

**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÜRİK ASİT TAYİNİ İÇİN  
YENİ BİR BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ**

**Esra AKYÜZ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Danışman  
Prof.Dr. Ayten SAĞIROĞLU  
EDİRNE-2011**



**T.C.**

**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÜRİK ASİT TAYİNİ İÇİN**

**YENİ BİR BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Hazırlayan

Esra AKYÜZ

Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU

**EDİRNE-2011**

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÜRİK ASİT TAYİNİ İÇİN  
YENİ BİR BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ**

Esra AKYÜZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez 09-03-2011 tarihinde aşağıdaki jüri üyelerine sunulmuş ve kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. İlhan Erdoğan

Doç. Dr. Hülya YAĞAR

Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU

(Danışman)

## ÖZET

Günümüzde ürik asit tayininde çeşitli kolorimetrik, polarografik, kromatografik, spektrofotometrik yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bunlar genel olarak özel ekipman ve uzman gerektiren zaman alıcı ve pahalı sistemlerdir.

Biyosensörler; enzim, hücre ve doku gibi biyolojik unsurların uygun bir iletim sistemiyle birleştirilmesi ile oluşan biyoanalitik cihazlardır. Biyosensörlerin diğer yöntemlere karşı en önemli avantajı, tayin edilecek maddeler için ekonomik, pratik ve spesifik ölçümlere imkan vermesidir.

Saf enzimleri içeren dokuların kullanılmasıyla hazırlanan doku temelli biyosensörler, saf enzimlerin immobilize edilmesiyle hazırlanan biyosensörlerle kıyasladıklarında oldukça ucuz, yüksek kararlılıklı ve yüksek aktiviteli tayin sistemlerini oluşturmaktadır.

Bu çalışmada, *Lactobacillus casei* probiyotik bakterisi doğal enzim kaynağı olarak kullanılarak ürik asit tayini için bakteriyal temelli bir biyosensör hazırlandı. *L. casei* bakterisinin liyofilize formu ile hazırlanan biyosensörün optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Çalışmalarda ana substrat olarak ürik asit kullanıldı. İlk önce biyosensörün biyoaktif tabaka bileşenlerini oluşturan bakteri miktarı, jelatin ve glutaraldehid miktarlarının biyosensör cevapları üzerine etkisi incelendi. Sırasıyla bakteri, 10 mg, jelatin ve glutaraldehid miktarları 10 mg ve % 0,5 olarak tayin edildi.

Biyosensörün karakterizasyon çalışmalarında, belirlenen optimum biyoaktif tabaka bileşen miktarları kullanılarak hazırlanan biyosensör ile ürik asit tayini için lineer konsantrasyon aralık sınırları 10 – 40 mM olarak belirlendi.

Deney koşullarının optimizasyonu için; hazırlanan biyosensörün, lineer cevapları üzerine tampon pH'ı, tampon konsantrasyonu ve sıcaklık değişimlerinin

etkileri incelendi. Kullanılan fosfat tamponu için biyosensörün optimum pH 8.0, tampon konsantrasyonu 150 mM ve optimum sıcaklığı 40 ° C olarak belirlendi.

Biyosensörün karakterizasyon testlerine geçildiğinde; ölçümlerin tekrarlanabilirliğinin belirlenmesinde; her defasında 10 mM ürik asit kullanılarak hazırlanan biyosensör ile optimum koşullarda arka arkaya 7 ölçüm alındı. Ölçümlerde  $X_{ort} = 10,022$  mM karşılık, standart sapma (S.D.)  $\pm 0,045$ , varyasyon katsayısı (C.V.) % 4,39 olarak belirlendi. Bu değerler hazırlanan biyosensörün, ürik asit tayini için kararlı ve uygun bir sistem olduğunu gösterdi.

Geliştirilen biyosensörün depo kararlılığı optimum koşullarda; 22 gün boyunca belirli aralıklarla alınan ölçümlerde ilk 10 gün, aktivite % 100 korundu. 18. günde biyosensörün başlangıç aktivitesinin % 80'sini koruduğu gözlemlendi. 19 günden sonra, biyosensör hızlı bir şekilde aktivitesini kaybettiği gözlemlendi.

Optimum koşulları belirlenen, karakterizasyon testleri yapılan bakteri esaslı ürik asit biyosensörü kullanılarak; hasta ve sağlıklı kişilerin kan ve idrar örneklerindeki ürik asit tayininde uygulanabilirliği incelendi. Yapılan ölçümlere ait standart sapma ve varyasyon katsayıları dikkate alındığında; analizi yapılan bütün örneklerde ürik asit tayini için uygulanabileceği görüldü.

**Anahtar kelimeler:** Biyosensör, ürik asit, *Lactobacillus casei*, probiyotik bakteri, ürikaz

## ABSTRACT

Nowadays, various colorimetric, polarographic, chromatographic, spectrophotometric methods are used for uric acid determination. However these are in general time consuming and expensive systems which require special equipment and expertise.

Biosensors are bio-analytical devices which combine such biological components as enzymes, cells and tissues in an appropriate transmission system. The most important advantage of biosensors against other methods is that it enables economic, practical and specific measurements for substances to be determined.

Being prepared by using tissues containing pure enzymes, the tissue based biosensors create considerably cheap determination systems with high stability and high activity compared to the biosensors prepared by immobilizing pure enzymes.

In this study, a bacteria-based biosensor has been used as the source of natural enzyme for uric acid determination using *L.casei* probiotic bacterium. Optimization and characterization studies of bacteria-based biosensor prepared with lyophilized form of *L.casei* bacterium have been performed. In the studies, uric acid was used as main substrate. Firstly the effect of quantities of bacteria, gelatin and glutaraldehyde which are the components of bioactive layer of the biosensor, on the biosensor responses has been investigated. The quantities have been determined as 10mg, 10mg and 0,5% respectively for bacteria, gelatin and glutaraldehyde.

In the characterization studies of the biosensor, the linear concentration range was established 10 – 40 mM for uric acid determination by the biosensor prepared using the determined bioactive layer component quantities.

For the optimization of test conditions, the effects of buffer pH, buffer concentration and temperature changes on the linear responses of the biosensor prepared have been studied and pH has been determined as 8.0, phosphate buffer concentration as 150mM and optimum temperature as 40°C as the optimum values.

In the durability tests of biosensor, seven consecutive measurements were taken in determining the repeatability of measurements by using proposed biosensor and each time using 10 mM uric acid. Upon measurements, the followings have been determined;  $X_{ort}=10,022$  mM, standard deviation (S.D.)  $\pm 0,045$ , coefficient of variation (C.V.) 4,39%. This result demonstrated that the biosensor prepared is a suitable and stable system for uric acid determination.

For determination of storage stability of the biosensor developed, measurements were taken at certain intervals during 22 days under optimum conditions. During the first 10 days, activity was maintained at 100%. Then it was observed that biosensor maintained 80% of its initial activity at the 18<sup>th</sup> day. After the 19<sup>th</sup> day, biosensor started to lose its activity quickly.

Using the bacteria biosensor whose optimum conditions were determined and durability tests were performed, its practicability in determining uric acid in the blood and urine specimens of sick and healthy persons has been studied. In consideration of the standard deviations and coefficients of variation pertaining to the measurements made using the biosensor developed; it has been observed that it could be applied in all specimens subject to uric acid analysis.

**Key words:** Biosensor, uric acid, Lactobacillus casei, probiotic bacteria, uricase.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin süresince, görüş ve tecrübelerini benimle paylaşan, her konuda ilgi ve desteğini gördüğüm değerli danışmanım **Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU**'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım .

Tez çalışmamın literatür araştırmalarında ve deneysel çalışmalarında benden bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen **Arş. Gör. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN** ve **Öğr. Gör. Hatice PALÜZAR**'a ve manevi desteğini esirgemeyen tüm yüksek lisans arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimin boyunca her zaman ilgiyle ve sabırla beni destekleyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Esra AKYÜZ



## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
<b>ÖZET</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>III</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>V</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>VI</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>X</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b>XI</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b>	<b>XII</b>
<b>1.GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Nükleik Asitler Yapıları ve Görevleri.....</b>	<b>4</b>
2.1.1. Nükleozidler ve Nükleotidler.....	6
2.1.2. Purin ve Primidin Bazları.....	8
2.1.2.1. Pirimidinler.....	8
2.1.2.2. Purinler.....	9
2.1.3. Nükleik Asitlerin Metabolizması.....	11
2.1.3.1. Nükleik asit ve Nükleotidlerin Sindirim ve Emilimi.....	11
2.1.3.2. Purinlerin yıkımı.....	11
<b>2.2. Ürik Asit.....</b>	<b>13</b>
2.2.1. Ürik Asit Metabolizması.....	15
2.2.2. Ürik Asidin Organizmaya Etkileri.....	17
2.2.3. Pürin Metabolizması Bozuklukları.....	18

2.2.4. Ürik Asidin Tayin Yöntemleri.....	20
2.2.5. Ürikaz Enzimi (Ürat Oksitaz, E.C.1.7.3.3).....	26
<b>2.3. Biyosensör Temelli Yöntemler.....</b>	<b>26</b>
2.3.1. Biyosensörlere Genel Bakış.....	26
2.3.2. Biyosensörler ve Bileşenleri.....	27
2.3.3. Biyoajanlar (Biyoaktif Tabaka).....	28
2.3.4. Sinyal İleticiler (Transduserler).....	30
2.3.5. Biyoaktif Tabakanın Elektrot Yüzeyine İmmobilizasyonu.....	32
2.3.6. Enzim Biyosensörleri.....	33
2.3.7. Doku Biyosensörleri.....	34
2.3.8. Mikrobiyal biyosensörler.....	35
<b>2.4. Probiyotik Bakteriler.....</b>	<b>37</b>
2.4.1. Probiyotik bakterilerin özellikleri.....	38
2.4.2. Probiyotik bakterilerin enzim aktiviteleri.....	40
2.4.3. Probiyotik bakterilerin fiziksel özellikleri.....	41
2.4.4. Liyofilize formdaki probiyotik bakterilerin saklama koşulları.....	42
<b>2.5. Tezde Kullanılan Biyomateryallere Genel Bakış.....</b>	<b>42</b>
2.5.1. Lactobacillus casei bakterisi.....	42
2.5.2. Jelatin.....	44
2.5.3. Glutaraldehid.....	45
<b>3. MATERYAL VE METOT.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1. Materyaller.....</b>	<b>46</b>
3.1.1. Kimyasallar.....	46
3.1.2. Cihazlar.....	46
<b>3.2. Metodlar.....</b>	<b>47</b>
3.2.1. Çözünmüş oksijen probunun çalışma ilkesi.....	47
3.2.2. Bakterinin ( <i>lactobaillus casei</i> ) biyosensör için hazırlanması.....	48
3.2.3. Biyoaktif tabaka materyalinin hazırlanması.....	48
3.2.4. Hazırlanan mikrobiyal esaslı biyosensör ile ölçüm ilkesi.....	49
3.2.5. Biyosensör için uygun bakteri formunun seçilmesi.....	50
3.2.5.1. <i>Lactobacilluslar</i> için besi ortamının hazırlanması.....	51

3.2.5.2. Bakterilerin besi ortamından izolasyonu.....	51
3.2.5.3. Uygun bakteri formunun seçilmesi.....	52
3.2.6. Biyosensörün biyoaktif tabaka materyallerinin optimizasyonu.....	52
3.2.6.1. Bakteri miktarının biyosensör cevabına etkisi.....	53
3.2.6.2. Jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi.....	53
3.2.6.3. Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi.....	53
3.2.7. Biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyonu.....	54
3.2.7.1. pH optimizasyonu.....	54
3.2.7.2. Uygun tampon konsantrasyonu.....	54
3.2.7.3. Optimum sıcaklık.....	55
3.2.8. Biyosensörün karakterizasyon çalışmaları.....	55
3.2.8.1. Doğrusal ölçüm aralığının belirlenmesi.....	55
3.2.8.2. Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği.....	55
3.2.8.3. Operasyonel kararlılığı.....	56
3.2.8.4. Depo kararlılığı.....	56
3.2.9. Geliştirilen biyosensör ile ürik asidin tayin edilebilirliği.....	56
3.2.9.1. Biyosensörün substrat spesifitesinin tayini.....	56
3.2.9.2. İdrar ve kan örneklerinde ürik asit tayini .....	57
<b>4. ARASTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>58</b>
<b>4.1. Biyosensörün Biyoaktif Tabaka Materyallerinin Optimizasyonuna İlişkin Bulgular.....</b>	<b>58</b>
4.1.1. Bakteri formunun seçimi.....	58
4.1.2. Bakteri miktarının biyosensör cevabına etkisi.....	58
4.1.3. Jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi.....	59
4.1.4. Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi.....	60
<b>4.2. Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonuna İlişkin Bulgular.....</b>	<b>61</b>
4.2.1. Optimum pH.....	61
4.2.2. Optimum tampon konsantrasyonu.....	63
4.2.3. Optimum sıcaklık.....	64
<b>4.3. Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular.....</b>	<b>65</b>
4.3.1. Ürik asit için doğrusal ölçüm aralığı.....	65

4.3.2. Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği.....	66
4.3.3. Operasyonel kararlılık.....	66
4.3.4. Depo kararlılığı.....	67
<b>4.4. Biyosensörün substrat spesifitesi .....</b>	<b>69</b>
<b>4.5. Çeşitli Örneklerde Ürik Asit Tayini .....</b>	<b>70</b>
<b>5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>73</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>78</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>84</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1 DNA ve RNA yapıları.....	5
Şekil 2.2. Uridin ve dezoksi adenozin nükleozid formülleri.....	7
Şekil 2.3. Pirimidinler bazları ve urasilin keto-enol tautomerisi.....	9
Şekil 2.4. Önemli Pürin bazları.....	9
Şekil 2.5. Doğada bulunan bazı purin yapıları.....	10
Şekil 2.6. Pürinlerin yıkımı.....	12
Şekil 2.7. Ürik asidin yapısı.....	13
Şekil 2.8. Ürik asidin ileri oksidasyon ürünleri.....	16
Şekil 2.9. Gut hastalığının klinik görünümü.....	19
Şekil 2.10. Lesch- Nyhan sendromunun klinik görünümü.....	19
Şekil 2.11. Biyosensörün genel şematik gösterimi.....	27
Şekil 2.12. Biyoajan olarak kullanılan enzim kaynakları.....	29
Şekil 2.13. Sinyal iletilicilerde gerçekleşen değişimler ve ölçüm cihazları.....	30
Şekil 2.14. Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi.....	31
Şekil 2.15. Biyosensör biyoaktif tabakalarında biyoajanların immobilizasyon teknikleri.....	33
Şekil 2.16. Bitki dokuları (A) dokusu kesiti (B).....	35
Şekil 2.17. Bazı probiyotik bakterilerin mikroskopik görüntüleri.....	41
Şekil 2.18. Glutaraldehit'in yapısı.....	45
Şekil 3.1. Tezde kullanılan çözünmüş oksijen (DO) esaslı biyosensör düzeneği..	49
Şekil 4.1. Biyosensör cevabı üzerine bakteri miktarının etkisi.....	59
Şekil 4.2. Biyosensör cevabı üzerine jelatin miktarının etkisi.....	60

Şekil 4.3. Biyosensör cevabı üzerine glutaraldehit yüzdesinin etkisi.....	61
Şekil 4.4. Biyosensör cevabı üzerine pH'ın etkisi.....	62
Şekil 4.5. Biyosensör cevabı üzerine tampon konsantrasyonunun etkisi.....	63
Şekil 4.6. Biyosensör cevabı üzerine sıcaklığın etkisi.....	64
Şekil 4.7. Ürik asit standart grafiği.....	65
Şekil 4.8. Operasyonel kararlılık.....	67
Şekil 4.9. Depo kararlılığı.....	68
Şekil 4.10. Ürik asit biyosensörü için farklı substrat denemeleri.....	69
Şekil 4.11. İdrardaki çözünmüş oksijen grafiği.....	70
Şekil 4.12. Kandaki çözünmüş oksijen grafiği.....	71

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
Tablo 2.1. DNA ve RNA yapısındaki heterobazlar, nükleozidler ve nükleotidler.....	7
Tablo 2.2. Biyoaffinite ve Biyokatalitik ajanlar ve bunlarla tayin edilebilen analitler.....	29
Tablo 2.3. Probiyotik olarak kullanılan bakteriler ve mayalar.....	39
Tablo 4.1. Standart ürik asit tayini için alınan ölçüm sonuçları.....	66
Tablo 4.2 : Çeşitli örneklerde ürik asit tayini.....	72

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

Ag

Ag/AgCl

Pt

O<sub>2</sub>

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### Acıklama

Gümüş

Gümüş kolrür

Platin

Oksijen

Hidrojen peroksit

### Kisaltmalar

HPLC

Kromotografisi

GC

UV

DNA

E.C.

<sup>0</sup>C

[S]

### Acıklama

Yüksek Performans Sıvı

Gaz Kromotografisi

Ultraviyole

Deoksiribonükleik asit

Enzim Kodu

Santigrad derece

Substrat konsantrasyonu



M	Molar
mM	Milimolar
cm <sup>2</sup>	Santimetrekaire
cm <sup>3</sup>	Santimetrekyüp
g	Gram
mg	Miligram
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
dk	Dakika
DO	Çözünmüs Oksijen
S.D.	Standart sapma
C.V.	Varyasyon katsayısı

## 1. GİRİŞ

Son 1970' li yıllardan beri biyosensörler, biyolojik ve kimyasal analizlerin hemen her alanında çok büyük ilgi görmektedir. Ürik asit tayini için bazı biyosensör geliştirme raporları yayınlanmıştır (E. Miland, vd., 1996; A. S. Kuwabata, T. vd., 1998; Y.-Q. Zhang, vd. 1998; H. Frebel, vd., 1997; S. Uchiyama and H. Sakamoto., 1997; Dobay, G. vd., 1999; M. Shaolin., 1997, Hunor Sántha., 2003).

Biyosensörler, çoğunlukla immobilize enzimlerin spesifik enzimatik reaksiyonuna dayalıdır, ancak ürik asit tayininde bu esastan farklı yayınlarda bulunmaktadır (J.M. Zen vd., 2002). Saf ürikaz enzimi veya bir bakteri ya da dokunun içerdiği ürikaz enziminin, ürik asit substratını tamponlu ortamda çözülmüş  $O_2$  varlığında oksidatif katalizlediği zaman reaksiyon ürünleri olarak allantoin,  $H_2O_2$  ve  $CO_2$  çıkar. Bu reaksiyon, oksijen elektroduna immobilize edilen ürikaz kaynağı kullanılarak hazırlanan oksijen biyosensörü ile tüketilen  $O_2$  ölçülerek yapılabilir. Ancak genel olarak biyosensörlerde oksidaz enzim aktiviteleri kullanıldığı durumlarda yaygın olarak amperometrik ölçüm metodu tercih edilmektedir. Ürik asit özelinde uygulanan anodik oksidasyon yoluyla üretilen akım ölçülür ve bu akım miktarındaki değişim, yükseltgenen ürik asit miktarı ile orantılıdır. İdrarda ürik asit tayini için yeni bir amperometrik biyosensör de; urat oksidaz-peroksidaz ikili enzim sistemine dayalı olarak geliştirilmiştir. Metot, birlikte elektroda immobilize edilen enzimlerden urat oksidazın çözülmüş oksijeni kullanarak ürik asitin yükseltgenmesi ve bu arada oluşan yan ürün olan hidrojen peroksidin, peroksidaz tarafından parçalanması esasına dayanır. (Akyılmaz E vd., 2003).

Biyosensörlerde, saf enzim yerine çeşitli dokular ve mikroorganizmalarda enzim kaynağı biyobileşen olarak kullanılmaya başlamıştır. Bunlardan bakteriyal kaynaklar içerdikleri doğal ürünlerle birlikte bu ürünlerin canlı sistemde dönüşüm reaksiyonlarını

katalizleyen enzimleri de bulundurlar. Mikroorganizmaların enzim aktiviteleri genel olarak, etkilediği substratın canlıdaki veya canlının yaşadığı ortamdaki miktarıyla orantılıdır. Bakteriyal kaynakla hazırlanmış biyosensörler canlı sistemin spesifikliğinin elektronik sinyale dönüşümü yoluyla duyarlı ve kısa sürede sonuç verebilmektedir. Kolay hazırlanır, ucuzdur, tekrar kullanılabilir. Bu bakımdan enzim kaynağı olarak kullanılabilir, aktivitesi, işlem kararlılığı yüksek olan yeni mikroorganizmaların araştırılması ve uygun olanların biyosensörlerde kullanılabilirliğinin belirlenmesi önemlidir. Biyosensör geliştirilmesinde mikroorganizmaların kullanıldığı çok sayıda çalışma vardır (Telefoncu, 1999; Rotariu vd., 2004; Tkac vd., 2002; Srisawasdi vd., 2006. Timur vd. 2003).

Ancak bu alanda biyosensörle ürik asit tayin çalışmaları daha kullanışlı, hassas biyosensörü bulmak amacıyla devam etmektedir. Henüz pratik kullanıma geçen bulunmamaktadır. Bu tez çalışmaları kapsamında enzim kaynağı olarak kullanılan probiyotik bakteri (*Lactobacillus casei*) ürik asit tayininde beklentilerin üzerinde bir performans göstermiştir. Bu sebeple bu alandaki araştırmalar içinde dikkate değer bir biyosensör olacağını düşündürmektedir.

Kanda, idrarda ve diğer vücut sıvılarında yapılacak madde tayinlerinde kullanılacak biyosensördeki immobilize biyobileşenin vücudun yabancı olmayan probiyotik bakteriler olması, ekonomik olarak temini, kolay hazırlanması, ek işlemlere gerek olmaması, spesifikliği önemli avantajlar sağlar. Bu çalışmada biyobileşen olarak kullanılan liyofilize *Lactobacillus casei* probiyotik bakterisi, sözü edilen avantajların tümünü sağlamaktadır.

Canlı hücrelerinin yapısında genetik materyal olarak bulunan nükleik asitler ömrünü doldurduğunda yıkıma tabi tutulur. Bu moleküllerinin insanda yıkımı sonucu serbest kalan temel iki pürin bazı ( adenin ve guanin) metabolizmada daha da yıkılarak son ürün ürik asidi oluştururlar. Sağlıklı insan kan plazmasında ürik asit miktarı ortalama 3-7 mg/100 mL (178-416 mol/L) aralığında değişir. Sağlıklı insanda çeşitli sebeplerle bu değerlerin üstünde ürik asit kana geçerse fazlası idrarla atılır.

Ürik asitin kandaki artışı; beslenme alışkanlığına, metabolizma bozukluğuna ve böbrek harabiyeti ve yetmezlikleriyle meydana gelebilir. Beslenmede, sakatat, etler, sardunya, hindi, somon balığı, ıspanak, kuşkonmaz, fındık, fıstık gibi pürinlerce zengin besinler aşırı tüketildiğinde, fazla alkol kullanımında kanda ve idrarda ürik asit artar. Karaciğer hastalıkları ve genetik yapı sebepleriyle de pürin metabolizması bozulabilir. Ürik asidin böbreklerden atılmasını etkileyen alışkanlıklarla ya da böbrek yetmezlikleri de ürik asit miktarını yükseltir. Dolayısıyla kanda artan ürik asidin idrara geçişi böbrek problemleri dolayısıyla azalırsa da ürik asit artar.

Ürik asit gerektiği kadar atılmadığında eklemlerde urat kristalleri halinde birikerek, çok ağrılı gut (damla, nigris hastalığı) nöbetlerinin ortaya çıkmasında rol oynar. Ayrıca, travma, cerrahi ve bazı ilaçlar da bu hastalığın ortaya çıkışını kolaylaştırabilir. Gut nöbetleri, sık olursa eklemlerdeki yapı bozulur, böbreklerde taş oluşturabilir. Bu nedenle vücudumuzdaki ürik asit miktarının tayini büyük önem kazanmıştır.

Biyolojik sıvılarda ürik asidin miktarı bazı hastalıkların teşhisinde önem taşımaktadır. Gut hastalığı, böbrek hastalığı, Lesch-Nyhan sendromu ve organik asidemi gibi hastalıklarda biyolojik sıvılardaki ürik asit artar. Bunun sonucu olarak hiperürisemi, böbrek hastalıkları, hipertansiyon ve kalp damar hastalıkları ile bağlantılı olduğu bazı makalelerde belirtilmektedir (Akyılmaz E., 2004).

Günümüzde ürik asit tayinine yönelik olarak kolorimetrik, polarografik, kromotografik, spektrofotometrik yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bunlar pahalı kimyasallar ve cihazlara gereksinimi olan, uzman gerektiren ve zaman alıcı yöntemlerdir. Son yıllarda bu tür bileşiklerin analizi için pratik ve çabuk sonuç veren biyosensörük metodlara ilgi giderek artmaktadır. Özellikle saf enzim biyosensörlerinin yerine uygun enzimleri içeren doku ya da bakteriyal biyosensörlerinin tercih edilmesi pratik ve ekonomik olması bakımından avantajlı görülmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında; önce kolay temin edilen *Lactobacillus casei* probiyotik bakterisi ile ürik asit tayinine yönelik, hazırlanması kolay, ucuz, pratik, güvenilir ve hassas bakteriyal esaslı biyosensörün hazırlandı. Sonra hazırlanan biyosensörün hazırlama ve çalışma koşullarının optimizasyonu ve karakterizasyon çalışmaları yapıldı ve son olarak geliştirilen biyosensörün kan ve idrar örneklerinde ürik asit tayini için uygulanabilirliği gösterildi.

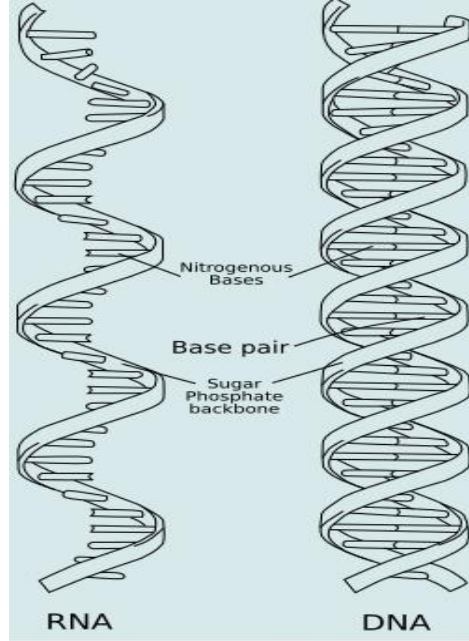
## **2. KURAMSAL TEMELLER**

### **2.1. Nükleik Asitlerin Yapıları ve Görevleri**

Canlılarda iki temel polinükleotid (Nükleik asit) vardır. Bunlardan biri Dezoksi ribonükleik asit (DNA) diğeri ribonükleik asittir (RNA). Hayatın ve canlılığın sırrı DNA yapısında yer alan dört bazın milyonlarca değişik dizilişinde ve her dizilişin belirli bir hayatsal anlam ifade edilmesinde gizlidir. Nükleik asitler yalnız kalıtsal bilgiyi taşıyan makromoleküller olmakla kalmayıp bu bilgiyi protein sentezine aktarmaktan da sorumludurlar. Bir polipeptidin sentezinden sorumlu DNA parçasına ‘Gen’ adı verilmektedir. Deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA), genetik bilgilerin korunması ve taşınması görevini üstlenen nükleotidlerin oluşturduğu polimer zincir şeklindeki makromoleküllerdir. Bütün hücrelerin kuru ağırlığının % 5-15’ini oluştururlar. Nükleik asit adı ilk defa DNA’nın hücre çekirdeğinden izole edilmesinden kaynaklanmaktadır (Kalaycıoğlu vd, 2000).

DNA molekülleri; iki polinükleotid zincirinin düzgün helezonik sarmal oluşumu halinde hücre çekirdeğinde bulunurlar. RNA molekülleri ise genellikle tek polinükleotid zinciri halinde düzgün olmaya katlanmalarla fonksiyonel

şeklini alır. RNA yapısı, bulunduğu canlı cinsine, ortam koşullarına ve fonksiyonuna bağlı olarak değişebilir. Şekil 2.1’ de DNA ve RNA yapıları verilmiştir.



**Şekil 2.1** DNA ve RNA yapıları

Nükleik asit molekülleri birbirini tamamlayan üç yapı gösterirler.

**Birincil yapı:** Mononükleotid yapısı ile bunları polinükleotidler veya nükleik asitler halinde bağlayan kovalent bağlardan oluşur. Temel polinükleotid zincirini meydana getirir.

**İkincil yapı:** Polinükleotid zincirlerinin uzaydaki spesifik, sterik bir konformasyon ikincil yapıyı meydana getirir. DNA ve RNA'nın özel konformasyonunun önemli kısmı bu yapının oluşumu sırasında meydana gelir.

**Üçüncül yapı:** Polinükleotid zincirlerinin, DNA da olduğu gibi, moleküller arası bağlanmaları sonucunda yapı tamamlanır ve fonksiyon

kazanır ( Sağıroğlu A, 2003).

### **Nükleik asitlerin denaturasyonu**

Nükleik asitlerde proteinler gibi aşırı pH, düşük iyon kuvvetinde üre, triklorasetik asit gibi ayıraçlarla ve ısı ile kolayca denatüre olurlar. Isı ile denaturasyonda hidrojen bağları ve hidrofob çekmeler bozulduğundan ikincil, üçüncül yapılarda bozular. Bu değişiklikler nükleik asitlerin ultraviyoledeki adsorbsiyonlarının artmasından anlaşılır.

#### **2.1.1. Nükleozidler ve Nükleotidler**

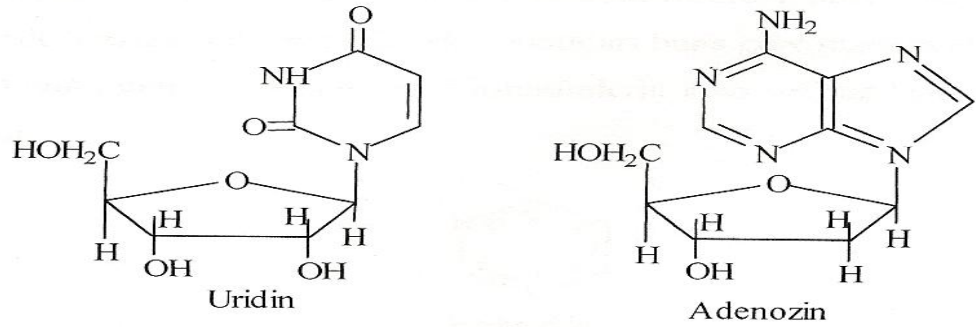
Kalıtsal özelliklerin sonraki kuşaklara aktarıldığı fikri ilk defa 1865 yılında MENDEL tarafından ileri sürülmüştür. Hayatın ve canlılığın sırrı DNA yapısında yer alan dört bazın milyonlarca değişik dizilişinde ve her dizilişin belirli bir hayatsal anlam ifade edilmesinde gizlidir. Nükleik asitler yalnız kalıtsal bilgiyi taşıyan makromoleküller olmakla kalmayıp bu bilgiyi protein sentezine aktarmaktan da sorumludurlar. Bir polipeptidin sentezinden sorumlu DNA parçasına 'Gen' adı verilmektedir. Deoksiribonükleik asit(DNA) ve ribonükleik asit(RNA), genetik bilgilerin korunması ve taşınması görevini üstlenen zincir şeklindeki makromoleküllerdir. Bütün hücrelerin kuru ağırlığının %5-15'ini oluştururlar.

Bir purin veya pirimidin bazının riboz veya deoksiriboz şekerinin 1. Karbonuna bağlanması ile nükleozidler (Baz-şeker) meydana gelmektedir. Şeker cinsine göre iki sınıf nükleozid bulunmaktadır. Bazların riboz şekerine bağlanması ile **ribonükleozidler**, deoksiriboz şekerine bağlanması ile ise

**deoksiribonükleozidler** ortaya çıkmaktadır. Purin ve pirimidin bazları gibi nükleozidler de hücre içerisinde üretilmektedirler ( Keba E.E., vd, 2004 ).

**Nükleotidler** (baz-şeker-fosfat) ise; nükleozidlerin içerdiği ribozun 5. Karbonuna fosfat asidinin enzimatik fosforilasyonu sonunda ester bağıyla bağlanmasıyla meydana gelirler. Nükleotidlerin hepsi vücutta biyosentezlenirler yani endojendirler. Nükleotidlerden DNA ve RNA kendi biyosentez mekanizmalarına göre önce nükleotidlerin tri fosfatlanmasından sonra DNA polimeraz enzimi katalizörlüğünde DNA ve DNA'ya bağımlı polimeraz enzimi katalizörlüğünde de RNA sentezlenir.

**Nükleozidler** nükleotidlerin fosfat grubunun enzimatik olarak hidrolizi ile meydana gelirler. Nükleozidler suda bulduklarını bazlardan daha fazla çözünmektedirler, bunun sebebi bağılı ribozların polaritelerini arttırmasıdır. Her iki tip nükleozidlerde dokulardaki spesifik **nükleozidaz**'larla hidrolize edilerek serbest şeker ve baz ayrılmaktadır. Şekil 2.2' de iki nükleozid verilmiştir. Tablo 2.1'de DNA ve RNA yapısında yer alan önemli bazlar, nükleozidler ve nükleotidler verilmiştir.



**Şekil 2.2.** Uridin ve dezoksi adenozin nükleozid formülleri

**Tablo 2.1.** DNA ve RNA yapısındaki heterobazlar, nükleozidler ve nükleotidler

Hetero halka türü	Bazlar	Nükleozidler (baz+şeker)	Nükleotidler (baz+şeker+fosfat)
Primidin	Sitozin	Sitidin	Sitidilik Asit



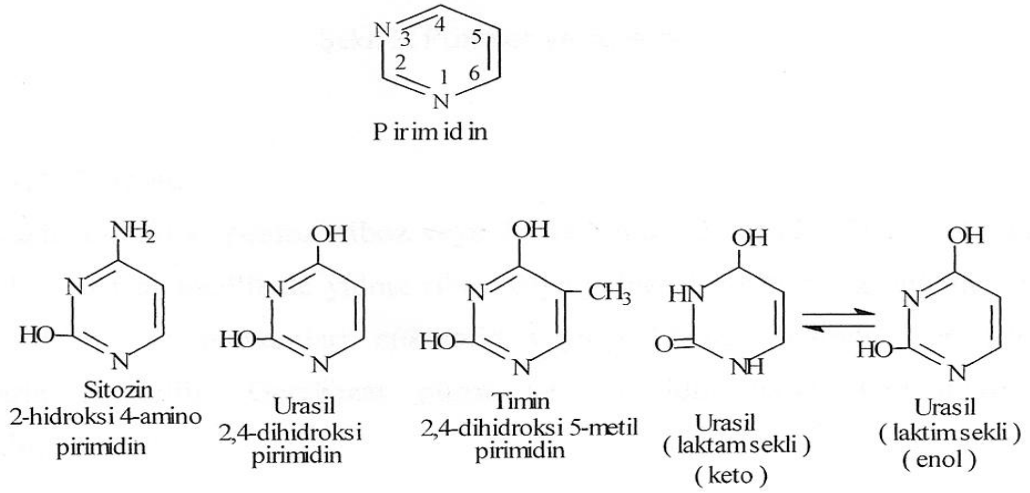
	Urasil Timin	Uridin Timidin	Uradilik Asit Timidilik Asit
Purin	Adenin Guanin Hipoksantin Ksantin	Adenozin Guanozin İnozin Ksantozin	Adenilik Asit Guanilik Asit İnozinik Asit Ksantilik Asit

### 2.1.2. Purin ve Primidin Bazları

Tablo 2.1' den görüldüğü gibi nükleik asitlerin yapısında yer alan bazlar başlıca iki gruba ayrılmaktadır. Bunlar pirimidin bazları ve Pürin bazlarıdır.

#### 2.1.2.1. Pirimidinler

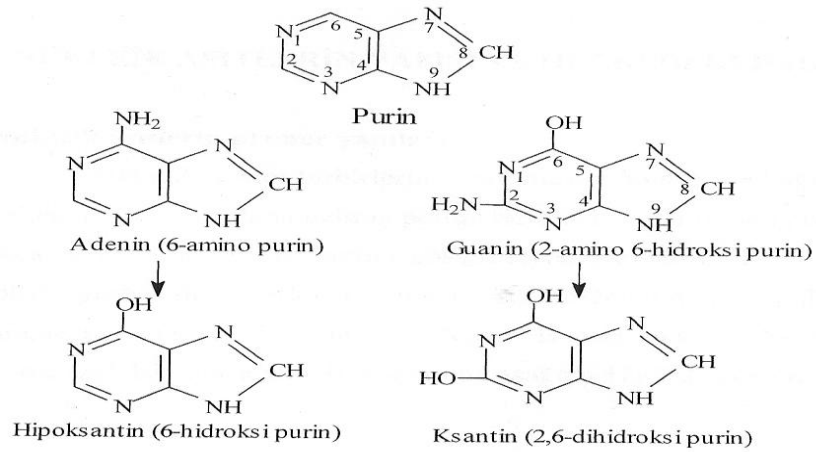
Pirimidinler, yapılarında iki azot bulunan ve tek altı üyeli hetero halkaya sahip bazlardır. Pirimidin halkasının numaralandırma sisteminde, pirimidin formülündeki 3 numaralı N atomu 1 ve 1 ile gösterilende 3 numara ile gösterilerek C atomları buna göre numara alırlar. Bütün primidinler keto-enol tautomerisi gösterirler. Pirimidinlerin keto şekline **Laktim** enol şekline **laktam** şekli denir. Şekil 2.3' de pirimidin bazları gösterilmiştir.



**Şekil 2.3.** Pirimidinler bazları ve urasilin keto-enol tautomerisi

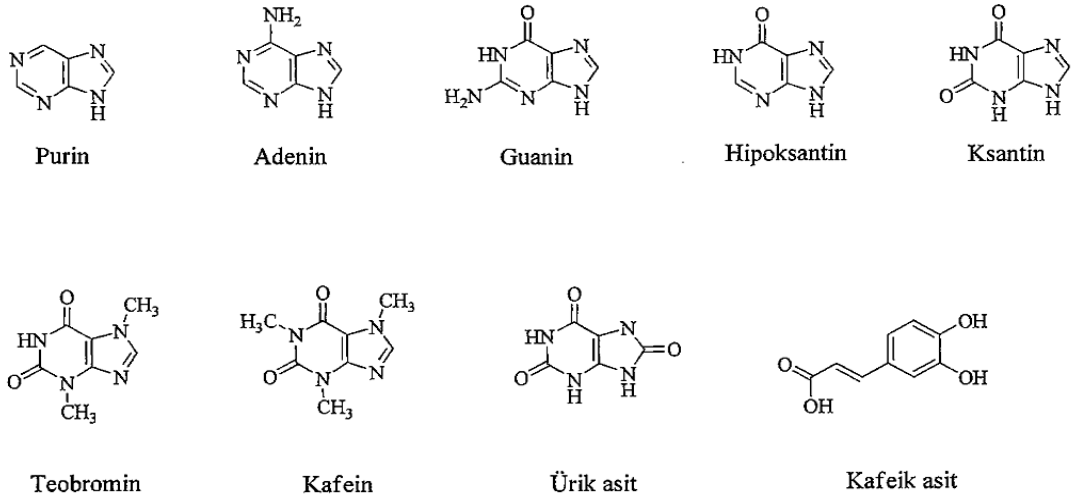
### 2.1.2.2. Purinler

Nükleik asitlerin yapısını oluşturan iki grup organik bazın purin bazları diğeri pirimidin bazlarıdır. Purin halka yapısı ise pirimidinlerdeki temel halka sistemine, beşli bir imidazol halkasının bağlanmasıyla meydana gelmiştir. Adenin ve guanin polinükleotid yapılarında yer alırken, ksantin ve hipoksantin ara metabolizmada bulunurlar. Purin metabolizmasında görülen bütün purin halka yapıları Şekil 2.4’ de verilmiştir.



**Şekil 2.4.** Önemli Purin bazları

Nükleik asitlerin yapısında başlıca 2 purin bazı bulunmaktadır ve bunlar **adenin** ve **guanin**'dir. Purinlerin yıkım metabolizması sırasında, son üründen bir basamak önce ara ürün olarak, adeninden **hipoksantin**, guaninden **ksantin** oluşur. Bu iki ara ürün de sonraki adımlarda, **ürük asit** son ürüne dönüşürler. İnsanlarda, purin metabolizmasının son yıkım ürünü idrarda çıkan **ürük asittir**. Doğal olarak canlılarda meydana gelen bu purin bazları daha çok genetik materyaller olan DNA ve RNA yapısında ve serbest nükleotidler (GMP, AMP, ADP ve ATP gibi) halinde bütün canlılarda bulunurlar. Serbest nükleotidler, enerji bileşiği, koenzim ve aktivatör olarak fonksiyon gösterirler. Purin bazları genellikle renksiz, kristal yapıları bileşiklerdir. Suda yavaş çözünürler, alkali veya zayıf asitli çözeltilerde daha çabuk çözünürler. Doğada bulunan bazı purin yapıları Şekil 2.5' de gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Doğada bulunan bazı purin yapıları

### 2.1.3. Nükleik asitlerin metabolizması

#### 2.1.3.1. Nükleik asit ve Nükleotidlerin Sindirim ve Emilimi

Besinlerde nükleik asitlerin yapı taşları olarak nükleotidler bulunur. Hücre içeren besinlerle nükleik asitler alınır. Nükleik asitler, mide enzimlerinden etkilenirler ve duodenumda pankreas **nükleaz**larının etkisiyle parçalanırlar. **Pankreas ribonükleaz**, RNA'yı, pirimidin mononükleotidleri ve pirimidin 31-fosfat kalıntısı ile son bulan oligonükleotidleri serbestleştirmek suretiyle hidroliz eder. **Deoksiribonükleaz**,  $Mg^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$  iyonları varlığında etki gösterir ve spesifik olarak DNA'yı oligonükleotidlere hidroliz eder. İnce bağırsak mukozasında oluşan **diesteraz**ların oligonükleotidleri mononükleotidlere parçalanırlar. Bağırsak boşluğunda bulunan nükleotidazlar (fosforik monoester hidrolaz) mono nükleotidlerin pentoz-fosfat bağıını nükleozid ve inorganik fosfat vermek üzere hidrolizlerler. Serbest nükleozidler emilir. Sindirim bağırsak mukozası enzimlerinden nükleozidazlar tarafından inorganik fosfat varlığında serbest purin ve pirimidin ile pentoz fosfat vermek üzere parçalanırlar. Nükleozidlerin bir kısmı kana karışır.

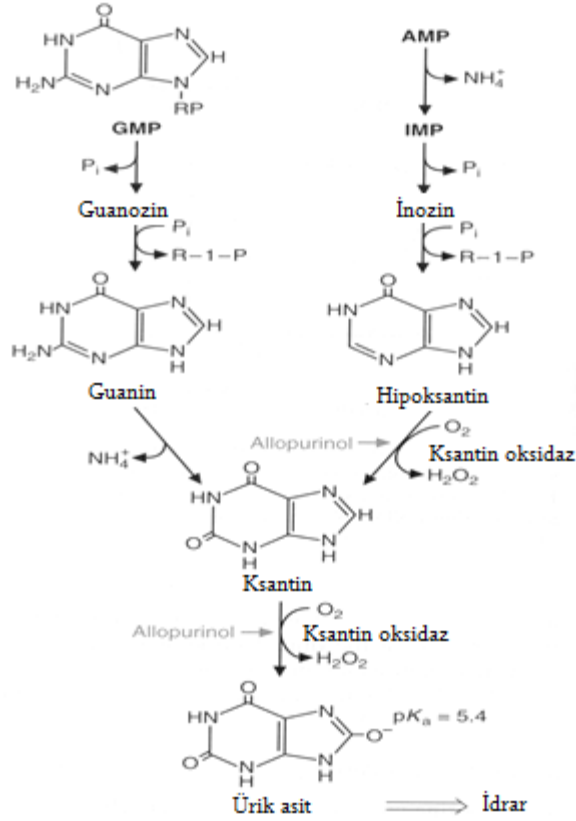
#### 2.1.3.2. Purinlerin yıkımı

Nükleik asitlerin yapısında başlıca 2 purin bazı bulunmaktadır ve bunlar **adenin** ve **guanin**'dir. Purinlerin(adenin ve guanin) yıkım metabolizması sırasında, son üründen bir basamak önce ara ürün olarak, adeninden **hipoksantin**, guaninden **ksantin** oluşur. Bu iki ara ürün de sonraki adımlarda, **ürik asit** son ürününe dönüşürler. İnsanlarda, purin metabolizmasının son yıkım ürünü idrarda çıkan ürik asittir. Doğal olarak canlılarda meydana gelen bu purin bazları daha çok genetik materyaller olan DNA ve RNA yapısında serbest nükleotidler( GMP, AMP, ADP ve ATP gibi) halinde

bütün canlılarda bulunurlar. Serbest nükleotidler, enerji bileşiği, koenzim ve aktivatör olarak fonksiyon gösterirler.

Ürik asit pürin metabolizmasının bir ürünü olarak adenozin ve guaninin yıkılması ile oluşur. Ksantin oksidaz enziminin aktivitesi ile hipoksantin ve ksantin ürik aside dönüştürülür. Bu enzimin aktivitesi özellikle karaciğerde ve ince bağırsaklarda belirgindir (Sica D. A., 2002).

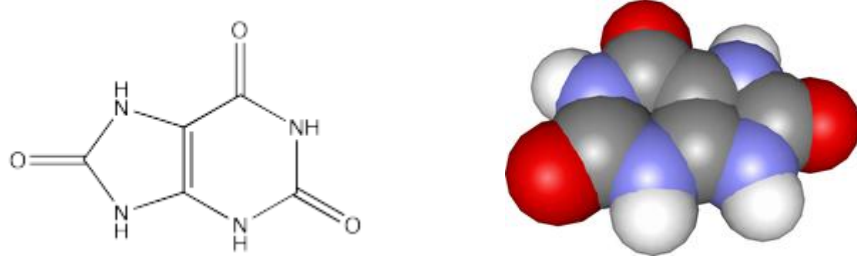
**Pürin nükleotidleri** başlıca karaciğerde yıkılırlar. Pürin nükleotidlerinin yıkılımı, **5'-nükleotidaz** etkisiyle fosfat grubunun ayrılmasıyla başlar, **pürin nükleozid fosforilaz** etkisiyle sürdürülür, son olarak **ksantin oksidaz** etkisiyle ürik asit oluşur. İnsanda, antropoid maymunlarda, kuşlarda, sürüngenlerde pürin yıkım metabolizmasının ana yıkım ürünü ürik asittir. Bu yıkım metabolizması Şekil 2.6' da verilmiştir. Sağlıklı yetişkin bir insanda ürik asidin atılım hızı yaklaşık 0,6 g/24 saattir.



Şekil 2.6. Pürinlerin yıkılımı

## 2.2. ÜRİK ASİT

Ürik asidin kimyasal kapalı formülü  $C_5H_4N_4O_3$ 'tür. Temel bileşeni, nükleik asitlerin yapı taşı olan "purin" halka sistemidir. Ürik asidin moleküler ve tanecik yapısı Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Ürik asidin yapısı

Değişik canlı gruplarında, purin katabolizmasının son ürünü türden türe farklılık göstermekle birlikte, adenin ve guaninin ürik aside kadar yıkımı bütün hayvan türlerinde ortak bir metabolik yol izler. İnsanlarda hayvan aleminden farklı olarak ürikaz enzimi düşük düzeydedir. (Johnson vd., 2010). Bu nedenle de hayvanlarda kan ürik asit düzeyi 0,5-2 mg/dl dolayındayken insanlarda genellikle 5,5 mg/dL'nin üzerindedir. Erkeklerde kadınlara göre genellikle biraz daha yüksek (6,5 mg/dL'nin üstü) değer bulunmaktadır( Johnson, 2005).

Ürik asit purin metabolizmasının bir ürünüdür ve ksantin oksidoredüktaz enzimi ile ksantinden türer. Hayvanların büyük bir çoğunluğunda ürik asit ürikaz enzimi ile allantoin maddesine dönüştürülür.

Ürik asidin purin metabolizması dışında ikinci bir kaynağı fruktoz tüketimidir. Fruktoz alımından sonra geçici olarak ATP düzeyinde azalma sonucu AMP oluşur. Bunun sonucu yükselen AMP deaminaz nükleotid parçalanmasına yol açarak hücre içi ve intraselüler sıvıda ürik asit yükselmesine neden olmaktadır( Halfrisch, 1990).

Bilim dünyası uzun süredir kan ürik asit yükselmesinde fruktozun çok önemli bir rolü olduğunu bildiği halde 2010 yılında ABD kökenli *Nutrition and Metabolism* dergisinde Dr. Sun ve arkadaşlarının fruktozun kan ürik asit düzeyini yükseltici etkisi olmadığını ileri süren bir çalışması yayınlanmıştır (Sun, 2010).

İnsanlarda ürik asit 5.75'ten yüksek pH'larda monosodyum tuzu olan ürat formunda bulunur. Sodyum üratın serumda çözünürlüğünün ortadan kalktığı duruma **hiperürisemi** adı verilir. Serum ürat miktarlarının bilinmesi, özellikle bu hastalığın teşhisinde önem taşımakta ve ürik asit tayini zorunlu olmaktadır. Purin katabolizmasında, ürik asidin allantoin oksidasyonundan sorumlu olan ürikaz (ürat oksidaz, E.C. 1.7.3.3) serum ürik asit konsantrasyonunu saptamada, klinik teşhis enzimi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Klinik biyokimya ve tedavide potansiyel olarak kullanılabilen ürikaz, çeşitli kaynaklardan izole edilmiş ve özellikleri çalışılmıştır (Jian-Bo, 2007).

Ürikaz enzimi klinikte sadece teşhis enzimi olmayıp, aynı zamanda ürik asit metabolizmasındaki bozukluklara bağlı olarak meydana gelen hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. Ürikaz, plazma ürik asit seviyelerini düşürücü ilaçlar arasında yer almıştır.

Ayrıca ürikaz enzimi, kozmetik sanayinde saç boyama ve dalgalandırmada kullanılmıştır. Ürikaz gerek saç boyamasında gerekse dalgalandırmada çok olumlu sonuçlar vermiştir. Son yıllarda yapılan pek çok çalışmada ise, ürikaz enzimi, ürik asit miktarının saptanmasında, biyosensörlerin yapımında kullanılmıştır.

## Ürik asidin özellikleri

Saf ve katı haldeki ürik asit beyaz toz şeklindedir. Asidik özellik göstermektedir.

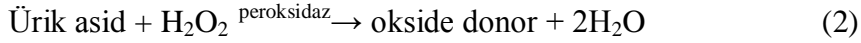
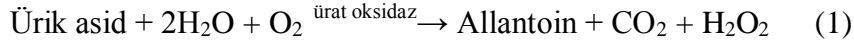
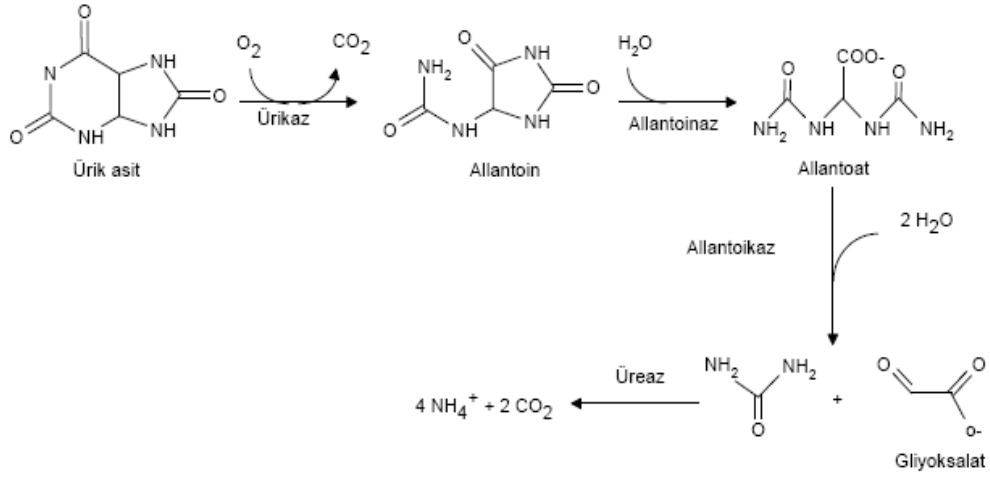
Ürik asidin [IUPAC ismi](#): 7,9-dihidro-1H-purin-2,6,8(3H)-trione, ısıtma ile parçalanır. Yoğunluğu 1,87' dir. Sudaki çözünürlüğü çok azdır. Moleküler ağırlığı 168 g/mol' dür. Asitlik sabiti ( $p K_a$ ) : 5.8' dir.

### 2.2.1. Ürik Asit Metabolizması

Yukarıda belirtilen memeli hayvanlar dışındaki birçok memelide ürik asit ürikaz enzimi yardımı ile allantoin kadar yıkılır. Bu sebeple serum ürik asit seviyeleri düşük düzeydedir (<2 mg/dl). Fakat insanlarda ürikaz geninde evrim süreci sırasında 8-20 milyon yıl önce olduğu düşünülen mutasyon sebebiyle ürikaz enzimi fonksiyon gösteremez ve bu sebeple serum ürik asit seviyeleri diğer memelilere göre daha yüksek seviyededir (>2 mg/dl) (Kanellis vd., 2004).

Kurbağa ve balıklarda ise ürik asitin oksidasyonunda, allantoin allotoinaz etkisi ile 2 mol üre ve 1 mol gliksilik asite yıkılır. Eğer ürikaz enzimi devreye girerse oksidasyon ürünleri olarak allantoin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> üretilir. Ürik asitin ileri yıkım metabolizma reaksiyonu ve diğer reaksiyonları Şekil 2.8' de verilmiştir.





**Şekil 2.8.** Ürik asidin ileri oksidasyon ürünleri

İlk tepkimedede, oksijen tüketimi sonucu oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enzimatik olmayan bir ayrışmaya maruz kalır ve elektrot yüzeyinde eritilen oksijenin toplam konsantrasyonuna katkıda bulunan oksijeni üretir. Eğer iki tepki, her iki enzimi kullanarak birleşilirse, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> olan ilk tepkimenin ürünü sonradan, ikinci tepkimedede tüketilir (Akyılmaz, 2003). Ürik asidin serum ve plazma içinde 4-8 °C 'de 7 gün, 25 °C 'de 3 gün kararlıdır. İdrar için de 15-20 °C 'de 4 gün kararlıdır.

Referans Değerler; Serum; Erkek: 3.5- 7.5 mg/dL, Kadın: 2.6 – 6.0 mg/dL

İdrar 24 saatte, 250 – 750 mg/gün

Doğrusallık: Serum plazma için 1.5 – 30 mg/dL, İdrar için 2.0 – 400 mg/dL

## 2.2.2. Ürik asidin organizmaya etkileri

Ürik asidin normal aralığında olmaması çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Vücutta üretilen ürik asidin yaklaşık 2/3 böbrekler ile atılırken 1/3'de sindirim sistemi kanalı ile atılır. Kan ürik asit seviyeleri çok stabil değildir, oynamalar gösterebilir; günden güne ve bazı kişilerde mevsimlik değişiklikler görülebilir. Ayrıca stres, açlık, vücut kitlesindeki artış serum ürik asit seviyesinde artışa neden olur. Yüksek düzeydeki ürik asidin kristaller halinde başta eklem sıvıları ve böbrekler olmak üzere çeşitli dokularda biriktiği düşünülmektedir. Eklem sıvılarında ürik asit kristallerinin birikimiyle oluşan ağrılı duruma **GUT** hastalığı denir. Bu nedenle ürik asit, gut hastalığı tanı ve tedavisinin takibinde kullanılan bir testtir. Ayrıca kemoterapi alan ve muhtemel bir böbrek fonksiyon bozukluğu endişesi duyulan hastaların takibinde de kullanılır. Ürik asit kristallerinin böbreklerde birikimi ise **böbrek yetmezliği** ve idrar yollarında **taş hastalığına** yol açar.

Birçok hastalık ve patolojik hastalıklar vücut salgılarında ürik asit konsantrasyonlarının değişimleri sonucu oluşur. Örneğin; gut hastalığı (Wortmann, 2001), romatizma gibi, (Khosla vd., 2005) böbrek hastalığı, (Fırıncı vd., 2005) kardiovasküler hastalığı ve nörolojik hastalıklar (Moallem vd., 2002) anlatılır. Diğer yandan, antioksidant olarak, birçok değişiklikte koruma rolünü oynayabilir (Burkhardt vd., 2001 ve Nieto vd., 2000). Benzer şekilde, yükselmiş ürik asit düzeyleri, artırılan alkol tüketimi, aşırı şişmanlık, şeker hastalığı, yüksek kolesterol, böbrek hastalığı ve kalp hastalıkları görülebilir (Arslan, 2008).

Yapılan çalışmalardaki kanıtlar ksantin oksidaz enzim aktivitesinin kalp yetmezliği hastalarındaki artan ürik asit üretimi ile belirgin bir ilişkisinin olduğunu göstermiştir (Cappola, 2002). Ürik asit oluşumundaki enzimatik reaksiyonlardan ikisi ksantin oksidaz tarafından katalize edilir. Bu işlem sonunda her basamakta yan ürün olarak süperoksit molekülü ortaya çıkar (Saugstad, 1999). Serum ürik asit seviyelerindeki artış ksantin oksidaz enzim aktivitelerindeki artışın bir sonucu olarak ortaya çıkar ve sonuçta süperoksit üretimi ve oksidatif stres ile sonuçlanır. Doku

düzeyinde yapılan çalışmalarda kalp yetmezliği durumunda kalp dokusundaki ksantin oksidaz enzim aktivitesinin artışı gösterilmiştir (Cappola, 2001).

Sonuç olarak, ürik asit kararlılığı purin biyosentezi ve katabolizmasının karşıklığı ile sebep olan hastalıkların teşhisinde çok önemlidir (Zhang vd., 2004).

### 2.2.3. Pürin metabolizması bozuklukları

**Hiperürisemi**, kanda ürik asit düzeyinin normalden fazla oluşudur. Gut, nükleik asitlerden zengin diyetle beslenme, nükleik asit yıkılım ve yapılımasının arttığı hemolitik anemi, hücre proliferasyonu ve hücre nekrozunun arttığı neoplazi durumları, ürik asit atılımının bozulduğu böbrek hastalığı, polisitemiler, psöriazis, akut açlık, doku harabiyeti, pernisiyöz anemi, gebelik toksemisi, Lesch-Nyhan sendromu, Von Gierke hastalığı gibi birçok durumda hiperürisemi saptanır.

**Gut hastalığı:** Kanda ve dokularda ürik asit konsantrasyonunun artmasına bağlı bulgularla karakterizedir. % 80 olguda ürik asidin renal atılımı azalmıştır. Yüksek pürinli diyet, asidoz, aşırı alkol alınması, düşük doz aspirin alınması, kalp yetmezliği, laktat infüzyonları, kassal faaliyet gutu ağırlaştırır. Genellikle erkeklerde görülür. Özellikle eklemler ve böbrekler etkilenir. Eklemlerde yüksek miktarda sodyum urat kristalleri birikir. Gut tedavisi için ksantin oksidazı inibe eden allopurinol kullanılır. Şekil 2.9' da gut hastalığının klinik görünümü gösterilmiştir.





**Şekil 2.9.** Gut hastalığının klinik görünümü

**Lesch-Nyhan sendromu:** Hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz (HGPRTaz) eksikliği nedeniyle aşırı ürik asit üretimi ile ilgili kalıtsal bir bozukluktur. Enzim eksikliğinde hipoksantin ve guanin katabolizmasının artmasından dolayı ürik asit düzeyi yükselmektedir. Hasta çocuklarda koreoateozis ve spastisite ile birlikte serebral felç görülür. Hastalık, 2-3 yaşlarında nörolojik belirtilerle ortaya çıkmaktadır. Çocuklar saldırgan davranışlıdır, el ve ayak parmaklarıyla dudaklarını ısırarak kendilerine zarar verirler. Şekil 2.10' da lesch- nyhan sendromunun klinik görünümü gösterilmiştir.



**Şekil 2.10.** Lesch- Nyhan sendromunun klinik görünümü

**Von Gierke hastalığı:** Glukoz-6-fosfataz eksikliği nedeniyle pentoz fosfat yolu aktivitesinin artışına ve riboz-5-fosfat artışıyla pürin aşırı üretimine bağlı olarak hiperürisemi ile karakterizedir.

**Hipoürisemi:** Kanda ürik asit düzeyinin normalden az oluşudur. Wilson hastalığı, ksantinüri, Fanconi sendromu, adenozin deaminaz eksikliği, pürin nükleozid fosforilaz eksikliği gibi durumlarda hipotürisemi saptanır.

**Ksantinüri:** Ksantin oksidaz eksikliği nedeniyle ksantin böbrek taşları oluşumu ve hipotürisemi ile karakterizedir.

#### **2.2.4. Ürik Asidin Tayin Yöntemleri**

Bakteriyal kaynaklar içerdikleri doğal ürünlerle birlikte bu ürünlerin canlı sistemde dönüşüm reaksiyonlarını katalizleyen enzimleri de bulundurlar. Mikroorganizmaların enzim aktiviteleri genel olarak, etkilediği substratın canlıdaki veya canlının yaşadığı ortamdaki miktarıyla orantılıdır. Ürik asit miktarlarının belirlenmesi gereksinimi sebebiyle kullanılan standart metotlar şunlardır:

- 1.Spektrofotometrik
- 2.Enzimatik
- 3.Kromatografik
- 4.Polarografik
- 5.Kolorimetrik
6. Diğer teknikler

#### **Spektrofotometrik ve enzimatik teknik kullanılarak ürik asit tayini**

Ürik asit reaktifi Synchron CX sistemi ve kalibratörü ile birlikte kullanıldığında insan serumu, plazması veya idrarındaki ürik asit konsantrasyonunun kantitatif tayin edilir.

Ürik asit ölçümleri böbrek yetmezliği, gut, lösemi, psoriyazis, açlık veya diğer aşırı derecede zayıflatan durumlar dahil çok sayıda böbrek ve metabolik bozuklukların ve sitotoksik ilaçlar alan hastaların tanı ve tedavisinde kullanılır.

Ürik asit reaktifi ürik asit konsantrasyonunun bir zamanlı bitiş noktası yöntemiyle ölçülmesinde kullanılır. Ürik asit, ürikaz ile yükseltgenerek allantoin ve hidrojen peroksit üretilir. Hidrojen peroksit renkli bir ürün üretilmesi için peroksidazla katalize edilen bir reaksiyonda 4-aminoantipirin (4-AAP) ve 3,5-dikloro-2-hidroksibenzen sülfonat ile reaksiyona girer.

Synchron CX sistemi uygun numune ve reaktif hacimlerini küvet içinde otomatik olarak orantılar. Kullanılan oran bir kısım numuneye 25 kısım reaktiftir. Sistem 520 nanometredeki absorbans değişikliğini takip eder. Absorbanstaki bu değişiklik numunedeki ürik asit konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve sistem tarafından ürik asit konsantrasyonunun hesaplanması ve gösterilmesi için kullanılır. Biyolojik sıvı numuneleri, herhangi bir laboratuvar testi için rutin olarak kullanılanla aynı şekilde toplanmalıdır. Yeni alınmış serum veya plazma tercih edilen örneklerdir. Yeni alınmış idrar da test için kullanılabilir. Tam kanın bir numune olarak kullanılması tavsiye edilmez.

Örnek saklanması ve kararlılığı için;

**1.** Kan tüpleri her zaman kapalı ve dik bir konumda saklanmalıdır. Serum veya plazma alındıktan sonra iki saat içerisinde serum veya plazmanın hücrelerle temas etmesinin fiziksel olarak ayrılması tavsiye edilir.

**2.** Serum veya plazma oda sıcaklığında 8 saatten daha uzun süre kalmamalıdır. Testler 8 saat içerisinde tamamlanmayacaksa, serum veya plazma +2°C ile +8°C arasında saklanmalıdır. Testler 48 saat içerisinde tamamlanmayacaksa veya ayrılan numune 48 saatten daha uzun süre saklanacaksa, numuneler -15°C ile -20°C arasında dondurulup

saklanmalıdır. Donmuş numuneler sadece bir kez çözdürülmelidir. Tekrar tekrar dondurulup çözdürülen numunelerde analit bozunması meydana gelebilir.

**3.** İdrar testlerinin idrar alındıktan sonraki 2 saat içerisinde yapılması tavsiye edilir.4 Zamanlı örneklerde, toplama kabı oda sıcaklığında tutulmalıdır. İdrarın alkalik olarak tutulması için sodyum hidroksit (NaOH) eklenmelidir.

**4.** Seyreltilmiş idrar numuneleri 48 saatte kadar buzdolabında (+2°C ile +8°C arasında) saklanabilir. Bu laboratuvar tarafından belirlenmiş ek örnek saklama ve stabilite koşulları:

Örnek hazırlama sırasında tüm idrar örnekleri ile birlikte idrar kontrolleri ilgili sistemde analiz edilmeden önce bir kısım numuneye dokuz kısım normal salinle seyreltilir. Bu seyreltmeler kontrollerde 1:10 50 µL 450 µL örneklerde 1:10 50 µL 450 µL'dir.

Synchron CX sistemi tarafından verilen tüm idrar sonuçları bir düzeltme faktörü 10 ile çarpılmalıdır. Numune hacmi 0,5 mL doldurulmuş bir numune kabı en uygun hacimdir. Birincil tüp numunelerinde en uygun hacim için veya idrar örnekleri test tüplerinden numune halinde alınır.

## **Kromatografik Yöntemler**

### **a) Spektrometrik tip analiz**

Revers faz kromatografisi prensibini içerir. Serum ve idrarda ürik asit bakılır. Spesifitesi ve hassasiyeti artmaktadır. İdrar ve serumdaki ürik asidi kantitatif olarak ölçer. HPLC metodunda, 280 nm veya 235 nm'deki spektrofotometrik ölçümlü revers faz kromatografisi kullanılmıştır. 280 nm'de yüksek hassasiyet gösterir, biyolojik sıvıların nötralize ekstraktlarını kullanır.

## **b) Elektrokimyasal Method**

İyon değişim ayırımına dayanır. Serum ve idrarda bakılır. Seçilmiş metot olarak önerilmiştir. Bu yöntemin avantajı, daha duyarlılık ve spesivite gösteren sabit faz iyon değişimini kapsayan, elektrokimyasal yöntemin kullanılmasıdır. Amperometrik ölçümün duyarlılığı mg/L'dir. Metot, 10 ve 200 mg/L arasında lineerdir. Yalnız teofilin metabolitleri, idrardaki ürik asit tahlillerini girişim yapar. Bu metot spesifik, hızlı, mobil fazı sabit ve serum ürik asit seviyesi için gereken cevap 6' dan azdır.

## **Polarografik**

Özgül bir elektrot yardımıyla, ürikaz etkisi sırasında tüketilen O<sub>2</sub> ölçülür. Oksijen tüketim oranı, ürik asit konsantrasyonu ile orantılıdır. Serum ve idrardaki ürik asit konsantrasyonu ölçmede kullanılır. Geniş olarak kullanılmamıştır. Allopurinol, ksantin ve hipoksantin ile interfere olabilir.

## **Kolorimetrik**

Ürikaz ile reaksiyondan önce ve sonra iyot ile kolorimetrik titrasyon sonucu açığa çıkan total redükte edilmiş maddelerin ölçümü esasına dayanır. İki ölçüm arasındaki fark ürik asit seviyesi ile ilgilidir. Kullanışa hazır değildir. Bu metodun güvenilirliği % 98 ile % 100 arasındadır.



## Ürik asitin diğler tayıin yöntemleri

### Fosfotungstik asit methodu

Ürik asit, alkali ortamda, fosfotungstik asitin eş zamanlı indirgenmesi ile allantoine oksitlenir. Böylece, oluşan tungsten mavisi 700 nm dalga boyunca spektrofotometrede okunur.

Tercihen ürik asit miktar tayıinlerini kan serumu üzerinden yapmalıdır. Spesifik değildir. Orijinal ilk method, sodyum karbonat çözeltisi içinde, fosfotungstik asitin reaksiyonundan önce, protein presibitasyonunu ve gümüş tuzu şeklinde filtrattan ürik asidin izolasyonunu kullanmıştır. Siyonidin, metodun sensitivitesini arttırdığı rapor edilmiştir. Bu şekilde, oluşan rengin açılması ve gümüş nitratin çözülmesi engellenmiş olur. Birçok alkali reaktanlar, oluşan tungsten mavisinin rengini arttırmak için kullanılmıştır ( $A_{max}=700nm$ ). İndirgenme esasına dayanan türlü metodlar, aynı serumda aynı sonuçları veremez, genel olarak bazılarının normal değer sınırları aşağıda, bazılarının ise daha yukarıdadır. Ürikaz usulü ele alınırca metodların çoğunun daha yüksek değerler verdiği görülür.

### Caraway methodu

Yapılışı basit, hızlı ve ayıraçları kolay bulunabilir. Spesifik değildir. Ayıraçların ihtimamla seçildiği, pH'ların sıkı kontrol altına alındığı durumlarda bu method, yararlı sonuçlar verebilir. Ürik asidin, sodyum karbonatlı ortamda, fosfowolfromik asidi (fosfotungstik asidi) indirgenmesi esasına dayanır. Bu methodlara göre, normal serum ve plazmada ürik asit miktarı, erkekler için %3.5-8mg, kadınlar için %2.5-7mg'dır.

Her iki metot da ortamda amino asit, peptit, protein ya da amin ve amidler bulunduğunda doğru sonuç vermezler.

## **Natelson methodu**

1953 yılında, Natelson bir teklif getirmiştir. Folin metodunun Brown tarafından modifiye edilmiş halini standart method haline getirilmiştir. Bu method, protein içermeyen, serbest serum filtratında bir tungstik asit ile alkali oksidasyonu içermektedir. Okside edici ajan olan fosfotungstik asid, üre ile tamponlanmış Na-siyanür varlığında iş görür. Bu metodun sıkıntısı, spesifitesinin eksik oluşudur.

Bu metotlar örneklerdeki ürik asit miktarlarının kolay bir şekilde ve sürekli izlenmesine izin vermezler. Çünkü bunlar pahalı ve yavaşlardır, iyi yetişmiş operatörlere ihtiyaç duymaktadırlar ve bununla birlikte bazı durumlarda analizin süresini uzatan ön işlemler ya da ekstraksiyon gerektirmektedirler (Mello ve Kubota, 2002).

Son yıllarda geliştirilen ölçüm tekniklerinden en önemlisi olan biyosensörler diğer geleneksel tekniklere göre daha fazla avantaj sağlamaktadırlar. Biyosensörlerde kullanılan biyolojik algılayıcı sistemin seçiciliği, hassasiyeti; örnek ön hazırlığına ve fazla miktarda örneğe bağlı kalmaksızın kompleks karışımlarda bile gerçek zamanlı analiz için çok yüksek spesifikte cihazların geliştirilmesine elverişlidir. Biyosensörler ayrıca çok yüksek hassasiyete, ölçüm hızına, basit kullanıma sahip ve çoğaltılabilir analitik cihazlardır. Bu nedenle son yıllarda örnek analizi için biyosensörler tercih edilmeye başlanmıştır.

Bu tez çalışmasında geliştirilen biyosensörde biyomateryal olarak bakteri kullanılması, biyosensörlerle ölçümün avantajlarına ek katkılar sağlamaktadır.

### **2.2.5. Ürikaz Enzimi (Ürat oksidaz, E.C. 1.7.3.3)**

Ürik asidi O<sub>2</sub> varlığında allantoin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> ürünlerine katalizleyen enzimdir. Ürikaz enzimi klinikte sadece teşhis enzimi olmayıp, aynı zamanda ürik asit metabolizmasındaki bozukluklara bağlı olarak meydana gelen hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. Ürikaz, plazma ürik asit seviyelerini düşürücü ilaçlar arasında yer almıştır.

Ayrıca ürikaz enzimi, kozmetik sanayinde, saç boyama ve dalgalandırmada kullanılmıştır. Ürikaz gerek saç boyamada gerekse dalgalandırmada çok olumlu sonuçlar vermiştir. Son yıllarda yapılan pek çok çalışmada ise, ürikaz enzimi, ürik asit miktarının saptanmasında, biyosensörlerin yapımında kullanılmıştır.

## **2.3. Biyosensör Temelli Yöntemler**

### **2.3.1. Biyosensörlere genel bakış**

Canlılar teknolojilerin hayal bile edemeyeceği duyarlık performansı gösterirler. Örneğin bazı köpeklerin koku almaları insanlardan 100.000 kat daha duyarlıdır. Yılan balıkları tonlarca su içerisine ilave edilen birkaç damla yabancı maddeyi derhal algırlar. Kelebekler eşlerinin yaydığı birkaç molekülü bile hissederler. Algler ise zehirli maddelere karşı çok duyarlıdır (Meral, 2006).

Biyosensörlerin tarihi 1950'li yılların ortalarında L.C. Clark'ın Cincinnati Hastanesi'nde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın O<sub>2</sub> miktarını bir elektrod ile izlemesiyle başlar. 1962 yılında Clark ve Lyons Glukozoksidaz (GOD) enzimini O<sub>2</sub> elektrodu ile kombine ederek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başardılar. Böylece yeni bir analitik sistem oluştu. Bu sistem bir yandan biyolojik sistemin yüksek spesifisikliğini (enzim) diğer taraftan ise fiziksel sistemin (elektrod) tayin duyarlılığını birleştirmiş ve geniş spektrumlu bir uygulama olanağı bulmuştur.

Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanabilirken sisteme biyomateryalin de katılması ile diğer birçok organik ve biyolojik maddenin tayini mümkündür. Böylece hazırlanan analiz sistemlerine **biyosensörler** adı verilir (Aykut ve Temiz, 2006).

### 2.3.2. Biyosensörler ve bileşenleri

Biyosensörler (biyoalgılayıcılar), bünyesinde biyolojik bir materyali bulunan ve bir fizikokimyasal çeviriciyle birleştirilmiş analitik cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Bir biyosensörün amacı, bir veya bir grup analitin (analiz edilecek madde) miktarıyla orantılı olarak sürekli sayısal elektrik sinyali üretmektir.

Biyosensör sistemleri üç temel bileşenden oluşmaktadır. Bunlar Şekil 2.11’de verildiği gibi; seçici tanıma mekanizmasına sahip "**biyoaktif tabaka / biyoajan**", bu biyoaktif tabakanın incelenen maddeyle etkileşmesi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürebilen "**sinyal iletici sistem**" ve bu sinyalleri ölçebilen bir "**kaydedici**" yani bir ölçüm cihazından oluşmaktadır (Meral vd., 2006).



Şekil 2.11. Biyosensörün genel şematik gösterimi

### 2.3.3. Biyoajanlar (Biyoaktif tabaka)

Biyoajan bir analitin tanınmasında biyosensörün biyolojik hassasiyete sahip kısmıdır. Biyosensörün hassasiyeti ve seçiciliğinde etkilidir. Bu reseptörler tek bir substratı bağlayacak ve diğer substratlara bağlanmayacak özellikte olmalıdır; temel olarak biyoajanlar; biyokatalitik ve biyoaffinite olmak üzere 2 grup altında incelenirler (Mehrvan vd., 2000).

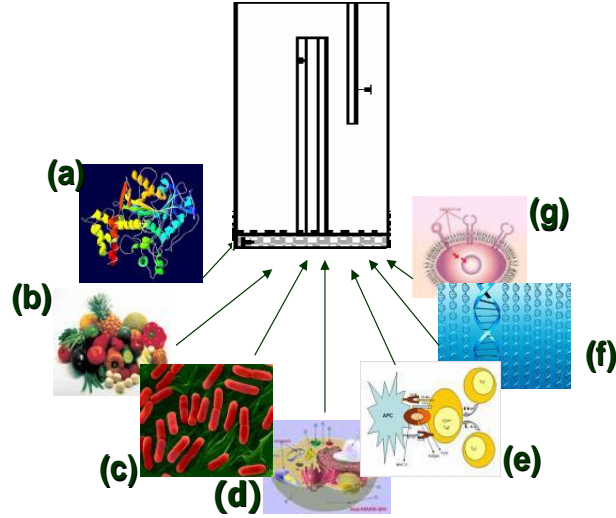
**Biyoaffinite ajanları** olan antikorlar, hormon almaçları, DNA, lektin gibi moleküller antijenlerin, hormonların, DNA parçacıklarının ve glikoproteinlerin moleküller tanımlanmasında kullanılır. Kompleks oluşumu sonucunda, tabaka kalınlığı, kırınım indisi, ışık emilmesi ve elektriksel yük gibi fizikokimyasal parametrelerin değişimine neden olurlar.

**Biyokatalitik ajanlar**, analit üzerinde moleküller değişime neden olmakta ve bu dönüşüm sonucu ortamda azalan ya da artan madde miktarı takip edilerek sonuca gidilmektedir. Bu amaçla saf enzim ya da koenzim sistemleri, mikroorganizmalar ve bitkisel ya da hayvansal doku parçaları kullanılmaktadır. Bu nedenle aslında biyosensörleri de çalışma prensiplerine göre Tablo 2.2'deki gibi biyoaffinite sensörleri ve biyokatalitik sensörler olmak üzere iki grupta incelemek mümkündür.

**Tablo 2.2.** Biyoaffinite ve Biyokatalitik ajanlar ve bunlarla tayin edilebilen analitler

BİYOAFFİNİTE SENSÖRLER		BİYOKATALİTİK SENSÖRLER	
RESEPTÖR	ANALİT	RESEPTÖR	ANALİT
Enzim	Substrat, İnhibitör	Enzim	Substrat
Apoenzim	Prostetik grup	Mikroorganizma	Kofaktör
Antikor	Antijen	Organel	Aktivatör
Reseptör	Hormon	Doku kesiti	İnhibitör
Lektin	Glikoproteinler Sakkaritler Protein		Enzim

Günümüzde bir biosensör geliştirilmesi için biyoajan olarak kullanılabilen enzim kaynakları Şekil 2.12’de gösterilmektedir.



(a) Enzim (b) Doku kesitleri (c) Mikroorganizmalar (d) Organeller  
(e) İmmuno ajanlar (f) Nükleik asitler (g) Reseptör molekülleri

**Şekil 2.12.** Biyoajan olarak kullanılan enzim kaynakları

### 2.3.4. Sinyal ileticiler (Transduserler)

Biyolojik ve biyokimyasal sinyalleri veya cevabı belirlenebilir sinyale dönüştürebilen sistemlere transduser denir (Gürsoy vd., 2002). Bir substrat için komponentin aktivitesi  $O_2$  tüketimiyle,  $H_2O_2$  oluşumuyla, NADH konsantrasyonundaki değişimle, floresans, absorpsiyon, pH değişimiyle, kondüktivite, sıcaklık ya da kütledeki değişimle izlenebilmektedir (Luong vd., 1997; Mello ve Kubota, 2002). Sinyal ileticilerde gerçekleşen değişimler ve bu değişimleri ölçebilecek ölçüm cihazları Şekil 2.13 'de gösterilmektedir.



Şekil 2.13. Sinyal ileticilerde gerçekleşen değişimler ve ölçüm cihazları

Transduserler temelde dört grup altında toplanırlar (Aykut ve Temiz, 2006);

#### 1-Elektrokimyasal transduserler

Amperometrik

Potansiyometrik

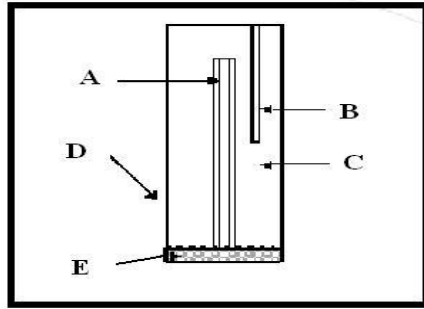
Kondüktometrik

#### 2-Optik transduserler

#### 3-Akustik transduserler

#### 4- Termal transduserler

Bu tez çalışmasında elektrokimyasal transduserlerden biri olan Amperometrik temele dayalı Çözünmüş oksijen (DO) elektrot kullanıldı. Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi Şekil 2.14’de gösterilmektedir.



- 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**

**Şekil 2.14.** Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi

Amperometrik temele dayalı çözünmüş oksijen elektrotları, Au (Katod), Ag/AgCl (Anod), yarı doymuş KCl (Elektrolit) ve oksijene duyarlı teflon bir membrandan oluşmuştur (Dinçkaya ve Telefoncu, 1993). Membran; gaz geçirgenliğinin yanı sıra sensörün dış çevreden korunmasına da olanak sağlar. Bu koruma sayesinde reaksiyon ortamında olabilecek bir takım safsızlıklardan kaynaklanması muhtemel girişim etkileri de minimize edilmiş olmaktadır (Akyılmaz ve Dinçkaya, 2000). İletici sistem olarak bir amperometrik sensörün kullanılması durumunda ürünlerden sinyal oluşturan tür elektrod yüzeyinde tüketilmektedir (Dinçkaya, 1999).



### 2.3.5. Biyoaktif tabakanın elektrot yüzeyine immobilizasyonu

Enzimler, dokular, mikroorganizmalar, hücre reseptörleri, antibadiler, nükleik asitler ya da tüm hücre (bakteri, fungus, hayvan ya da bitki); analitlerin tayini için kullanılan biyoajanlardır.

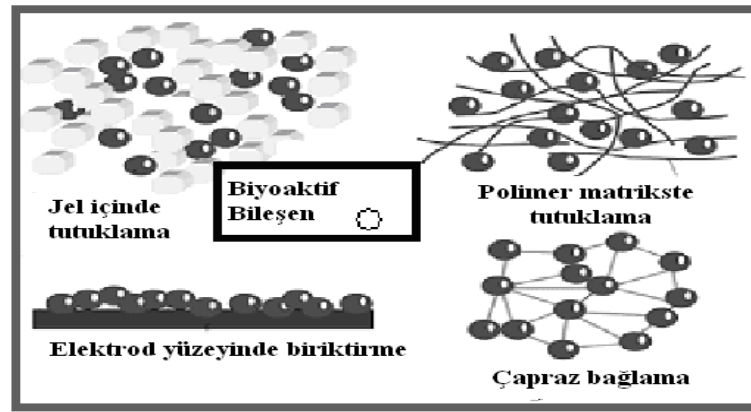
Genel olarak biyoajanlar uygun bir şekilde immobilizasyonla transdusere bağlanır. Immobilizasyon metodu immobilize edilecek biyoajanın yapısına göre belirlenir. Kullanılan transdüksiyon elementi ve analitin fiziksel durumu da seçilecek immobilizasyon metodu için önemli faktörlerdir. Genel olarak 4 yaygın immobilizasyon metodu kullanılmaktadır. Bunlar aşağıda açıklanmış ve Şekil 2.15 de gösterilmiştir.

**1-Adsorbsiyon:** Selüloz, silikajel, cam, hidroksiapatit, ve kollagen; enzimleri adsorplamak için kullanılan başlıca yapılardır. Hidrojen bağları, multiple tuz köprüleri, Van der Waals bağları ve elektron transisyon kompleksleri oluşumu sayesinde bağlanma gerçekleşir. Kararlılığı az olduğundan biyosensörlerde pek tercih edilmeyen bir immobilizasyon metodudur.

**2-Tutuklama:** Biyomolekülü içeren çözelti içinde polimerik jel hazırlandığı zaman jelin donmasıyla biyomolekül jel matriks içinde tutuklanmış olur. Poliakrilamid, nişasta, naylon ve siliastik jel biyomoleküllerin tutuklanması için biyosensörlerde kullanılabilir.

**3-Çapraz bağlama:** Glutaraldehit, heksametilen di-izosiyanat, 1,5-difloro, 2,4 nitrobenzen ve bis-diazobenzidin-2,2'-disülfonik asit gibi bifonksiyonel ve multifonksiyonel reaktiflerin kullanılmasıyla biyomoleküllerin intermoleküler çapraz bağlanması sağlanır. Bu reaktifler, katı desteklere biyomolekülleri bağlayabilirler. Bu nedenle de biyosensörlerde sık kullanılan immobilizasyon yöntemlerinden biridir.

**4-Kovalent bağlama:** Enzimde katalitik aktivite için gerekli olmayan fonksiyonel grupların bağlanması yoluyla gerçekleştirilir. Genellikle proteinlerin aminoasit yan zincirlerinde bulunan amino, karboksil, imidazol, tiyol, hidroksil gibi nükleofilik fonksiyonel gruplarla kovalent bağlama yapılır (Sharma vd., 2003). Bu yöntemin riski kovalent bağlanmaya bazı durumlarda aktif bölge gruplarının katılmasıdır.



**Şekil 2.15.** Biyosensör biyoaktif tabakalarında biyoajanların immobilizasyon teknikleri

### 2.3.6. Enzim biyosensörleri

Biyosensör teknolojisinin tarihsel geçmişine bakıldığında bu alandaki ilk çalışmaların enzim sensörleriyle başladığı görülmektedir. 1962’de Clark ve Lyons ve 1967’de Updike ve Hick tarafından rapor edilen glukoz tayinine yönelik “glukoz oksidaz enzim elektrodları” bu konudaki ilk örnekleri oluşturmaktadır. Biyosensör hazırlamada enzimleri kullanmak; spesifiklik bakımından avantajlı ancak saf enzimin pahalı oluşuda dezavantajlıdır.

Temel bilimlerdeki ilerlemeler enzimlerin yanı sıra diğer biyolojik materyallerin fonksiyonlarının da çok daha ayrıntılı bir şekilde ortaya çıkarılmasına imkân vermiştir. Bu ilerlemelerin doğal bir sonucu olarak farklı biyolojik materyallerin ve iletim

sistemlerinin kombinasyonuyla çok çeşitli biyosensörler geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam edilmektedir. Bugünkü sonuca bakıldığında, hangi temel iletim sistemi söz konusu olursa olsun pratik ve ticari uygulamalarda enzim elektrotlarının büyük bir üstünlüğü göze çarpmaktadır. Ancak elektrokimyasal esaslı olanların tartışılmaz bir ağırlığı söz konusudur. Bu sonuçtaki canlı sistemlerle ilgili en büyük etmen hemen hemen her türlü maddenin doğrudan veya dolaylı olarak analizinde kullanılacak binlerce enzimin varlığıdır.

Bilinen enzimlerin yanı sıra bilinmeyenlerin potansiyel varlığı, piyasada yüzlerce ticari enzim preparatının bulunabilirliği ve bu sayının her geçen gün yükselmesi enzim sensörlerinin tartışılmaz üstünlüğünün devam edeceğinin bir göstergesidir (Telefoncu, 1999a; Dinçkaya, 1999).

### **2.3.7. Doku biyosensörleri**

1981' de ilk defa bitki dokusu temelli elektrod hazırlanmasından itibaren, birçok bitki dokusu temelli biyosensör geliştirilmiştir. Bitki doku materyalleri kullanılarak oluşturulan biyosensörler, izole enzimlerle oluşturulan biyosensörlere bir alternatiftir (Sidwell vd., 1986). Hayvansal ve bitkisel dokuların ve organellerin kimi enzimlerce özellikle zengin olduğu bilinmektedir. İşte bu enzimlerin izole edilmiş preparatları yerine doğrudan yoğun buldukları bu kaynaklar biyosensör hazırlanmasında kullanılır (Telefoncu, 1999).



(A)

(B)

**Şekil 2.16.** Bitki dokuları (A) dokusu kesiti (B)

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

Doku kesitleri kullanıldığında biyosensörün cevap süresi genellikle uzundur. Bu süreyi kısaltmak için direkt doku kesiti yerine doku ezilerek veya iyice homojenize edilerek hazırlanır. Böylece difüzyon problemi de azaltılmış olur (Telefoncu, 1999).

### **2.3.8. Mikrobiyal biyosensörler**

Saflaştırılmış enzimler yüksek spesifik aktivitede olmalarına rağmen pahalı ve kararsız olmaları biyosensör alanında uygulamalarını sınırlandırmaktadır. Mikroorganizmalar ise biyosensörlerin biyoaktif tabaka materyalleri olarak pek çok avantaja sahiptirler.

*Esherichia coli* hücresinde bile 3000'den fazla enzim bulunduğu 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 etkilenmemesidir.

Şimdiye kadar bilinen enzimlerin % 90'ından fazlası hücre içidir. Bu bakımdan, hücre içi enzimlerin kaynağı olarak bütün hücrelerin kullanımı, çeşitli endüstriyel işlemlerde saflaştırılmış enzimlere daha iyi bir alternatif olarak gösterilmektedir. Biyosensörlerde enzim kaynağı olarak mikroorganizmaların kullanımı enzim saflaştırılmasının uzun ve pahalı işlemlerini gerektirmez, enzimler doğal çevresinden ayrılmadığından daha uzun süre aktivitelerini kaybetmeden durabilir ve ağır metaller gibi dıştan gelen toksiklerin inaktivasyonundan korunurlar. Ancak mikroorganizmaların bütün hücreler olarak kullanıldığı biyosensörler, enzim esaslı biyosensörlerle karşılaştırıldığında daha yavaş biyosensör cevabı vermektedir. Bunun sebebi hücre çeperi boyunca analitin ve ürünlerin difüzyonudur. Analitlerin hücre zarından difüzyonunu önleme yollarından biri geçirgen hücreler kullanmaktır. Bu hücreler, donma ve erime gibi fiziksel, organik çözücüler ve temizleyiciler ile kimyasal ve lizozim ya da yün kreatini ile enzimatik yollarla geçirgen hale getirilebilirler. En yaygın yöntem, toluen, kloroform, etanol ve bütanol gibi organik çözücüler veya Na-deoksikolat, digitonin gibi yüzey aktif maddeler kullanarak kimyasal yolla hücreleri geçirgen hale getirmektir. Bu gibi kimyasal muameleler, hücre membranlarından lipidlerin bazılarının uzaklaştırılmasıyla çok küçük porlara yol açar, hücrenin iç kısmındaki enzimler gibi makromoleküller bileşiklerin önemlilerini tutarken hücre membranındaki küçük moleküller analitlerin serbest difüzyonuna izin verir. Ancak bu yollarla hücre zarının daha geçirgen hale getirilmesi hücreye zarar verebilirler ama yinede hücre içi enzimlerin kaynağı olarak kullanılabilirler (D'Souza, 2001).

Mikrobiyal biyosensörlerde ölçümün esası, mikroorganizmaların ölçümü yapılacak olan analiti bir karbon kaynağı olarak enzimleriyle metabolize ederek solunum aktivitesinin ölçülmesi esasına dayanır. Bu nedenle çözülmüş oksijen (DO)

elektrodu mikrobiyal sensörler için en yaygın transdüserleridir. Bunun dışında CO<sub>2</sub> elektrodu, NH<sub>3</sub> elektrodu, cam elektrod ve termistör de kullanılmaktadır.

Mikrobiyal biyosensörlerin birçok uygulama alanı vardır ama en yaygın olarak gıda ve çevre analizlerinde kullanılırlar (Telefoncu, 1999).

#### **2.4. Probiyotik Bakteriler**

Yeryüzündeki tüm canlılar, çeşitli mikroorganizmalarla iç içe yaşamaktadır. Yeryüzünde insan nüfusu 5 milyar iken mikroorganizma popülasyonu 100 trilyondur (Korkut vd., 2003). Bu nedenle mikroorganizmaların etkileri küçümsenemez. Mikroorganizmalar; şarap, bira, peynir, yoğurt, ekmek, turşu v.b. besinlerin üretimine kadar her yerde mevcuttur.

Mikroorganizmalar ile insan sağlığı arasındaki bağlantıya kılavuzluk eden hipotez ise, Bulgar köylülerinin uzun yaşamlarının fermente süt ürünleri tüketimlerinden kaynaklandığını savunan Nobel ödüllü Rus bilim adamı Elie Metchnikoff (1845-1916) tarafından ileri sürülmüştür. Bu hipoteze göre normal bağırsak florası bugün probiyotikler olarak tanımlanan yararlı mikroorganizmalardan etkilenebilmektedir (Doillet ve Langdon, 1994). Metchnikoff'tan sonra probiyotikler üzerine sayısız araştırma yapılmış ve probiyotikler oldukça bilimsel ve ticari ilgi odağı olmuşlardır. Bu ilgi özellikle mikroorganizmaların sağlık üzerine olumlu bir katkı göstermesinin ilginçliği ve elde edilebilirliği ile ticari form haline dönüştürülebilmesinin kolaylığı nedeniyle olmuştur. Bilimsel olarak desteklenmiş ve hastalık riskini azaltan "Probiyotik mikroorganizmaları" içeren mandıra ürünleri (süt, yoğurt ve peynir gibi), et ürünleri, meyve suları ve çikolata gibi değişik fonksiyonel ürünler uzun zamandır marketlerde yerini almıştır.

### 2.4.1. Probiyotik bakterilerin özellikleri

**Probiyotikler;** hayvansal canlıların sindirim sistemi ve özellikle bağırsaklarında mikrobiyal dengeyi düzenleyen canlı bakteriler sınıfından mikroorganizmalardır (Surawicz, 2003). **Prebiyotikler** ise probiyotik bakteriler ile birlikte simbiyotik yaşam sürdüren, polisakkarit esaslı sindirilmeyen yapılardır ve birlikte bulunduğu bakterilerin sayılarını ve aktivitelerini arttırarak faydalı probiyotik etkisini güçlendirirler. Probiyotik bakteriler mide asitliğine diğer bakterilere göre daha dayanıklıdır. Safra tuzuna ve lizozim enzimine daha dirençlidir. Probiyotik bakteriler laktik asit, asetik asit, bakteriyosin gibi antimikrobiyal maddeler üreterek, bağırsaklarda istenmeyen mikroorganizmaların çoğalma hızını kontrol ederler ve doğal floranın denge içinde bulunmasını sağlarlar.

Probiyotik bakterilerin önemli özelliklerinden biri de, bağırsak çeperine tutunabilme yeteneğine sahip olmalarıdır. Bu tutunma en önemli ve hatta biyolojik etki gösterebilmeleri için mutlaka olması gereken bir özellik olarak belirtilmiştir. Probiyotik bakteriler, bağırsak çeperine tutunarak patojen mikroorganizmaların tutunmasını engellerler (İnanç vd., 2005). Ayrıca ince ve kalın bağırsaklardaki kötü ve zararlı bakterilerin yerine geçerek, onları kontrol altına alıp, bağışıklık sistemini güçlendirerek birçok hastalığa karşı vücut direncinin artmasına katkıda bulunurlar. Sindirim kanalında sağlıklı bir bakteri dengesi oluşturup, bazı gerekli enzimleri üreterek sindirime katkıda bulunurlar. Laktoz ve protein sindirimini kolaylaştırırlar (Bozdoğan, 2006). Probiyotikler esas olarak laktik asit bakterileridir. Bunun yanında araştırmalar bazı mayaların da probiyotik özelliğe sahip olduğunu göstermiştir (Oh vd., 1995). Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar ve mayalar Tablo 2.3'de ard arda gösterilmiştir.

**Tablo 2.3.** Probiyotik olarak kullanılan bakteriler ve mayalar

<b><i>Lactobacillus</i></b>	<b><i>Bifidobacterium</i></b>	<b><i>Bacillus</i></b>	<b><i>Pediococcus</i></b>	<b><i>Streptococcus</i></b>
<b>Türleri</b>	<b>Türleri</b>	<b>Türleri</b>	<b>Türleri</b>	<b>Türleri</b>
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pediococcus cerevisiae</i>	<i>Streptococcus cremoris</i>
<i>Lactobacillus cellebiosus</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Lactobacillus lactis</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Bacillus lentus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>		<i>Streptococcus lactis</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bacillus coagulans</i>		<i>Streptococcus diacetilactis</i>
<i>Lactobacillus casbrevis</i>	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>			
<i>Lactobacillus casei</i>				

<b><i>Bacteriodes</i></b>	<b><i>Propionibacterium</i></b>	<b><i>Leuconostoc</i></b>	<b>Küfler</b>	<b>Mayalar</b>
<b>Türleri</b>	<b>Türleri</b>	<b>Türleri</b>		
<i>Bacteriodes capillus</i>	<i>Propionibacterium shermanii</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Bacteriodes suis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>		<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Candida torulopsis</i>
<i>Bacteriodes ruminicola</i>				
<i>Bacteriodes amylophilus</i>				



#### 2.4.2. Probiyotik bakterilerin enzim aktiviteleri

Probiyotik bakteriler pek çok enzim içerirler. Bunlardan bazılarının aktivitelerinin oldukça yüksek olduğu bilinmektedir. Yüksek aktiviteli olduğu belirlenen enzimlerden önemlileri aminopeptidazlar, dipeptidazlar, tripeptidazlar, lipazlar, karboksipeptidazlar, esterazlar, fosfatazlar, peroksidazlar, glukozidazlar, galaktozidazlardır (Shihata ve Shah, 2000). Ayrıca yapılan çalışmalarda probiyotik bakteri içeren süt ve yoğurtlarda mayalanma süresi ile orantılı olarak toplam çözünür fenolik bileşiklerin ve antioksidan maddelerin artış gösterdiği ve buna bağlı olarak bu bileşiklerin metabolizma reaksiyonlarını katalizleyen fenolazlar, polifenolazlar ve antioksidazlar gibi enzimlerin aktivitelerinin de arttığı tespit edilmiştir.

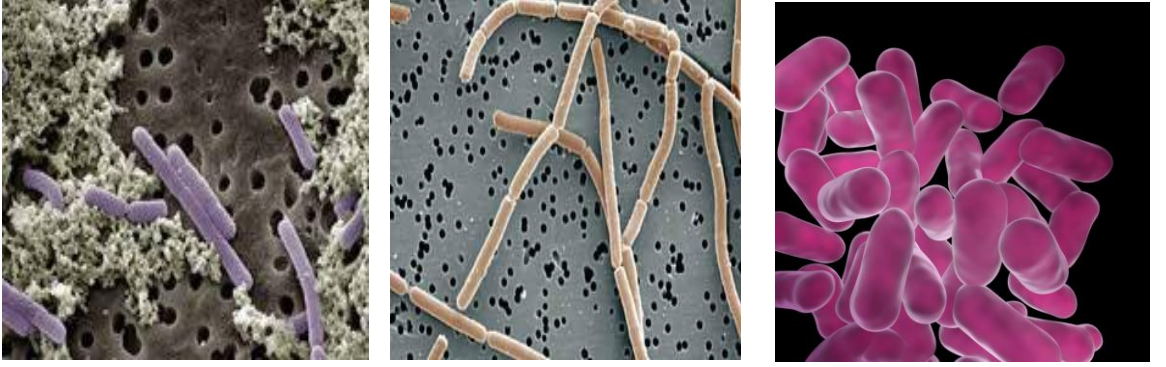
Laktik asit bakterilerinin metabolizmalarında kullandıkları ana substratlar malik asit, sitrik asit ve mayalardan arta kalan heksozlar ve pentozlar gibi şekerlerdir (Davis vd., 1985). Glukoz, fruktoz, ksiloz ve arabinoz şekerleri metabolizma sırasında yükseltgenerek laktik asit, asetik asit, etil alkol ve CO<sub>2</sub>'e katabolize olurken, sitrik asit ile asetik asit de karbonil maddelere özellikle tereyağı tadına sahip diasetile dönüşür. Ayrıca laktik asit bakterilerinin tanen, antosiyanin gibi fenol bileşenleri üzerindeki aktiviteleri sonucu şarabın tadı ve rengi istenilen değişikliğe uğrar (Geredeli ve Anlı, 2005).

Probiyotik bakterilerin çok sayıda enziminin aktivitesinin yüksek oluşu veya aktivitelerinin yükseltilebilmesi hem sağlık hem de enzimatik analizlerde kullanılabilirliği bakımından probiyotik bakterilerin endüstriyel önemini arttırmaktadır.

Bu nedenle son yıllarda hızlı bir gelişim gösteren analiz yöntemlerinden biri olan biyosensörlerde de enzim kaynağı olarak kullanılmaktadırlar. Bu amaçla probiyotik mikroorganizmaların kullanıldığı bir biyosensöre örnek ise orto-fosfat'ın belirlenmesinde maltoz fosforilaz enzimini içerdiği bilinen *Lactobacillus brevis*'in kullanıldığı bir biyosensördür (Hüwel vd., 1997).

### 2.4.3. Probiyotik bakterilerin fiziksel özellikleri

Probiyotik bakteriler morfolojik açıdan çok değişik özellik gösterirler. Temelde üç şekil grubu vardır; Bu şekillerin mikroskopik görüntüleri Şekil 2.17’de gösterilmektedir. Bu üç familyanın fizyolojik özellikleri oldukça benzerdir.



**Şekil 2.17.** Bazı probiyotik bakterilerin mikroskopik görüntüleri

(a) Kısa çomak (*L. casei*) (b) Uzun çomak (*L. bulgaricus*) (c) Kok şekilli (*L. acidophilus*)

Ayrıca tüm üyeler; Gram pozitif ve düşük oranda şeker ihtiva eden ortamda pseudokatalaza sahip suşlar da katalaz negatif olmak üzere ikiye ayrılırlar. *Sporolactobacillus inulinus* dışındakiler spor oluşturmeyen, fakültatif anaerobik, *Pediococcus* cinsi dışındakiler de yalnız tek düzlemde bölünen ve bazı istisnalar hariç hareketsiz, çubuk veya kok şeklinde bakteriler olarak tanımlanmaktadır (Shape vd., 1966; Şahin, 1990). Fermantasyon yapabilme özelliğine sahip olup asıl fermantasyon ürünü olarak laktik asit üretmektedirler. Katalaz ve sitokromda olduğu gibi hem grupları içermedikleri halde oksijen varlığında gelişebilen nadir mikroorganizmalardır. Doğal ortamları; süt ve süt ürünleri, işlenmemiş, taze veya çürümüş bitkiler, insan ve hayvanların bağırsak mukozalarıdır (Çon ve Gökalp, 1997).

#### **2.4.4. Liyofilize formdaki probiyotik bakterilerin saklama koşulları**

Probiyotik preparatlar 22-25 °C de ve kuru yerde depolanmalıdır ve pH 6-7 arasında olmalıdır. Kuvvetli asidik ve bazik ortamda canlılıklarını kaybederler. Bu yüzden ticari preparatlara asidik maddeler karıştırılmamalıdır. Depolanmaları süresince -5 °C civarında soğutucuda, kapalı ambalaj içinde tutulmalı ve ancak raf ömürleri boyunca depolanmalıdırlar. Depolanma süresince demir ve bakır başta olmak üzere minerallerle etkileşimleri probiyotiklerin canlılığını kısıtlar. Yüksek konsantrasyonlardaki vitaminler ile etkileşimleri de zararlıdır. Bunlardan başka antioksidan ve antifungal maddeler de probiyotiklerin canlılığını olumsuz etkileyen faktörlerdir (Tannock, 1999).

#### **2.5. Tezde Kullanılan Biyomateryallere Genel Bakış**

Bu bölümde önce biyosensörde materyal olarak kullanılan temel bakteri *L. casei* bakterisi hakkında bilgi verildi. Sonra immobilizasyonda kullanılan jelatin ve glutaraldehid hakkında açıklamalar yapıldı.

##### **2.5.1. *Lactobacillus casei* bakterisi**

*Lactobacillus* ismini, süt anlamına gelen lacto'dan, şekli gibi çubuk anlamına gelen bacillus'tan alır. *Lactobasiller* adından da anlaşılacağı üzere hareketsiz, uzun ve kısa çomaklar şeklindedir. *Streptokoklar* ise genelde hareketsiz, ikili ve zincir şeklinde dizilen koklardan oluşur ve gelişmeleri için mutlaka karbondioksitli bir ortama ihtiyaç duyarlar. Bu bakteriler için en ideal gelişme sıcaklıkları 41 ile 43 °C olduğundan daha düşük sıcaklıklarda tam olarak faaliyet gösteremeyecek, daha yüksek sıcaklıklarda ise canlılıklarını yitirebileceklerdir. Gerekli şartlar tamamlandığı anda, bu bakteriler önce 1 mol glukoz ve 1 mol galaktozdan oluşan süt şekeri laktozu hidrolizler. Sonra özellikle glukoz birimlerinin laktik asite yükseltgenmesini katalizler.

*Lactobacillus*'ların ortak özellikleri; uzun silindir şeklinde, zincir yapabilen çomaklardır. Nadiren bazı türleri hareketlidir. Karbonhidratları kolayca sindirebilirler. Son ürün olarak daima lactate açığa çıkarırlar. Hem üredikleri ortamda asit oluştururlar hem de asit ortamda daha kolay ürerler. Ortamdaki pH'ı 4' ün altına düşürebilirler. Sükrozdan ekstraselüler dekstran sentezlerler. Üredikleri ortamda amino, yağ ve nükleik asitler, mineraller ile bilhassa B vitamini bulunmasını isterler. Diş çürüğünden birinci derece sorumludurlar. Bu bakteriler tükürükteki laktobasidin enzimi tarafından engellenirler. Hepsinin hücre mebranlarında glycerol teichoic acid(GTA), hücre duvarında ribitol teichoic acid (RTA), D-glucosyl(Glc), L-Rhamnose (Rha), D-Galactosyl(Gal), meso veya L-diaminopimelic acid bulunur ve bunların hepsi antijeniktir (Başyigit G., 2004).

*L.casei* 0.7- 1.1x 2.0- 4.0 µm büyüklüğünde çomaklardır. Sütü peynirleştirdiği için 'casei' ismi verilmiştir. Süt ve süt ürünleri, bağırsak, ağız ve vajina florasında bulunur. Ağızda en sık rastlanan lactobasil budur. Endokardit sebebi olabilir.

Laktobasillerin klasik sınıflandırmaları fermentatif özelliklerine göre yapılmaktadır.

Fakültatif heterofermantatif laktobasiller: Empden-Meyerhof Parnas metabolik yolunu kullanarak heksozları sadece laktik asite fermente ederken bazı türler ise glikoz sınırlamasında laktik, asetik, formik asit ve CO<sub>2</sub> üretmektedir. Pentozları da fosfoketolaz yolunu kullanarak laktik ve asetik asite fermente ederler. Örneğin; *L. casei*, *L. plantarum*, *L. sake*.

Aso ve Akazan 1962 yılında laktik asit bakterilerinin antikarsinojenik etkiye sahip olduğu ileri sürülmüştür. Daha sonraki yıllarda hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalarda; deney hayvanları yoğurt ve yoğurda *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *Bifidobacterium*'un türleri gibi bakteriler eklenerek beslenmiş, çalışma sonucunda deney hayvanları üzerinde antikarsinojenik bir etki bulunmuş ve tümör riskinin azaldığı belirtilmiştir. Birçok araştırmada, probiyotik bakterilerin fazla miktarda ağızdan alımı sonucunda, istenmeyen bağırsak bakterilerinin oluşturduğu karsinojenik

olmayan maddelerin karsinojen maddelere dönüşümünde rol oynayan beta-glukoronidaz, azoredüktaz ve nitroredüktaz enzimlerinin azalmasını sağladığı belirtilmiştir. *L. acidophilus*'un fermente ürünlerle birlikte alınmasıyla bağırsaklardaki bu enzimlerin düzeyinde iki ile dört kat azalma saptanmıştır.

Aso ve Akazan (1992), çalışmalarında 1010 kob/g düzeyinde *L. casei* toz preparatından bir yıl boyunca günde üç defa tüketen insanlarda mesane kanseri tedavi sürecinin hızlandığını tespit etmişlerdir.

Vinderola ve Reinheimer (2003) *L. casei* ve *L. rhamnosus*'un asit ortama *L. acidophilus*'a göre daha duyarlı olduğunu belirlemiştir. Mide öz suyuna benzeyen ortamda *L. casei* ve *L. rhamnosus*'un hücre sayısının 2,7-5,9 logaritmik birim azaldığını bildirmişlerdir. Buna karşın Prasad vd. (1999) ise *L. rhamnosus* suşlarının asit ve safra tuzunda *L. acidophilus*'a göre daha dayanıklı olduğunu belirtmişlerdir.

### **2.5.2. 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 (Rose vd., 1987).

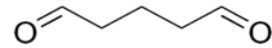
Ucuz ve kolay bulunur olması yanında, immobilizasyon materyali olarak kullanılan diğer polisakkaritlerin aksine jel oluşumu için herhangi bir moleküle, iyona tuza ya da pH ayarlanmasına gerek duymaması, jelatinin enzim, hücre ve doku immobilizasyonunda sıklıkla tercih edilmesini sağlamaktadır.

Termal ve mekanik kararlılığının artırılması amacıyla immobilizasyonda çoğunlukla çapraz bağlayıcı ajan, bir reaktif olan glutaraldehid ile birlikte kullanılır (Scardi, 1987; Esposito vd., 1995).

### 2.5.3. Glutaraldehid

Glutaraldehid, özellikle enzimlerin kovalent immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan bifonksiyonel bir reaktiftir.

Biyosensör geliştirilmesinde kullanılan enzim, hücre doku vb. biyoaktif materyallerin, jelatin, kollajen, kitosan gibi biyolojik moleküllerle birlikte glutaraldehid ile çapraz bağlar oluşturması esasına dayalı immobilizasyon yöntemi oldukça yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Guilbault ve Kauffmann, 1987; Scouten vd., 1995). Yöntem kolay uygulanabilir olması yanında immobilize sistemin termal ve operasyonel aynı zamanda da depo kararlılığını artırması bakımından tercih edilmektedir. Glutaraldehit'in yapısı Şekil 2.18' de gösterilmiştir.



**Şekil 2.18.** Glutaraldehit'in yapısı

Glutaraldehitin mikroorganizmalar için kısmen toksik etki göstermesine rağmen biyoaktif sisteme kazandırdığı avantajlardan dolayı, % 1,0'in altındaki konsantrasyonlarda glutaraldehit kullanılarak toksik etkisi en aza indirilip hücre immobilizasyonları da gerçekleştirilmektedir (Hemachander vd., 2001).

### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1. Materyaller**

##### **3.1.1. Kimyasallar**

Denemelerde substrat olarak kullanılan ürik asit, çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan glutaraldehit (% 25 v/v) Merck (Almanya) firmasından temin edildi.

Liyofilize bakteriler (*Lactobacillus casei*) PROX (Fransa)'dan MAYSA (İstanbul) aracılığı ile temin edildi ve kullanılmadığı zamanlarda - 18 °C'de buzdolabında saklandı.

*Lactobacillus*ların besi ortamı olan MRS Broth ise Acumedia Manufacturerers (Michigan)'dan temin edildi.

Biyoaktif tabakanın elektroda immobilizasyonu için kullanılan jelatin Sigma-Aldrich Chemical Co. (USA)'den temin edildi.

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

##### **3.1.2. Cihazlar**

Orion 3 Star model Oksijen metre ve Orion 3 Star 080113 serisi çözünmüş oksijen (DO) problemleri kullanıldı.

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

Bakterilerin besi yerinden izolasyonu için 5000 rpm ROTINA 38R Soğutmalı santrifüj kullanıldı

Tampon çözeltileri hazırlamak için 213 Microprocessor pH metre kullanıldı. Eppendorf otomatik pipetler kullanıldı.

Chiltern HS31 manyetik karıştırıcı ve Gec Avery analitik terazi kullanıldı.

## **3.2. Metodlar**

### **3.2.1. Çözünmüş oksijen probunun çalışma ilkesi**

Amperometrik temele dayalı çözünmüş oksijen probları, Au (Katod), Ag/AgCl (Anod), yarı doygun KCl (Elektrolit) ve oksijene duyarlı teflon bir membrandan oluşmuştur.

Membran, gaz geçirgenliğinin yanı sıra sensörün dış çevreden korunmasına da olanak sağlar bu koruma sayesinde reaksiyon ortamında olabilecek bir takım safsızlıklardan kaynaklanması muhtemel girişim etkileri de minimize edilmiş olmaktadır. İletici sistem olarak bir amperometrik sensörün kullanılması durumunda potansiyometrik sensörlerden en büyük fark ürünlerden sinyal oluşturan türün elektrod yüzeyinde tüketilmesidir (Dinçkaya, 1999).



### **3.2.2. Bakterinin ( *Lactobacillus casei* ) biyosensör için hazırlanması**

Liyofilize bakteri esaslı biyosensör hazırlanmasında, biyoaktif tabaka bileşenlerinin adaptasyonu için manyetik karıştırıcı ile sabit bir hızda karıştırılan 30 ml çalışma tamponu içeren termostatik reaksiyon hücresi içinde 30 dk bekletildi. Daha sonra ilk ölçümü almak için tekrar 30 ml çalışma tamponu içeren termostatik reaksiyon hücresi içine daldırılarak manyetik karıştırıcı ile sabit bir hızda 10 dk karıştırıldı. Bu süre sonunda çalışma tamponu ve çözünmüş oksijen probu arasındaki çözünmüş oksijenin difüzyonundan dolayı çözünmüş oksijen konsantrasyonunun dengeye geldiği değer kaydedildi.

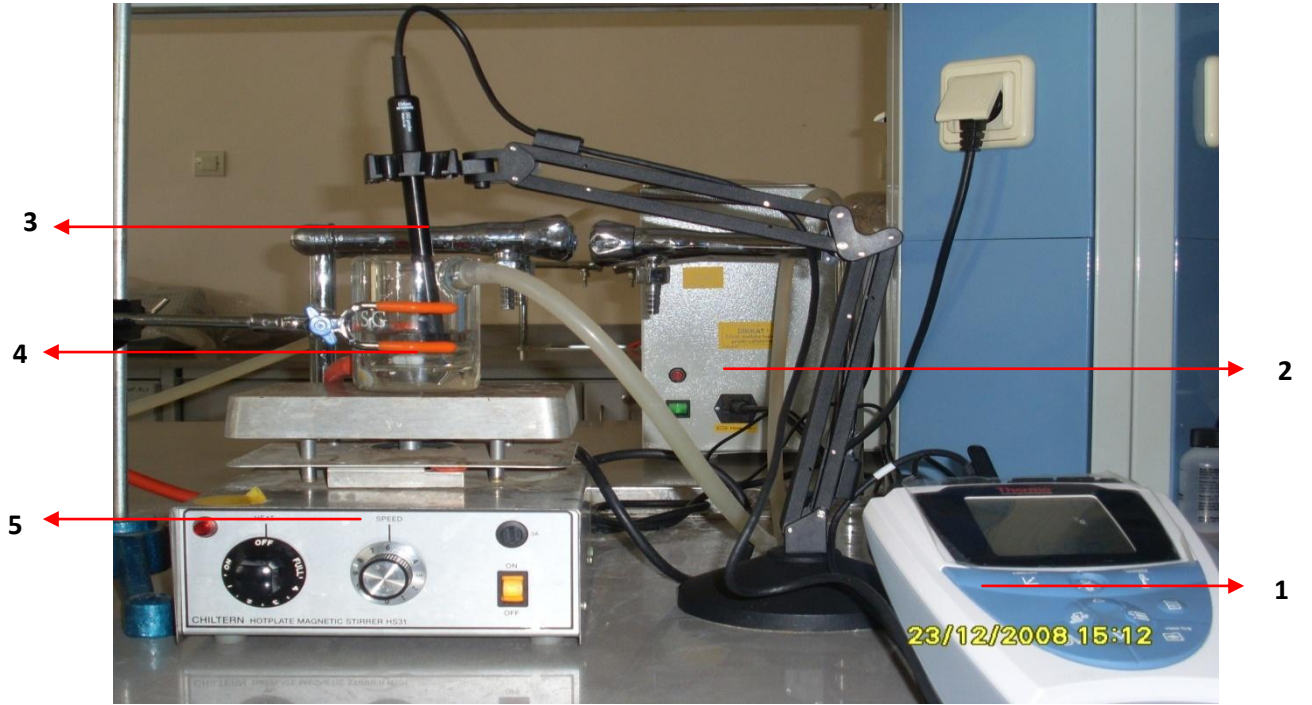
### **3.2.3. Biyoaktif tabaka materyalinin hazırlanması**

Biyoaktif tabaka materyalinin hazırlanması için kuru formdaki bakteri (10 mg) ve jelatin (10 mg) tartılarak bir flakonun içine alındı ve 400 µL fosfat tamponu (pH: 8; 150 mM) ilave edilerek çalkalandı ve bu karışım 37,5 °C deki su banyosunda 15 dk jelatin çözününceye kadar bekletildi.

Su banyosunda çözünür hale getirilmiş olan kuru bakteri-jelatin karışımının 200 µL'si çözünmüş oksijen prob membranına yayıldı ve jelatinin donması için +4 °C'deki buzdolabında 30 dk bekletildi. Bu sürenin sonunda glutaraldehitte çapraz bağlama yapmak için, hazırlanan biyosensör % 0,5'lik (v/v) glutaraldehit çözeltisi (pH: 8; 150 mM fosfat tamponu) içine daldırıldı ve bu çözelti içinde 5 dk bekletildi. Glutaraldehit muamelesinden sonra biyosensör destile su ile pek çok kez yıkanarak kullanıma hazır hale getirildi.

### 3.2.4. Hazırlanan mikrobiyal esash biyosensör ile ölçüm ilkesi

Hazırlanan biyosensörde oksijen elektrodunun membranına biyoaktif tabaka immobilize haldedir. Belirlenen çalışma koşullarında tampon çözelti bulunduran reaksiyon kabındaki dengelenmiş çözünmüş oksijen miktarı biyosensörle kaydedilir, sonra belirli substrat ilavesinin ardından, enzimatik reaksiyon başlar. Bu sırada reaksiyon kabındaki, substratı çözünmüş oksijen ile aktif tabakanın kapsadığın bakterinin ilgili enzimiyle katalizlenmesi sonucu yükseltgenir ve çözünmüş oksijen azalır. Reaksiyon sonunda çözünmüş oksijen miktarındaki azalma biyosensörle ölçülür, kaydedilir. Buna göre biyosensörün ölçüm ilkesi; ortamın çözünmüş oksijen miktarındaki bu azalmanın ölçülmesi yoluyla ortam da mevcut yükseltgenen substrat miktarının tayini esasına dayanır. Hazırlanan biyosensör ile ölçüm çalışmalarının yapıldığı düzeneğin fotoğrafı Şekil 3.1’de verilmiştir.



**Şekil 3.1.** Tezde kullanılan çözünmüş oksijen (DO) esaslı biyosensör düzeneği

- 1- Oksijen metre
- 2- Termostatlı ve sirkülasyonlu su banyosu
- 3- Biyosensör elektrotu
- 4- Su ceketli reaksiyon kabı
- 5- Isıtıcı karıştırıcı

Liyofilize bakteri esaslı biyosensör, ilk ölçüm alınmadan önce biyoaktif tabaka bileşenlerinin adaptasyonu için manyetik karıştırıcı ile sabit bir hızda karıştırılan 30 ml çalışma tamponu içeren termostatik reaksiyon hücresi içinde 30 dk bekletildi. Daha sonra ilk ölçümü almak için tekrar 30 ml çalışma tamponu içeren termostatik reaksiyon hücresi içine daldırılarak manyetik karıştırıcı ile sabit bir hızda 10 dk karıştırıldı. Bu süre sonunda çalışma tamponu ve çözünmüş oksijen probu arasındaki çözünmüş oksijenin difüzyonundan dolayı çözünmüş oksijen konsantrasyonunun dengeye geldiği değer kaydedildi. Bu anda, substrat standartları veya örnekler, reaksiyon hücresindeki toplam son hacim 30 ml olacak şekilde eklendi. Biyosensörün biyoaktif tabakasındaki liyofilize bakteri ile ilave edilen substrat arasındaki enzimatik reaksiyon ön çalışmalarda belirlendiği gibi 20 dakikada tamamlandı ve yeni bir denge durumuna ulaşıldı. Bu durumda oksijen metrede okunan çözünmüş oksijen miktarı, substrat yokluğuna kıyasla daha düşüktü. Deneysel çalışmalarda, her iki denge durumunda okunan çözünmüş oksijen miktarının farkı alındı.

Substratın farklı konsantrasyonlarına karşı ölçülen çözünmüş oksijen tüketimi değerleri kullanılarak standart grafikler elde edildi.

### **3.2.5. Biyosensör için uygun bakteri formunun seçilmesi**

Çalışmanın başlangıcında sensörde biyomateryal olarak kullanılacak olan probiyotik *L. Casei* bakterisinin mevcut liyofilize formu ile uygun besi ortamında büyütülen yaş formunun ve bu formdan saflaştırılan *L. casei* 'nin biyosensörlerdeki performanslarının karşılaştırılması yapıldı. Aşağıda taze –yaş formda *L. casei*'nin hazırlanma aşamaları verilmiştir.

### 3.2.5.1. *Lactobacillus*lar için besi ortamının hazırlanması

Bakteriyal biyosensör geliştirilmesi amacıyla kullanılacak olan liyofilize haldeki bakteri, biyosensöre direkt immobilizasyon materyali kullanılarak immobilize edildi. Diğer formların biyosensöre immobilize edilmeden önce besi yerinde yetiştirilmesi amacıyla probiyotik bakteriler *Lactobacillus* türünün yetiştirilmesi için uygun olan MRS Broth ortamına alındı.

MRS Broth ortamı hazırlanmasında; Pepton 10 g/L, et ekstraktı 8 g/L, maya ekstraktı 4 g/L, D(+)-glukoz 20 g/L, dipotasyum hidrojen fosfat 2 g/L, Tween 80 1 g/L, diamonyum hidrojen sitrat 2 g/L, sodyum asetat 5 g/L, magnezyum sülfat 0.2 g/L, mangan sülfat 0.04 g/L ve MRS Broth'tan 2.75 g/L tartıldı. Hepsi 250 ml'lik bir erlen içerisinde konuldu. Toplam hacim 50 ml olacak şekilde destile su ilave edildi ve sterilizasyon için 4 saat boyunca otoklavlandı. Sonra aşılama işlemi için 0.1 g liyofilize haldeki *L. Casei* bakterisi MRS Broth'lu hazırlanan besi ortamına alındı ve 35 °C'de ve 200 rpm'de çalkalamalı olarak 72 saat inkübasyona bırakılarak üremeleri sağlandı. Sürenin sonunda bakteriler besi ortamıyla birlikte 4600 rpm'de + 4 °C'de 25 dk santrifüjlenerek besi ortamından ayrıldı. Fosfat tamponunun 10'ar ml (50 mm, pH: 7.5) ile ve bidistile suyla yıkandı. Bu taze bakterinin, substrata adaptasyonu için ürik asit substratlı ortama geçildi. Bunun için yeni 250 ml'lik erlene 0.252 g ürik asit, 2.75 g MRS Broth ve % 1 olacak şekilde taze bakteri aşılandı. Toplam hacim 50 ml olacak şekilde ayarlandı. 35 °C'de ve 200 rpm'de 20 saat boyunca inkübasyona bırakıldı (Oh vd., 1995).

### 3.2.5.2. Substrata adapte edilen bakterilerin besi ortamından izolasyonu

Spesifik üreme hızının sabit ve maksimum olduğu 20 saatlik inkübasyon süresinin sonunda besi ortamındaki bakteriler aynı şekilde santrifüjlendi. Sıvı kısımlar atıldıktan sonra bakterilerin temizlenmesi tampon ilave edildi ve tekrar santrifüjlendi.

Bu işlem iki kez, fosfat tamponuyla tekrarlandı. Sonuçta elde edilen ve bu bakteri içeren çökeleği biyosensör hazırlanması için kullanıldı. Kullanılmadığı zamanlarda besi ortamından izole edilen bakteriler  $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

Biyosensörde Liyofilize *L.casei* ve yeniden büyütülmüş *L.casei* formları kullanılarak performansları karşılaştırıldı.

### **3.2.5.3. Uygun bakteri formunun seçilmesi**

Örneklerde ürik asitin belirlenmesi için geliştireceğimiz bakteriyal biyosensöründe biyomateryalin cinsinin seçilmesi amacıyla, mevcut liyofilize *L. casei* formu ve bu formun *lactobacilluslar* için uygun olan MRS Broth besi yerinde substrat olarak kullanılan ürik aside bileşimine adapte edilmiş bakteri formu kullanıldı.

Yukarıda belirtilen her iki form için ayrı bakteri biyosensörleri hazırlandı ve değişen ürik asit konsantrasyonlarına karşılık bu biyosensörlerin verdikleri cevaplar karşılaştırılarak daha uygun olan bakteri formu belirlendi. Ölçümler 150 mM, pH: 8 fosfat tamponunda ve  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleştirildi.

### **3.2.6. Biyosensörün biyoaktif tabaka materyallerinin optimizasyonu**

Bakteri esaslı biyosensör ile optimum biyosensör cevabının alınacağı en uygun koşulların belirlenmesi için biyoaktif tabakayı oluşturan bakteri miktarının, jelatin miktarının ve çapraz bağlayıcı ajan olan glutaraldehitin biyosensör cevabı üzerine etkileri araştırıldı.

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

### **3.2.6.1. Bakteri miktarının biyosensör cevabına etkisi**

Biyoaktif tabakadaki bakteri miktarının optimizasyonu için jelatin miktarı ve glutaraldehit oranı sabit tutularak bakterinin farklı miktarlarının biyosensör cevabı üzerine etkisi incelendi. Bunun için 200 µl fosfat tamponu (50 mM; pH: 7.5) için 5 mg jelatin, % 0.625'lik glutaraldehit sabit olmak şartıyla 10 mg; 20 mg; 40 mg bakteri içeren biyosensörler hazırlandı.

### **3.2.6.2. Jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi**

Geliştirilen biyosensör için en uygun bakteri miktarı 10 mg olarak belirlendikten sonra, yine glutaraldehit oranı sabit tutularak jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi incelendi. Bunun için 10 mg bakteri, % 0.625'lik glutaraldehit sabit tutularak 5 mg; 10 mg; 20 mg jelatin içeren biyosensörler hazırlandı.

### **3.2.6.3. Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi**

Biyosensör için en uygun bakteri ve jelatin miktarı belirlendikten sonra glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla 200 µl fosfat tamponu (150 mM; pH: 8) için belirlenen optimum bakteri (10 mg) ve jelatin miktarı (10 mg) sabit tutularak sadece glutaraldehid yüzdesi değiştirilerek % 0.25; % 0.5; % 1 oranında glutaraldehit ile biyosensörler hazırlandı.

### **3.2.7. Biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyonu**

Biyosensörün çalışma koşullarını optimize ederek en iyi biyosensör cevabını verdiği koşulların bulunması için tampon pH'ı, konsantrasyonu ve sıcaklığın biyosensör cevabına etkileri incelendi ve her birinin % biyosensör cevabına karşı grafikleri çizildi.

#### **3.2.7.1. pH optimizasyonu**

pH: 5.0; 6.0; 7.0; 7.5; 8.0 olan 50 mM Fosfat tamponları ve pH: 8.5; 9.0; 10.0 olan 50 mM Tris-HCl ve Glisin tamponları hazırlandı. En iyi biyosensör cevabının hangi pH değeri ile alındığı belirlendi.

Farklı tamponda ölçüme geçilirken biyosensör o tamponda ve çalışma sıcaklığında 20 dakika bekletildi.

#### **3.2.7.2. Uygun tampon konsantrasyonu**

Geliştirilen biyosensörün optimum pH değeri ve bu pH değerindeki uygun tampon sisteminin belirlenmesinden sonra tampon konsantrasyonlarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla, hazırlanan biyosensörler için farklı konsantrasyonlarda ki tamponlarla ölçümler gerçekleştirildi.

Bu amaçla bir önceki çalışmada en uygun tampon sistemi olarak belirlenen fosfat tamponunun (pH: 8.0) 50, 100, 150, 200 mM konsantrasyonları ile çalışıldı.

### **3.2.7.3. Optimum sıcaklık**

Optimum sıcaklığın belirlenmesi için düşük sıcaklıktan yüksek sıcaklığa doğru 20; 25; 30; 35; 37.5; 40; 45; 50 °C'de ölçümler gerçekleştirilerek geliştirilen biyosensör için biyosensör cevapları incelendi.

### **3.2.8. Biyosensörün karakterizasyon çalışmaları**

#### **3.2.8.1. Doğrusal ölçüm aralığının belirlenmesi**

Geliştirilen biyosensörün çalışma koşulları ve biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonlarından sonra belirlenen optimum koşullarda bir biyosensör hazırlandı. Ürik asidin farklı konsantrasyonları için ölçümler alınarak standart grafikler elde edildi. Lineer bir artışın gözlemlendiği konsantrasyon aralığı ölçüm aralığı olarak belirlendi.

Ölçümler 10 mg bakteri, 10 mg jelatin (200 µl 150 mM pH: 8 fosfat tamponu içinde), % 0.5'lik glutaraldehid olarak belirlenen optimum koşullarda hazırlanan biyosensörle 150 mM fosfat tamponu (pH 8.0) ve 40 °C'de gerçekleştirildi.

#### **3.2.8.2. Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği**

Geliştirilen biyosensörle yapılan analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi için belirlenen optimum koşullarda, ürik asidin 25 mM konsantrasyonu için arka arkaya ölçümler alındı. Ölçümlere ilişkin standart sapma ve varyasyon katsayıları hesaplanarak biyosensörün tekrar kullanılabilirliği incelendi.



### 3.2.8.3. Operasyonel kararlılığı

Belirlenen optimum koşullarda hazırlanan bakteriyal esaslı biyosensör ile standart ürik asidin 25 mM konsantrasyonu için arka arkaya 11 kez ölçüm alındı. Başlangıçta elde edilen biyosensör cevabı % 100 kabul edilerek tekrarlanan ölçümler ile aktivite incelendi ve hazırlanan biyosensör ile arka arkaya kaç kez ölçüm alınabileceğine karar verildi.

### 3.2.8.4. Depo kararlılığı

Geliştirilen bakteriyal esaslı biyosensör ile aktivitesini kaybetmeden ne kadar süre boyunca ölçüm alabileceğini belirlemek için optimum koşullarda bir biyosensör hazırlandı. Bu biyosensör ile 22 gün boyunca ürik asidin 25 mM konsantrasyonu için ölçümler alındı. Ölçüm alındıktan sonra bir sonraki gün ölçüm almak üzere biyosensör fosfat tamponunun buharında + 4 °C'de buzdolabında bekletildi. Ölçüm alınmadan önce buzdolabından çıkarılıp 5 dk dışarıda, 30 dk da çalışma sıcaklığındaki (40 °C'de) çalışma tamponunda (150 mM fosfat tamponu; pH 8.0) bekletildi. Bu sürenin sonunda ölçüme geçildi. İlk gün alınan ölçümün aktivitesi % 100 olarak kabul edildi. 22 gün boyunca alınan ölçümlerin biyosensör cevapları % aktivite cinsinden verildi.

## 3.2.9. Geliştirilen biyosensör ile ürik asidin tayin edilebilirliği

### 3.2.9.1. Biyosensörün substrat spesifitesinin tayini

Bakteriyal esaslı biyosensörü ile ürik asitten farklı, purin halkası içeren çeşitli bileşiklerin tayin edilip edilemeyeceğinin belirlenmesi amacıyla, substrat olarak **kafein**, **teofilin**, **ksantin**, **sitrik asit**, **askorbik asit** kullanılarak 150 mM pH 8 fosfat tamponunda 40 °C ' de ölçümler alındı. Biyosensörün ürik aside verdiği cevap % 100 kabul edilerek substrata karşı % aktivite grafiği çizildi.

### 3.2.9.2. İdrar ve kan örneklerinde ürik asit tayini

Örnek analizi için hazırlanan idrar ve kan örneklerinden, idrar numunesinin 9.34 mg/ dL, 17.90 mg/ dL ve 37.5 mg/dL ürik asitin bilinen miktarı destile su ile 0.5 mL'ye tamamlandı ve hazırlanan bu çözelti 1: 20 oranında seyreltilerek ölçümler alındı (Timur vd., 2003).

Kan numunesinin 4.88 mg/dL ve 9.10 mg/dL ürik asitin bilinen miktarı destile su ile 0.5 mL'ye tamamlandı ve hazırlanan bu çözelti 1: 20 oranında seyreltilerek ölçümler alındı.

Bakteriyal esaslı biyosensörün idrar ve kan numunelerinde ürik asit tayini için uygulanabilirliğinin belirlenebilmesi amacıyla farklı idrar ve kan numuneleri için ölçümler gerçekleştirildi. Standart katma yöntemiyle alınan sonuçların doğruluğu test edildi.

Her bir örnek için ürik asitin standart grafiğinde doğrusal ölçüm aralığında ki 15 mM ve 30 mM konsantrasyonlar için ölçümler alındı ve standart grafiğe göre sonuçları karşılaştırıldı.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Biyosensörün Biyoaktif Tabaka Materyallerinin Optimizasyonuna İlişkin Bulgular

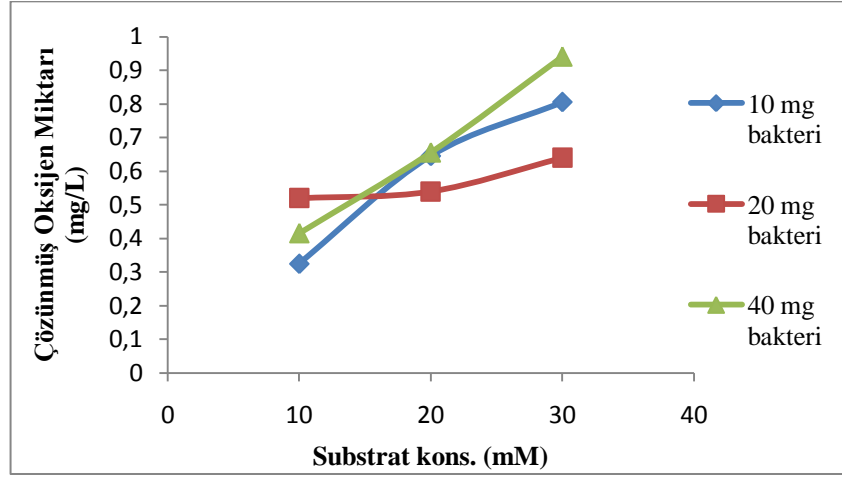
#### 4.1.1. Bakteri formunun seçimi

Biyomateryalin cinsinin seçilmesi amacıyla, mevcut liyofilize *L. casei* formu ve bu formun *lactobacilluslar* için uygun olan MRS Broth besi yerinde substrat olarak kullanılan ürik aside adapte edilmiş bakteri formu kullanıldı. Her iki form için ayrı bakteri biyosensörleri hazırlandı ve değişen ürik asit konsantrasyonlarına karşılık bu biyosensörlerin verdikleri cevaplar karşılaştırıldı. Liyofilize *L.casei* formunun uygun olduğu belirlendi.

Bu bakterilerin her biri için 200 µl 150 mM pH: 8 fosfat tamponu içinde 10 mg bakteri, 10 mg jelatin olacak şekilde ve % 0.5'lik glutaraldehit ile ayrı ayrı biyosensörler hazırlandı ve ürik asidin 10-40 mM konsantrasyonları aralığında her biri için ölçümler alındı. Liyofilize *L.casei* formu ile yapılan ölçümlerde artan substrat konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artan ve tekrarlanabilen biyosensör cevapları alındı. Yapılan gözlemler ve sonuçlar karşılaştırılarak ürik asit tayini için uygun bakteriye karar verildi. Uygun bakteri olarak liyofilize *L.casei* formu seçildi. Bundan sonraki denemelerde bakteriyal esaslı biyosensörün biyoaktif tabakası bu bakteri kullanılarak hazırlandı.

#### 4.1.2. Bakteri miktarının biyosensör cevabına etkisi

Bakteri miktarının optimizasyonu için 200 µL 150 mM pH: 8 fosfat tamponu içinde 10 mg, 20 mg ve 40 mg bakteri içeren biyosensörler hazırlandı. Ölçümler belirlenen optimum pH, optimum sıcaklık ve optimum tampon konsantrasyonunda gerçekleştirildi. Bakteri miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi Şekil 4.1'da gösterilmektedir.

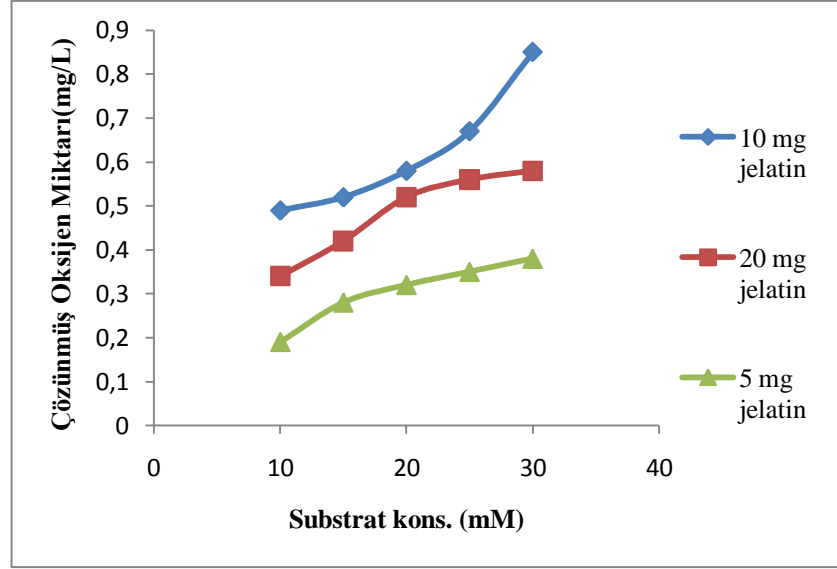


**Şekil 4.1.** Biyosensör cevabı üzerine bakteri miktarının etkisi

Bakteri miktarının optimizasyonu için alınan ölçümlerde 40 mg bakteri ile hazırlanan biyosensörde difüzyon engelinden dolayı elektrotta yüklemeye fazlası oldu. 10 mg ve 20 mg bakteri ile hazırlanan biyosensörlerde ise başlangıçta yakın cevaplar alındı ama substrat konsantrasyonu arttıkça 20 mg bakteri içeren biyosensör substrata doyduğundan sabit değerler vermeye başladı. 10 mg bakteri içeren biyosensörle ise substrat konsantrasyonu artışıyla doğru orantılı bir grafik elde edildi. En iyi biyosensör cevabı veren 10 mg bakteri optimum bakteri miktarı olarak belirlendi. Bundan sonraki denemelerde bakteri miktarı olarak 10 mg kullanıldı.

#### 4.1.3. Jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi

Jelatin miktarının optimizasyonu için 200 µl 50 mM pH: 7.5 fosfat tamponu içinde optimum bakteri miktarı olarak belirlenen 10 mg bakteri ve 5 mg, 10 mg, 20 mg jelatin içeren biyosensörler % 0.625'lik glutaraldehit çözeltisi kullanılarak hazırlandı. Ölçümler belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirildi ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.2'de grafik olarak verildi.



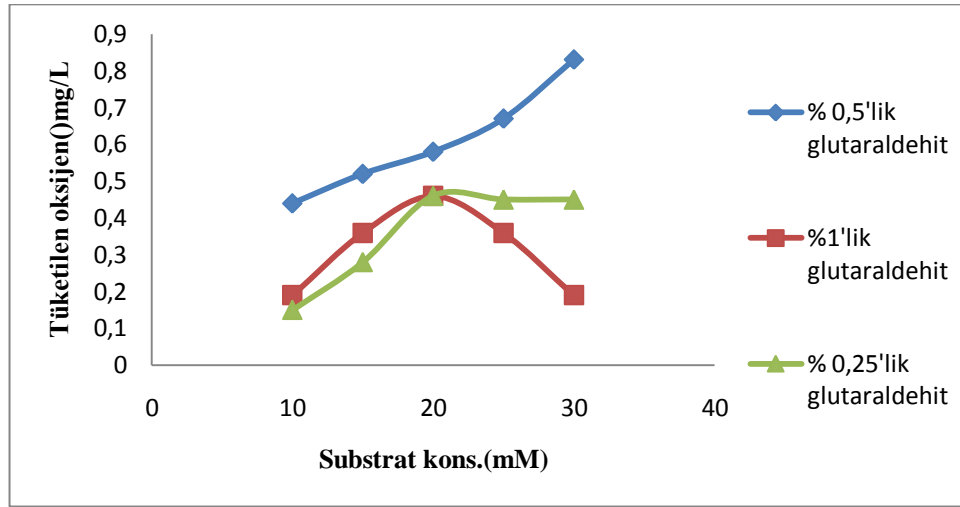
**Şekil 4.2.** Biyosensör cevabı üzerine jelatin miktarının etkisi

Jelatin miktarının optimizasyonunda 5 mg jelatin ile hazırlanan biyosensörde difüzyon engeli diğerlerine göre daha az olduğundan düşük konsantrasyonlar için yüksek biyosensör cevabı verdi ama konsantrasyon artışıyla doğru orantılı bir artış gözlenmedi. Jelatin miktarı çok düşük olduğu için de fiziksel olarak dayanıklı bir biyoaktif tabaka hazırlanamadı. 20 mg jelatin ile hazırlanan biyosensörün biyoaktif tabakası daha dayanıklıydı ama 10 mg ile hazırlanan biyosensör substrat konsantrasyonuyla doğru orantılı ve daha yüksek biyosensör cevabı verdi. Bu nedenle optimum jelatin miktarı 10 mg olarak belirlendi ve bundan sonraki denemelerde jelatin miktarı 10 mg olarak kullanıldı.

#### 4.1.4. Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi

Glutaraldehit yüzdesinin optimizasyonu için 200 µl 50 mM pH: 7.5 fosfat tamponu içinde optimum olarak belirlenen 10 mg bakteri ve 10 mg jelatin içeren biyosensörler farklı yüzdelerdeki glutaraldehit çözeltileri ile hazırlandı. Bu amaçla % 0.25'lik, % 0.5'lik ve % 1'lik glutaraldehit çözeltileri kullanıldı. Ölçümler belirtilen

optimum koşullarda gerçekleştirildi ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.3'de grafik olarak verildi.



**Şekil 4.3.** Biyosensör cevabı üzerine glutaraldehit yüzdesinin etkisi

Glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisini belirlemek için alınan ölçümlerde % 0.25'lik glutaraldehit ile hazırlanan biyoaktif tabaka fiziksel olarak dayanıksızdı. % 1'lik glutaraldehit ile hazırlanan biyosensörde çapraz bağlanma oranının fazla olmasından dolayı difüzyon engeli nedeniyle daha düşük biyosensör cevapları verdi. Daha dogrusal biyosensör cevapları veren % 0.5'lik glutaraldehid optimum olarak belirlendi. Bundan sonraki denemelerde çapraz bağlayıcı ajan olarak % 0.5'lik glutaraldehid çözeltisi kullanıldı.

## 4.2. Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonuna İlişkin Bulgular

### 4.2.1. Optimum pH

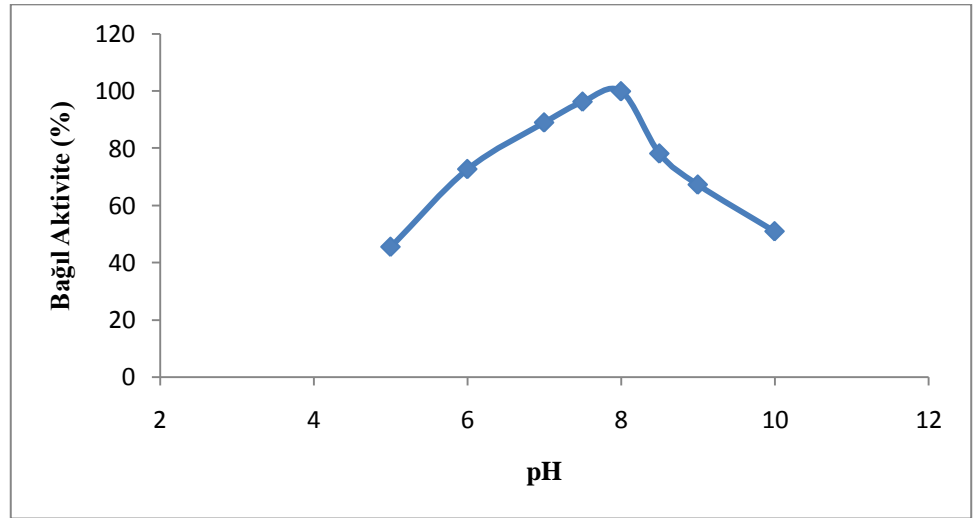
pH: 5-8 arasında 50 mM Fosfat tamponları ve pH: 8.5-10 arasında 50 mM Glisin tamponları hazırlandı. pH: 8.5-10 arasında Tris-HCl tamponu hazırlandığında biyoaktif

tabaka eridiğinden dolayı bu tampon biyosensörün çalışması için uygun bulunmadı ve bu pH aralığı için glisin tamponu hazırlandı.

Ölçümler için 200 µl 50 mM pH'ın değişen fosfat tamponları içinde 10 mg bakteri, 10 mg jelatin olacak şekilde ve % 0.5'lik glutaraldehit kullanılarak bir biyosensör hazırlandı. Ürik asit konsantrasyonu 25 mM, çalışma sıcaklığı 37.5 °C olarak kullanıldı. Optimum biyosensör cevabı pH: 8 olarak belirlendi.

pH: 8'deki biyosensör cevabı % 100 olarak kabul edildi. pH 8 ile karşılaştırıldığında pH 7.5 ve pH 8.5'teki oksijen tüketim oranı sırasıyla % 72.54 ve % 88.42 olarak belirlendi.

Daha yüksek ve daha düşük pH'larda ise daha düşük biyosensör cevapları alındı. Bundan sonraki denemelerde pH: 8 fosfat tamponu kullanıldı. Biyosensör cevabı üzerine pH'ın etkisine ait grafik Şekil 4.4'te görülmektedir.



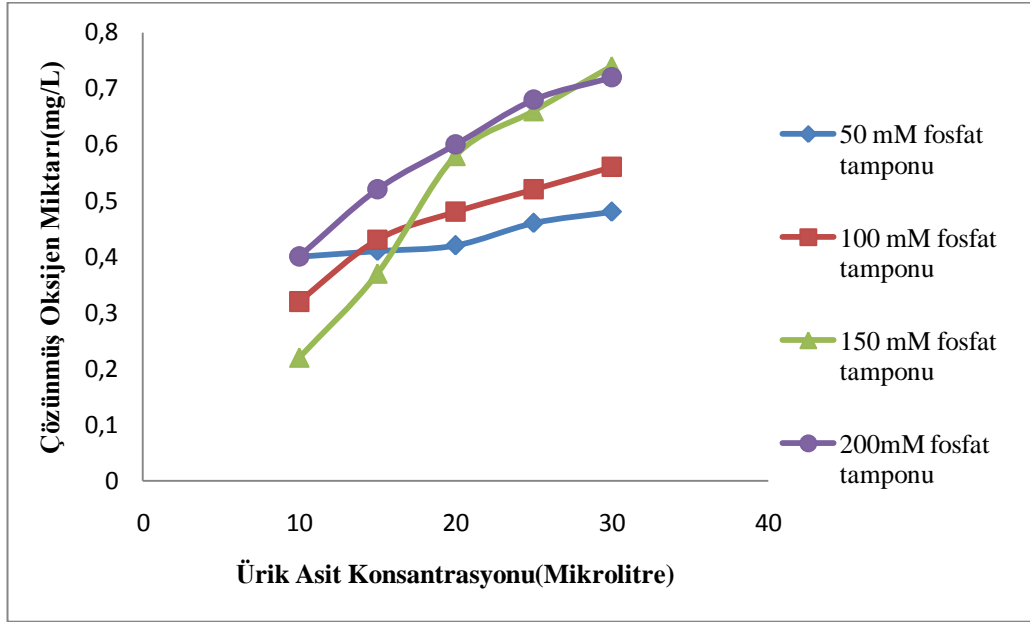
**Şekil 4.4.** Biyosensör cevabı üzerine pH'ın etkisi

#### 4.2.2. Optimum tampon konsantrasyonu

pH optimizasyonu çalışmalarından uygun pH ve uygun tampon cinsi pH 8.0 fosfat tamponu olarak belirlendikten sonra bu tampon sisteminin hangi konsantrasyonları ile çalışıldığında en iyi biyosensör cevaplarının alınacağını belirlemek amacıyla en uygun tampon konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik çalışmalara geçildi.

Bu amaç doğrultusunda 50 mM, 100 mM, 150 mM ve 200 mM pH: 8.0 fosfat tamponları hazırlandı. Hazırlanan konsantrasyonlardaki tamponların substrat konsantrasyonuna karşı biyosensör cevapları Şekil 4.5'te gösterilmektedir.

Ölçümler sırasında 200 µl 50 mM pH: 8 fosfat tamponu içinde 10 mg bakteri, 10 mg jelatin olacak şekilde ve % 0,5'lik glutaraldehit kullanılarak bir biyosensör hazırlandı. Çalışma tamponu pH: 8.0 fosfat tamponu, çalışma sıcaklığı 37.5 °C kullanıldı.



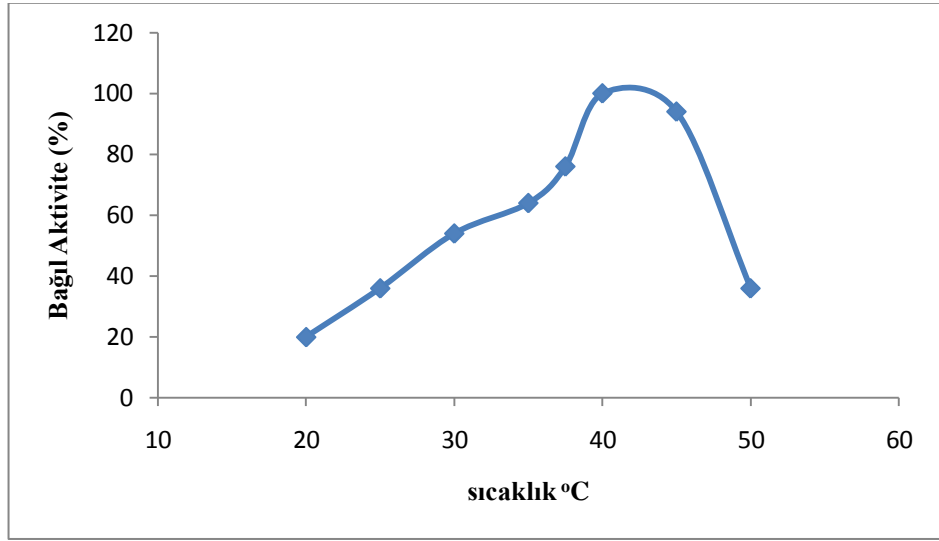
Şekil 4.5. Biyosensör cevabı üzerine tampon konsantrasyonunun etkisi



Optimum tampon konsantrasyonu Şekil 4.5'ten de görülebileceği gibi ilk dört ölçümü doğrusal biyosensör cevabı veren 150 mM fosfat tamponu (pH: 8.0) olarak belirlendi ve bundan sonraki çalışmalarda çalışma tamponu olarak 150 mM pH: 8.0 fosfat tamponu kullanıldı.

#### 4.2.3. Optimum sıcaklık

Ölçümler 200 µl 150 mM pH: 8 fosfat tamponu içinde 10 mg bakteri ve 10 mg jelatin olacak şekilde % 0.5'lik glutaraldehit ile hazırlanmış biyosensörle ürik asidin 25 mM konsantrasyonu için gerçekleştirildi. Şekil 4.6'te biyosensör cevabı üzerine sıcaklığın etkisi gösterilmektedir. En iyi biyosensör cevabı 40 °C'de ölçüldü ve grafikte biyosensör cevabı % 100 olarak kabul edilerek diğer sıcaklıklar içinde biyosensör cevapları % bağıl aktivite cinsinden verildi.



Şekil 4.6. Biyosensör cevabı üzerine sıcaklığın etkisi

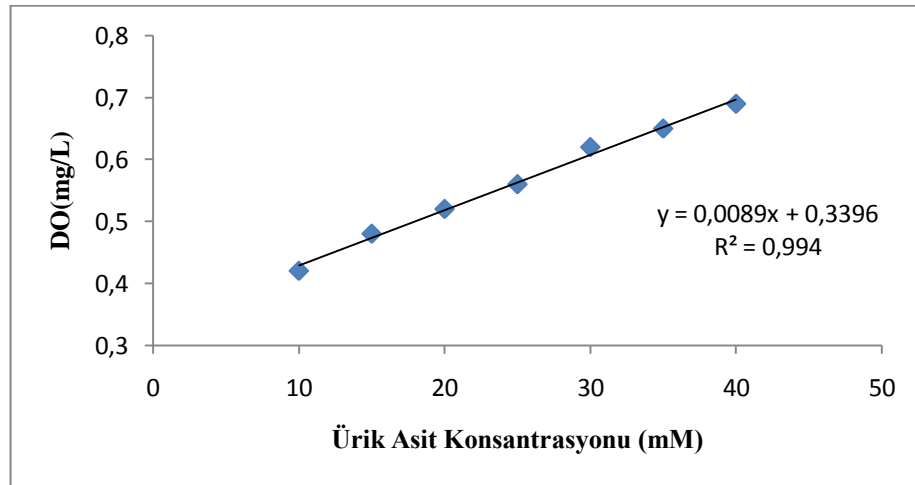
Şekil 4.6'te de görüldüğü gibi sıcaklığın 40 °C'ye artmasıyla biyosensör cevabının da arttığı ve bu dereceden sonra düştüğü gözlemlendi. Bu, sonuç olarak enzim aktivitesi ve sıcaklık ilişkisinin önemli bir prensibidir. Sıcaklık artışıyla paralel olarak

çözünmüş oksijen konsantrasyonunda da azalma dolayısıyla biyosensör cevabında düşme beklenirken 40 °C'ye kadar artış kaydedilmesi enzim aktivitesinin optimum sıcaklığa kadar artış göstermesiyle, 40 °C'den daha yüksek sıcaklıklarda biyosensör cevabında düşme gözlenmesini ise optimum sıcaklığın aşılmasıyla birlikte gerek enzim aktivitesinde ve gerekse sıcaklık artışıyla çözünmüş oksijen konsantrasyonundaki azalmayla açıklamak mümkündür. Ancak çalıştığımız bakteriler sıcaklığa dayanıklı olduğu için yüksek sıcaklıklarda çok fazla aktivite kaybı gözlenmedi. Sonuç olarak çalışma sıcaklığı 40 °C olarak belirlendi ve bundan sonraki denemelerde bu sıcaklıkta çalışıldı.

### 4.3. Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular

#### 4.3.1. Ürik asit için doğrusal ölçüm aralığı

Belirlenen optimum koşullarda hazırlanan bakteriyel esaslı biyosensör ile ürik asidin belirlenebileceği tayin aralığının tespit edilmesi için standart olarak kullanılan ürik asidin farklı konsantrasyonlarında ölçümler alındı. Bu ölçümler arasında doğrusal bir eğri veren 10 – 40 mM ürik asit konsantrasyonu aralığı ürik asidin tayin sınırı olarak belirlendi. Geliştirilen bu bakteriyel esaslı biyosensörün doğrusal ölçüm aralığı ürik asidin standart grafiği olarak Şekil 4.7'da verildi.



Şekil 4.7. Ürik asit standart grafiği

#### 4.3.2. Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği

Geliştirilen probiyotik bakteri esaslı biyosensörle yapılan analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi için ürik asidin 10 mM konsantrasyonunda aktivite kaybı olmadan ( $n = 7$ ) ölçümler alındı ve ortalama değer ( $X_{ort}$ ) 10.022 mM; standart sapma (S.D)  $\pm 0,045$  ve varyasyon katsayısı (C.V) % 4.39 olarak hesaplandı.

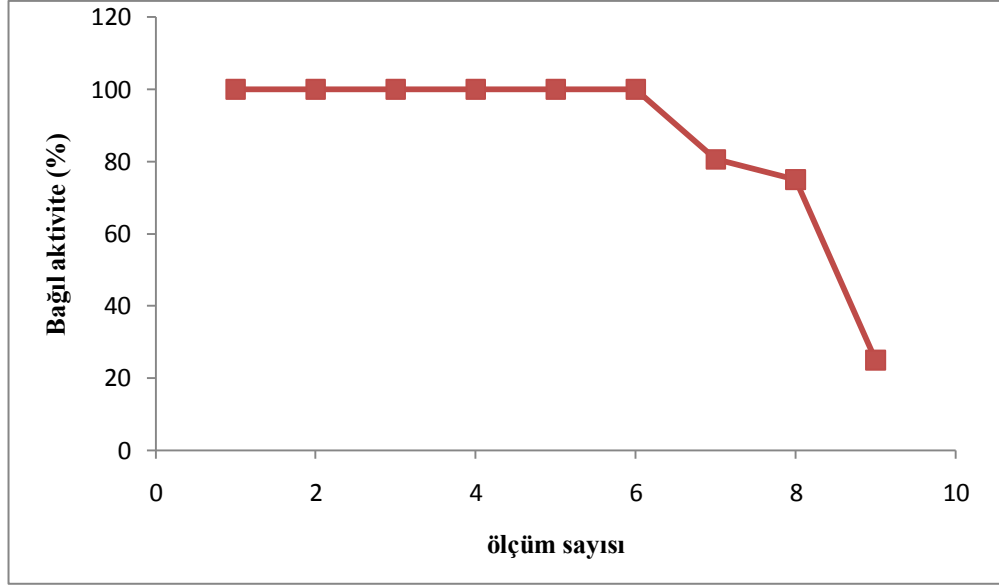
Bir biyosensör sisteminin güvenilebilirliğinin belirlenmesinde standart sapma ve varyasyon katsayıları önemlidir. Bir biyosensör sisteminin kullanılabilir olduğunu söylemek için varyasyon katsayısının % 5'ten küçük olması istenir. Tablo 4.1'de verilen sonuçlardan da görüldüğü üzere elde edilen standart sapma ve varyasyon katsayısı kabul edilebilir sınırlar içerisinde.

**Tablo 4.1.** Standart ürik asit tayini için alınan ölçüm sonuçları

Standart Ürik asit için	Bilinen kons.	Ölçülen kons.	Standart sapma	% Varyasyon katsayısı
	10 mM	10,022 mM	$\pm 0,045$	% 4,39

#### 4.3.3. Operasyonel kararlılık

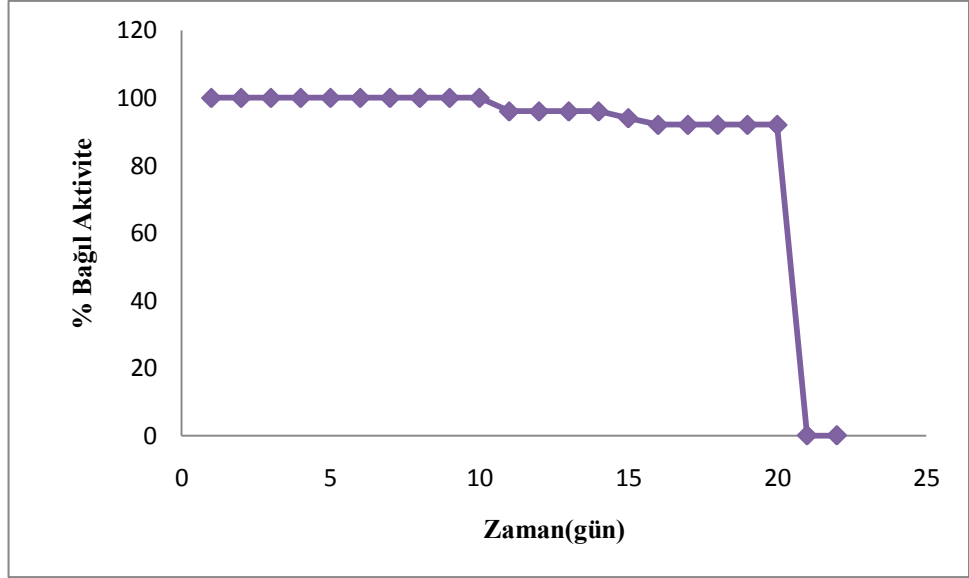
Belirlenen optimum koşullarda hazırlanan bakteriyal esaslı biyosensör ile 25 mM standart ürik asit için arka arkaya 11 kez ölçüm alındı. 6 – 7 ölçümden sonra biyosensör aktivite kaybetmeye başladı. Biyosensör ile alınan ilk ölçümün aktivitesi % 100 olarak kabul edilerek ard arda alınan ölçümlerdeki aktivite kayıpları Şekil 4.8'da gösterilmektedir.



Şekil 4.8. Operasyonel kararlılık

#### 4.3.4. Depo kararlılığı

Geliştirilen bakteriyel esaslı biyosensörün depo kararlılığını belirlemek için optimum koşullarda biyosensör hazırlandı. Bu biyosensör ile 22 gün boyunca standart ürik asidin 25 mM konsantrasyonu için ölçümler alındı ve bu ölçümlerde ilk gün alınan biyosensör cevabı % 100 kabul edilerek Şekil 4.9’de verildi.

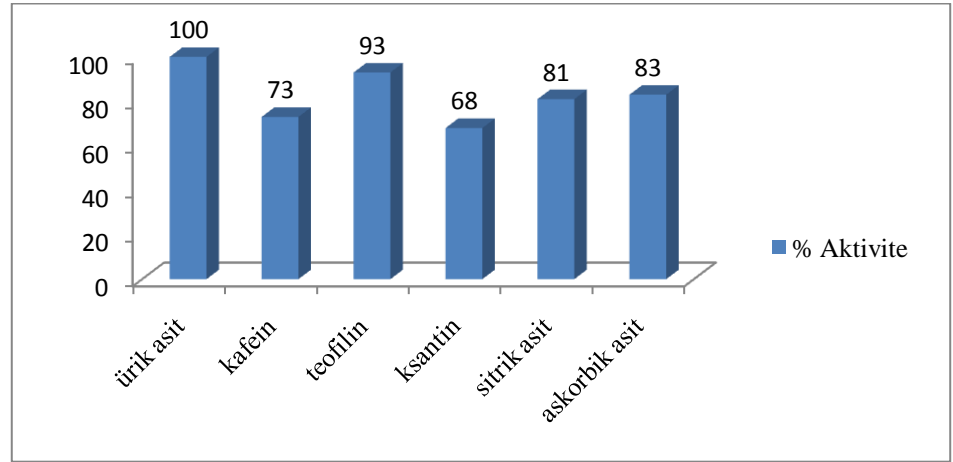


**Şekil 4.9.** Depo kararlılığı

Geliştirilen bakteriyel esaslı biyosensörün depo kararlılığının belirlenmesi için alınan ölçümlerde başlangıçta biyosensörün bekledikçe aktivitesinin az miktarda arttığı gözlemlendi. Bu artışın, biyosensörün biyoaktif tabakasındaki mikroorganizmaların yaşamlarını sürdürebilecekleri ortamda gün geçtikçe adaptasyonlarının artmasına bağlı olduğu düşünüldü. 22 gün boyunca alınan ölçümlerde 9 günden sonra biyosensör aktivite kaybetmeye başladı. 18 gün boyunca aktivitesinin % 80'ini korudu. Ancak 19. günün sonunda hiç cevap vermemeye başladı ve kontrol amaçlı olarak ölçümlere 22. günün sonuna kadar devam edildi ve aynı şekilde hiç cevap vermedi.

#### 4.4. Biyosensörün substrat spesifitesi

Geliştirilen ürik asit biyosensörü ile farklı substratların tayin edilebilirliğini tespit etmek amacıyla, ürik asit dışında kafein, teofilin, ksantin, sitrik asit, askorbik asit olmak üzere 5 farklı bileşik substrat olarak kullanıldı. Her bir substratın 25 mM konsantrasyonunda, 150 mM pH 8 fosfat tamponunda ve 40 °C' de ölçümler gerçekleştirildi. Substrat olarak ürik asit kullanıldığında, biyosensörün alınan cevabı % 100 kabul edilerek, biyosensörün diğer substratlara göstereceği aktivite bağıl olarak karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.10 ' de verildi.



Şekil 4.10. Ürik asit biyosensörü için farklı substrat denemeleri

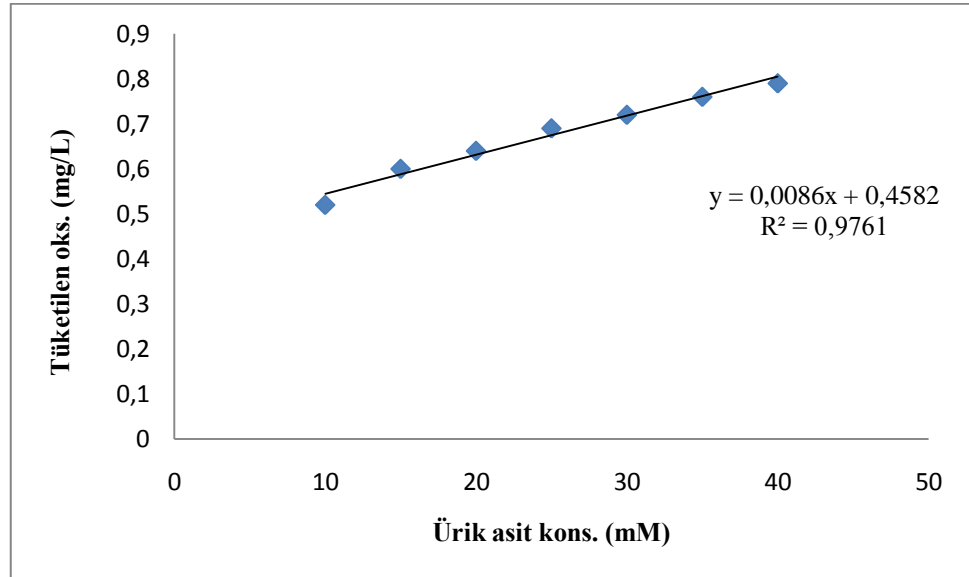
Şekil 4.10' den de görüldüğü üzere, geliştirilen ürik asit biyosensörü kullanılan substratlardan daha yüksek yüksek cevaplar vermiştir. Purin halka yapısındaki ksantin ve kafeine göre ürik asidin daha yüksek cevaplar alınmıştır.

#### 4.5. Çeşitli Örneklerde Ürik Asit Tayini

Geliştirilen bakteriyal esaslı biyosensör ile farklı örneklerde ürik tayininin ne ölçüde mümkün olduğunun belirlenmesi için Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesinden Biyokimya laboratuvarından alınan taze kan ve idrar numuneleri kullanıldı. İçindeki ürik asit seviyeleri belirlenmiş her bir örnek için standart katma yöntemiyle hazırlanan biyosensör ile ürik asit tayinleri yapıldı.

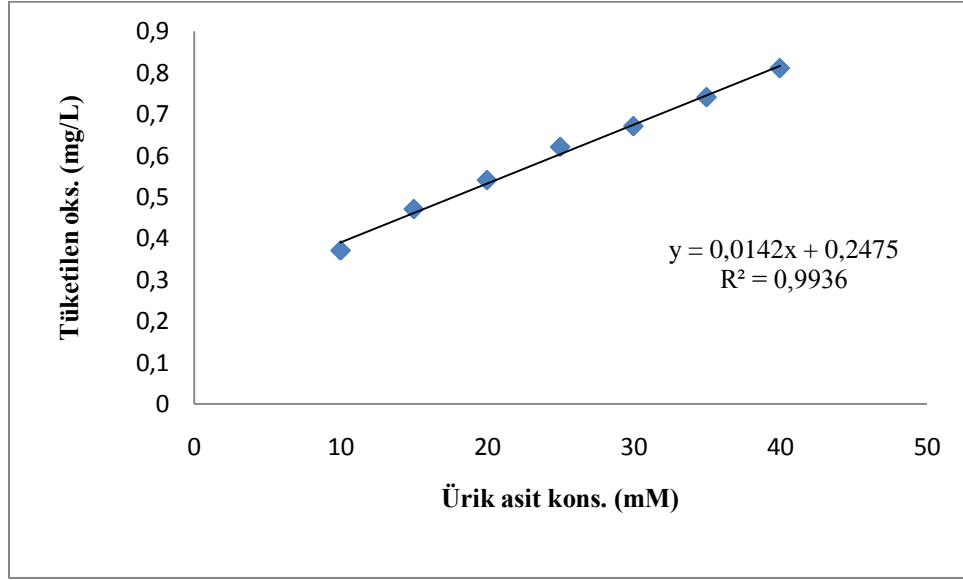
Örnekler, herhangi bir ön işlem yapılmaksızın, direkt olarak kullanıldığında yapılarından dolayı oldukça yüksek bir sinyale neden olmaktadır, dolayısıyla analiz öncesi ön işlemlere gereksinim duyulmaktadır. Bu nedenle her bir örneğe metodlar kısmında belirtildiği oranlarda seyreltmeler yapıldı. Standart katma işlemleri bu oranda seyreltilmiş örnekler üzerine uygulandı.

Ürik asit miktarı belirli olan idrardaki çözülmüş oksijen miktarının lineer grafiği Şekil 4.11’de verilmiştir.



Şekil 4.11. İdrardaki çözülmüş oksijen grafiği

Ürik asit miktarı belirli olan kandaki çözünmüş oksijen miktarının lineer grafiği Şekil 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.12. Kandaki çözünmüş oksijen grafiği

Örnekler seyreltme yapılmadan kullanıldıklarında oldukça yüksek biyosensör cevaplarına neden olmaktadır. Bu nedenle her bir örnek, çeşitli denemeler sonucu bulunan belirli oranlarda seyreltilerek kullanıldı. Seyreltilmiş örneklerle, standart ekleme yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafikleri ürik asidin kalibrasyon grafiği ile uyumludur. Bu durum, ürik asit biyosensörünün incelenen örneklerde ürik asidin tayini için kullanılabilirliğini gösterdi.

Ayrıca biyosensörün optimum çalışma koşullarında idrar ve kan örneklerine ilave edilen ve analiz sonucunda standart grafikler yardımıyla hesaplanan ürik asit standart miktarları, belli bir konsantrasyonda 4 kez tekrarlanan analizlerin sonucu aşağıda Tablo 4.2’de verilmiştir.



**Tablo 4.2.** Çeşitli örneklerde ürik asit tayini

Örnek	Eklenen miktar (mM)	Ölçülen miktar (mM)	Standart sapma
İdrar (9.34mg/dL)	0.5	0.87	± 0.04
	1	2.11	± 0.07
İdrar (17.90 mg/dL)	0.5	1.72	± 0.12
	1	3.09	± 0.44
İdrar ( 37.5 mg/dL)	0.5	1.09	± 0.37
	1	2.56	± 0.24
Kan(6.9 mg/dL)	0.5	1.41	± 0.03
	1	2.61	± 0.08

## 5. SONUÇLAR VE TARTISMA

Ürik asidin çeşitli örneklerde tayini için probiyotik bakteri esaslı biyosensör hazırlanmasında liyofilize bakteri formu *Lactobacillus casei* probiyotik bakterisi kullanıldı.

Biyosensör geliştirmede biyoajan olarak mikroorganizmaların kullanıldığı birçok literatür bulunmaktadır. *Lactobacillus* bakterileri kullanılarak hazırlanmış biyosensör çalışmalarına ise literatürlerde çok az sayıda rastlanmıştır. *Lactobacillus casei* bakterilerinin kullanıldığı bir literatüre rastlanılmadığı için sonuçların karşılaştırılması çeşitli amperometrik esaslı literatürlere göre yapılmıştır.

Biyosensörün biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonu için sırasıyla bakteri miktarı, jelatin miktarı ve glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevapları üzerine etkisi incelendi.

Bakteri miktarının optimizasyonu için alınan ölçümlerde 40 mg bakteri ile hazırlanan biyosensörde difüzyon engelinden dolayı elektrotta yükleme fazlası oldu. 10 mg ve 20 mg bakteri ile hazırlanan biyosensörlerde ise başlangıçta yakın cevaplar alındı ama substrat konsantrasyonu arttıkça 20 mg bakteri içeren biyosensör substrata doyduğundan sabit değerler vermeye başladı. 10 mg bakteri içeren biyosensörle ise substrat konsantrasyonu artışıyla doğru orantılı bir grafik elde edildi. En iyi biyosensör cevabı veren 10 mg bakteri optimum bakteri miktarı olarak belirlendi. Bundan sonraki denemelerde bakteri miktarı olarak 10 mg kullanıldı.

Akyılmaz ve Dinçkaya'nın (2004) geliştirdikleri biyosensörde biyoajan olarak kullanılan hücrelerinin 5, 10, 20 mg miktarlarının biyosensör cevapları üzerine etkileri incelenmiştir. Optimum bakteri miktarı olarak 10 mg olarak rapor edilmiştir.

Jelatin miktarının optimizasyonunda 5 mg jelatin ile hazırlanan biyosensörde difüzyon engeli diğerlerine göre daha az olduğundan düşük konsantrasyonlar için yüksek biyosensör cevabı verdi ama konsantrasyon artışıyla doğru orantılı bir artış gözlenmedi. Jelatin miktarı çok düşük olduğu için de fiziksel olarak dayanıklı bir biyoaktif tabaka hazırlanamadı. 20 mg jelatin ile hazırlanan biyosensörün biyoaktif tabakası daha dayanıklıydı ama 10 mg ile hazırlanan biyosensör substrat konsantrasyonu ile doğru orantılı ve daha yüksek biyosensör cevabı verdi. Bu nedenle optimum jelatin miktarı 10 mg olarak belirlendi ve bundan sonraki denemelerde jelatin miktarı 10 mg olarak kullanıldı.

Scardi (1987), enzimlerin ve bakteriyal hücrelerin jelatine immobilizasyonunu incelediği bir çalışmada immobilizasyon için jelatinin uygun bir materyal olduğunu rapor etmiştir. Biyosensörlerin biyoajanlarının immobilizasyonu için jelatinin kullanıldığı birçok literatüre rastlanmıştır. Bu literatürlerden etanol tayini için *candida tropicalis* hücrelerinin kullanıldığı oksijen elektrot esaslı bir biyosensörde 200 µl biyoaktif tabaka için optimum jelatin miktarı 5 mg olarak belirlenmiştir (Akyılmaz ve Diçkaya, 2004).

Glutaraldehit yüzdesinin optimizasyonu için, % 0.25'lik, % 0.5'lik, % 1'lik glutaraldehit çözeltileri kullanıldı. % 0.25'lik glutaraldehit ile hazırlanan biyoaktif tabaka fiziksel olarak dayanıksızdı. % 1'lik glutaraldehit ile hazırlanan biyosensörde çapraz bağlanma oranının fazla olmasından dolayı difüzyon engeli nedeniyle daha düşük biyosensör cevapları elde edildi. Daha doğrusal biyosensör cevapları veren % 0.5'lik glutaraldehid optimum değer olarak belirlendi.

Biyosensörde immobilize haldeki liyofilize bakterinin, pH: 8 fosfat tamponlu ortama değişen miktarda eklenen substratla karşılaşmaları zamana yayılmıştır.

Bakterilerin içerdiği enzimlerin substratın ürüne dönüşümünü hızlı katalizlemesi, buna bağlı olarak O<sub>2</sub> tüketiminin doğrusal artışı, belli konsantrasyon aralığında doğru ölçümü mümkün kılmaktadır.

Biyosensörün pH optimizasyonu için; pH: 5.0; 6.0; 7.0; 7.5; 8.0 olan 50 mM Fosfat tamponları ve pH: 8.5; 9.0; 10.0 olan 50 mM Tris-HCl ve Glisin tamponları hazırlandı. pH: 8.5-10 arasında Tris-HCl tamponu hazırlandığında biyoaktif tabaka eridiğinden kullanılmadı ve bu pH aralığı için Glisin tamponu kullanıldı. Optimum biyosensör cevabı pH: 8'de elde edildi ve optimum pH 8.0 olarak belirlendi.

Jian-Bo vd'nin (2006), askorbik asitin varlığında ürik asitin amperometrik kararlılığı için modifiye kuersetin ile hazırladıkları bir biyosensör ile yaptıkları bir çalışmada optimum pH'ı 8.0 olarak bildirmişlerdir.

Akyılmaz vd'nin (2002) urat oksidaz ve peroksidaz enzimi esaslı biyosensörde optimum pH'ı 7.5 bulduğu bildirilmiştir.

Arslan (2008), polianilin-polipirol filmde immobilize edilmiş ürikazdan hazırlanan amperometrik biyosensör ile yaptığı çalışmada pH'ı 7.5-8 arasında bulunduğu bildirilmiştir.

Tampon konsantrasyonunun optimizasyonu için 50 mM, 100 mM, 150 mM ve 200 mM pH:8.0 fosfat tamponları hazırlandı. Hazırlanan biyosensör ile alınan ölçümlerde en iyi biyosensör cevabı 150 mM'lık fosfat tamponu (pH: 8.0) ile sağlandı.

Jimenez ve Alderete (2005), immobilize ürikazın bir yumurta kabuğu zarını kullanırken ürik asit biyosensöründe pH 8,0 fosfat tamponu uygun sonuçlar veren 200 mM fosfat tamponu olarak rapor edilmiştir.

Biyosensörün sıcaklık optimizasyonu için 20; 25; 30; 35; 37.5; 40; 45; 50 °C'de alınan ölçümlerden en iyi biyosensör cevabının 40 °C'de elde edildiği görüldü. Sıcaklık artışıyla paralel olarak çözülmüş oksijen konsantrasyonunda da azalma dolayısıyla

biyosensör cevabında düşme beklenirken 40 °C'ye kadar artış kaydedilmesi enzim aktivitesinin optimum sıcaklığa kadar artış göstermesiyle, 40 °C'den daha yüksek sıcaklıklarda biyosensör cevabında düşme gözlenmesi ise optimum sıcaklığın aşılmasıyla birlikte gerek enzim aktivitesinde ve gerekse sıcaklık artışıyla çözünmüş oksijen konsantrasyonundaki azalmayla açıklanabilir. Biyosensördeki immobilize bakteriler ile yüksek sıcaklıklarda çok fazla aktivite kaybı gözlenmedi. Bu beklenen bir sonuçtur. İmmobilizasyon işleminin, enzim ve bakterilerin sıcaklık kararlılığını arttırdığı bilinmektedir (Telefoncu, 1999).

Biyosensörün karakterizasyon çalışmalarında belirlenen optimum koşullar kullanıldı. İlk karakterizasyon çalışması ürik asidin ölçüm aralığının belirlenmesi oldu. Substrat olarak kullanılan ürik asit için standart bir grafik elde edildi ve lineer tayin aralığı 10-40 mM olarak belirlendi.

Jian-Bo (2006) askorbik asitin varlığında ürik asidin amperometrik kararlılığı için modifiye kuersetin ile hazırladıkları bir biyosensör ile yaptıkları bir çalışmada tayin sınırı 1-50 mM olarak belirlenmiştir.

Geliştirilen biyosensörün tekrarlanabilirliğinin ve operasyonel kararlılığının belirlenmesi için 10 mM standart ürik asit ile arka arkaya 11 ölçüm alındı. İlk 7 ölçümde hiç aktivite kaybı olmadı. Sonraki ölçümlerde yaklaşık % 20 aktivite kaybı oldu. Ortalama değer ( $X_{ort}$ ) 10.022 mM; standart sapma (S.D)  $\pm 0.045$  ve varyasyon katsayısı (C.V) % 4.39 olarak hesaplandı. Varyasyon katsayısının % 5'in altında hesaplanması geliştirilen bu biyosensörün kullanılabilirliğini göstermektedir. Geliştirilen depo kararlılığı çalışmalarında, 22 gün boyunca belirli periyotlarda ölçümler alındı ve ilk 10 gün hiç aktivite kaybı olmadı. 18. gün % 80 aktivite korudu.

Akyılmaz ve Dinçkaya (2002), ürat oksidaz ve peroksidaz enzimi esaslı biyosensörün tekrarlanabilirlik çalışmalarında varyasyon katsayısı % 2.96, depo kararlılığı ise 27 gün olarak rapor edilmiştir.

Geliştirilen biyosensör ile farklı örneklerde ürik asidin tayininin ne ölçüde mümkün olduğunun belirlenmesi için hazırlanan idrar ve kan örnekleri kullanıldı. Bütün örnekler için standart katma yöntemiyle biyosensörle ölçümleri alındı. Tablo 4.2'deki sonuçlar incelendiğinde geliştirilen bu biyosensörün kullanılabilirliği ölçümlerin standart sapmaları dikkate alındığında açık bir şekilde görülmektedir.

Geliştirilen probiyotik bakteri esaslı biyosensörün biyoaktif tabakasında doğal enzim kaynağı olarak kullanılan liyofilize formda ki *L. casei*. bakteri formun kullanılması, biyosensörün hazırlanmasında bakterinin büyütülmesi, sterilizasyonu, besi yerinden izolasyonu gibi ön işlemlere gerek duyulmaması ve bu işlemlerden kaynaklanabilecek hataları ortadan kaldırdığı için büyük bir avantajdır.

Diğer taraftan biyosensörün biyoajanı olarak doğrudan liyofilize probiyotik bakteri kullanımı: insan sağlığı için patojenik riskin olmaması, hazırlama, kullanım, temizleme, taşıma, depolama kolaylıkları, zaman ve maliyet ekonomisi bakımından çok avantajlı bir biyosensör hazırlamasına imkân sağlar.

Bunun yanında, çok küçük miktarlarda bakteri kullanılarak, az miktardaki örneklerde bile 10-40 mM aralığında ürik asit tayininin yapılabildiği bir biyosensör geliştirilmiştir.

Çalışmanın devamında, geliştirilen biyosensör ile kan ve idrar örneklerinde ürik asidin hassas tayinleri için başarı ile kullanılması yanında, kan, idrar gibi vücut sıvılarındaki ürik asit tayinlerinde kullanım çalışmaları düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

**Akyılmaz E., Sezgintürk E., Dinckaya M.K., 2003,** A biosensor based on urate oxidase -peroxidase coupled enzyme system for uric acid determination in urine *Talanta*, 73-79.

**Akyılmaz E., Yasa İ., Dinçkaya E., 2006,** Whole Cell Immobilized Amperometric Biosensor based on *Saccharomyces cerevisiae* for Selective Determination of Vitamin B1 (thiamine), *Analytical Biochemistry*, (354), 78-84.

**Arslan F., 2008,** An Amperometric Biosensor for Uric Acid Determination Prepared From Uricase Immobilized in Polyaniline-Polypyrrole Film

**Aykut U. ve Temiz H., 2006,** Biyosensörler ve Gıdalarda Kullanımı, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, (3), 51-59.

**Bahçeci Z., 1999,** Moleküler biyoloji, 30-39

**Bozdoğan D., 2006,** Probiyotikler, Gazi Üniversitesi, Ankara.

**Cappola T.P., Kass D.A., Nelson G.S. vd. 2001,** Allopurinol improves myocardial efficiency in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 104.

**Chen P.Y. , Vittal R., Nien P.C., Guey-Sheng Liou G.S., Ho K.C., 2010,** A novel molecularly imprinted polymer thin film as biosensor for uric acid., *Talanta*, 1145-1151.

**Çete, S., Yasar, A., Arslan, F., 2006,** An amperometric biosensor for Uric acid determination prepared from uricase immobilized in polypyrrole film. *Artif. Cell Blood Subs.*, 34, 367-380.

**Çon A. H. ve Gökalp H. Y., 1997,** Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Metabolitleri ve Etki şekilleri, Türk mikrobiyolog cemiyeti dergisi, (30), 180-190.

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

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

**Doillet P. A. ve Langdon C. J., 1994,** Use of a Probiotic for the Culture of Larvae of Pacific Oyster (*Crassostrea gigas* Thurnberg), Aquaculture, (119), 25-40.

**Dobay R., Harsányi G., and Visy C., 1999,** “Detection of uric acid with a newtype of conducting polymer based enzymatic sensor by bipotentiostatic technique,” *Anal. Chim. Acta*, 187–194.

**D’Souza S. F., 2001,** Microbial Biosensors: Review, Biosensors and Bioelectronics, (16), 337-353.

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

**Frebel H., Chemnitiu G.C., Cammann K., Kakerow R., Rospert M. and Mokwa W., 1997,** “Multianalyte sensor for the simultaneous determination of glucose, L-lactate and uric acid based on a microelectrode array,” *Sens. Actuators B*, 43, 87–93.

**Guerrieri vd., 1998** A. Guerrieri, G.E. De Benedetto, F. Palmisano and P.G. Zambonin, *Biosens. Bioelectron.*, 103–112.

**Guilbault G. G., Kauffmann J.M., 1987,** Enzyme-based Electrodes as Analytical Tools, Biotechnology and Applied Biochemistry, (9), 95-113.



**Harper H.A., 1977,** Review of Physiological Chemistry, 16, Lange Medical, San Francisco, 406–410.

**İnanç N., Şahin H., Çiçek B., 2005,** Probiyotik ve Prebiyotiklerin Sağlık Üzerine Etkileri, Erciyes Tıp Dergisi, 27(3), 122-127.

**Jian-Bo He vd, 2007,** A quercetin-modified biosensor for amperometric determination of uric acid in the presence of ascorbic acid, China, 337–343.

**Jimenez and Alderete, 2005** V. Jimenez and J.B. Alderete, *J. Mol. Struct.-Theochem.*, 209–214.

**Johnson R.J., Andrews P., Benner S.A., Oliver W., 2010,** The evolution of obesity: insights from the mid-miocene. Theodor E. Woodward Award. Transactions of the American Clinical and Climatological Association, 121, 295-308.

**Johnson R.J., Sautin Y.Y., Oliver W.J. 2005,** Uric acid, evolution and primitive cultures. *Semin Nephrol*, 3-8.

**Kan et al., 2004** J. Kan, X. Pan and C. Chen, *Biosens. Bioelectron.*, 1635–1640.

**Keha E.E., Küfrevioğlu Ö. İ., 2004,** *Biyokimya*, Erzurum, 197-208.

**Kalaycıoğlu L., Serpek B., Nizamoğlu M., Başpınar N., Tiftik A.M., 2000,** *Biyokimya*, Ankara, 75-140.

**Kuwabata S., Nakaminami T., Ito S., and Yoneyama H., 1998,** “Preparation of amperometric uric acid sensors,” *Sens. Actuators B*, 52, 72–77.

**Kuswandi B., Ratnasari I., Hermanto D. and Gani A. A., 2000,** Optical Chemical Sensors and Biosensor for Detection of Uric Acid in Clinical Samples.

**Liao CW, Chou JC, Sun TP, et al. 2006**, Preliminary investigations on a new disposable potentiometric biosensor for uric acid., 1401-1408.

**Markas A., Gilmartin T., Hart J.P., 1994**, Novel reagentless, amperometric biosensor for uric acid based on a chemically modified screen-printed carbon electrode coated with cellulose acetate and uricase, *Analyst.*, 833–840.

**Miland E., Miranda Ordieres J., Tuñón Blanco P., 1996**, “Poly (o-aminophenol)-modified bienzyme carbon paste electrode for the detection of uric acid,” *Talanta*, vol. 43, 785–796.

**Nanjo M., Guilbault , G.G., 1974**, Enzyme electrode sensing oxygen for uric acid in serum and urine, *Anal. Chem.*, 1769– 1772.

**Pan X., Zhou S., Chen C. and Kan J., 2006**, *Sens. Actuators B*, 329–334.

**Peteu et al., Emerson D. and Worden R.M., 1996**, *Biosens. Bioelectron.* 1059–1071.

**Raab, L.S., Decker, G.L., Jonas, A. J., Kaetzel, M.A., Dedman, J.R., 1991**, Glucocorticoid regulation of rat liver urate oxidase. *J. Cell. Biochem* 47, 18-30.

**Ramanavicius, A., 2007**, Amperometric biosensor for the determination of creatine. *Anal. Bioanal. Chem.*, 387, 1899-1906.

**Oh S., Rheem S., Sim J., Kim S., Baek Y., 1995**, Optimizing Conditions for the Growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in Tryptone-Yeast Extract-Glucose Medium by Using Response Surface Methodology, *Applied and Environmental Microbiology*, (61), 3809–3814.

**Sağıroğlu A., 2003**, *Biyokimya*, Trakya Üniversitesi, Edirne, 82-88.

**Santha H., Member, Dobay R. And Harsanyi G., 2003,** Amperometric Uric Acid Biosensors Fabricated of Various Types of Uricase Enzymes., 282-287.

**Saugstad O.D., 1996,** Role of xanthine oxidase and its inhibitor in hypoxia: reoxygenation injury, *Pediatrics.*; 98, 103-107.

**Scardi V., 1987,** Immobilization of Enzymes and Microbial Cells in Gelatin, *Methods in Enzymology*, (135), 293-294.

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

**Shaolin M., 1994,** “The kinetics of activated uricase immobilized on a polypyrrole film,” *Electrochim. Acta*, 9–12.

**Shaolin M., 1993,** Effect of thiourea on the activity of the polypyrrole uricase electrode and determination of thiourea, *J. Electroanal. Chem.*, 59–66.

**Sun S.Z., Flickinger B.D., Williamson-Hughes P.S., Empie M.W., 2010,** Lack of association between dietary fructose and hyperuricemia risk in adults. *Nutrition & Metabolism* 7:16.

**Uchiyama S. and Sakamoto H., 1997,** “Immobilization of uricase to gas diffusion carbon felt by electropolymerization of anyline and its application as an enzyme reactor for uric acid sensor,” *Talanta*, 1435–1439.

**Uchiyama S., Shimizu H., Hasebe Y., 1991,** Chemical amplification of uric acid sensor responses by dithiothreitol, *Anal. Chem.*, 1873–1876.

**Tannock G. W., 1999,** Probiotics: A Critical Review, Horizon Scientific Press, *Trends in Food Science & Technology*, (10), 113.

**Tsai W.C., Wen S.T., 2006,** Determination of uric acid in serum by a mediated amperometric biosensor ., 891-901.

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

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

**Telefoncu A., 1997,** Immobilize enzimler. Enzimoloji, *Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu, Kusadası*, 193-243.

**Zen J.M., Lai Y.Y., and Yang H.H., 2002,** “Multianalyte sensor for the simultaneous determination of hypoxanthine, xanthine and uric acid based on a preanodized nontronite-coated screen-printed electrode,” *Sens. Actuators B*, 237–244.

**Zhang Y.Q., Shen W.D., Gu R.A., Zhu J., and Xue R.Y., 1998,** “Amperometric biosensor for uric acid based on uricase-immobilized silk fibroin membrane,” *Anal. Chim. Acta*, 123–128.

**Wortmann, 2001 R.L.** Wortmann, Disorders of purine pyrimidine metabolism. In: E. Braunwald, A.S. Fauci, D.L. Kasper, S.L. Hauser, D.L. Longo and J.L. Jameson, Editors, *Harrison's Principles of Internal Medicine* (15th ed.), McGraw-Hill, New York, 2268–2273.

**Wu F.Q., Huang Y.M., 2005,** Li Q Animal tissue-based chemiluminescence sensing of uric acid., 107-113.

## ÖZGEÇMİŞ

06.02.1982 tarihinde Kırklareli’de doğdum. İlköğrenimimi Atatürk İlköğretim Okulunda tamamladım. Orta öğrenimimi Merkez Orta Okulunda tamamladım. 1996 yılında lise öğrenimime başladığım Kırklareli Anadolu Lisesinden 2000 senesinde mezun oldum. 2001 yılında Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesinin Kimya bölümünü kazanarak lisans eğitimime başladım. 2005 senesinde lisans eğitimimi tamamladım.

2006-2007 yılları arasında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Orta Öğretim Kimya Öğretmenliği alanında Tezsiz yüksek lisansımı tamamladım. 2008 yılında Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim dalında yüksek lisans eğitimime başladım.



