric acid determination in urine.
- Dinçkaya,E., and Telefoncu, A., 1993, enzyme electrode based on oxalate oxidase immobilized in gelatin for specific determination of oxalate, *indian Journal Of Biochemistry and Biophysics*,30:282-284

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

Evtugyn, G.A, Budnikov, H.C, Nikolskaya, 1998, Sensitivity and selectivity of electrochemical enzyme sensors for inhibitor determination, *Talanta*, 46, 465-484

Gülçin, İ., Küfrevioğlu, İ., Oktay, M., 2005, Purification and characterization of poluphenol oxidase from nettle (*Urtica dioica L.*) and inhibitory effects of some chemicals on enzyme activity , *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*,20:3,297-302

Habermüller, K., Masbach, M., Schuhmann, W., 2000, Elektron transfer mechanism in amperometric biosensor , *Faresenius Journal of Analytical Chemistry*, 366:560-568

Junhui, Z., Hong, C , Ruifi, Y., 1997, DNA based biosensors, *Biotechnology Advances*, 43-58

Karam, J., Nicel, J.A., 1997, Potential applications of enzymes in waste treatment, *J.Chem. Tech.Biotechnology*, 69:141-153

L.P.Hager, D.M.Geller and F.Lipman; *Fed.Proc.*,13, 734 (1954), B.Sedewitz, K.H.Schleifer and F.Gotz; *J.Bacteriol*,160, 273 (1984), B.Sedewitz, K.H.Schleifer and F.Gotz; *J.Bacteriol*,160, 462 (1984).

Martin Chaplin, 2004, Faculty Of Engineering, Science And The Built Enviroment

Macsini, M., Palchetti , I., Marrazoa G., 2001, DNA electrochemical biosensors 369(1) : 15-22

Michael W. King, Ph.D / IU School of Medicine / miking at iupui.edu

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

Odacı, D. , 2004, Pirogallol Tayinine Yönelik Doku Biyosensörü Hazırlanması Ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi , Fen Bilimleri Enstitüsü , 56 sayfa

Pharmacom Microelectronics Copyright 1997-2004

Sezgintürk, M. K, 2007,  $\beta$ -Galaktozidaz aktivitesinin belirlenmesinde biyosensör temelli ölçüm sistemlerinin geliştirilmesi, doktora tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 265 sayfa

Sharma, S., Sehgal, N., Kumar, A.,2003,Biomolecules for development of biosensors and their applications.

Sidwell, J., Rechnitz GA. , 1986, Progress and challenges for biosensors using plant tissue materials, 221-233

Telefoncu, A., 1999, Biyosensörler, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, İZMİR

Timur, S., 2001, Pestisit Tayinine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi Ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi , Fen Bilimleri Enstitüsü , 114 sayfa