

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AMPEROMETRİK NİTRİT
BİYOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

ZEYNEP TÜREDİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

GEBZE
2023

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AMPEROMETRİK NİTRİT
BİYOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

ZEYNEP TÜREDİ
YÜKSEK LİSANSTEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
DOÇ. DR. PINAR ERGENEKON

GEBZE
2023

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**DEVELOPMENT OF THE AMPEROMETRIC
NITRIT BIOSENSOR**

ZEYNEP TÜREDİ

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL ENGINEERING**

THESIS SUPERVISOR
ASSOC. PROF. DR. PINAR ERGENEKON

GEBZE

2023



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19/01/2023 tarih ve 2023/04 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 14/02/2023 tarihinde tez savunma sınavı yapılan ZEYNEP TÜREDİ'nin tez çalışması Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI): Doç. Dr. PINAR ERGENEKON

ÜYE

: Prof. Dr. MELEK ÖZKAN

ÜYE

: Prof. Dr. ELİF ERHAN

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Nitrit biosensörleri; nitritin farklı ortamlardaki konsantrasyonlarını yerinde, hızlı, doğru ve kolay bir şekilde yapılmasına olanak vermesi açısından alternatif olarak çalışılmaktadır. Bu çalışmada, *Escherichia coli*'den elde edilen Nitrit Redüktaz B enziminin camı karbon elektrot yüzeyine elektro polimerize edilmiş polipirol/poliglutaraldehit filmi üzerinden çapraz bağlanması ile yeni bir amperometrik nitrit biyosensörü geliştirilmiştir. Elektropolimerizasyon işlemi polipirol ve poliglutaraldehit içeren bir hücrede, 0.05Vs^{-1} tarama hızında, -1V ile 1.5V (vs. Ag/AgCl) aralığında döngüsel voltametri kullanılarak yapılmıştır. Tüm ölçümler 0.05 M fosfat tampon çözeltisi içinde ve pH 7.1'de gerçekleştirilmiştir. Biyosensörün yanıt süresi ($t_{95\%}$) 10 saniye, hassasiyeti $77.81\text{ mA M}^{-1}\text{ cm}^{-2}$, doğrusal yanıt aralığı 1–3500 μM ($R^2=0.9935$) ve belirleme limiti 2.7 μM olarak hesaplanmıştır.

Daha önce ekibimiz tarafından klonlanan ve karakterize edilen *E. coli* Nitrit redüktaz NirB enzimi ilk kez bu çalışmada bir amperometrik nitrit biyosensörün hazırlanmasında kullanılmıştır. Bu yeni saflaştırılan NirB enzimi, nitrit biyosensörlerinin geliştirilmesinde kullanılabilme potansiyeline sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Nitrit biyosensörü, Nitrit redüktaz, NirB, Amperometrik sensör, Polipirol.

SUMMARY

Nitrite biosensors are studied as an alternative method to measure the nitrite concentrations in situ due to their advantages of measuring quickly, accurately and easily. In this study, a novel amperometric nitrite biosensor was developed by immobilizing nitrite reductase B (NirB) of *Escherichia coli* by cross-linking on electrochemically polymerized polyglutaraldehyde/polypyrrole (PGA/PPy) film on the glassy carbon electrode surface. Electropolymerization was carried out with a cell containing pyrrole and polyglutaraldehyde by cyclic voltammetry between -1V and 1.5V (vs. Ag/AgCl) at scan rate 0.05Vs^{-1} . Measurements were carried out in a 0.05 M phosphate buffer solution. The response time ($t_{95\%}$) of the biosensor was about 10 s and sensitivity was $77.81\text{ mA M}^{-1}\text{ cm}^{-2}$ with linear response range of 1–3500 μM ($R^2=0.9935$) and detection limit calculated as 2.7 μM .

E. coli Nitrite reductase NirB enzyme, which was previously cloned and characterized by our team, was used for the first time in the preparation of an amperometric nitrite biosensor in this study. This newly purified NirB enzyme has the potential to be used in the development of nitrite biosensors.

Key words: Nitrite biosensor, Nitrite reductase, NirB, Amperometric sensor, Polypyrrole.

TEŞEKKÜR

Çalışmam boyunca bana yol gösteren değerli danışmanım Doç. Dr. Pınar ERGENEKON'a, çalışmalarında yardımlarını eksik etmeyen ve her türlü desteği gösteren değerli hocam Prof. Dr. Melek ÖZKAN'a teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan ve beni her zaman destekleyen annem, abim ve kardeşime, ailemden saydığım canım arkadaşlarım Buse DURMAZ, Yunus Emre BALCI, Büşra Nur ÖZTÜRK ve Ebrar Beren ÇEGEN'e, bana en büyük motivasyonu sağlayan okul arkadaşım aynı zamanda iş arkadaşım da olan Hilal Nisanur İBİCİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Değerli Dr. Hilal YILMAZ ve Ar. Gör. Esra MEŞE'ye bilgilerini ve deneyimlerini benden esirgemedikleri ve her zaman yardımcı oldukları için teşekkür ederim.

Tez çalışmamı "Hücre Zarı İyon Spesifik Transport Proteini Kullanımı İle Biyosensör Özelliklerinin İyileştirilmesi" başlıklı 120Z412 numaralı proje kapsamında finanse eden TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1.GİRİŞ	1
2.NİTRİT	2
2.1.Nitritin Çevre ve Sağlık Açısından Önemi	2
2.2.Nitrit Analiz Yöntemleri	2
2.2.1.Spektrofotometrik Yöntemler	2
2.2.2.Kemilüminesans (CL) ve Elektrokemilüminesans (ECL)	3
2.2.3.Kapiler Elektforez (CE)	3
2.2.4.Kromatografi	4
2.2.5.Elektrokimyasal Yöntemler	4
3.BİYOSENSÖRLER	5
3.1.Biyosensör Tanımı ve Kullanım Alanları	5
3.2.Biyosensörlerin Biyobileşene Göre Sınıflandırılması	8
3.2.1.Enzim Biyosensörleri	8
3.2.2.Hücre-Mikrobiyal Biyosensörler	9
3.2.3.Nükleik Asit Biyosensörleri	9
3.2.4.İmmüno-sensörler	10
3.3.Biyosensörlerin Dönüştürücüye Göre Sınıflandırılması	11
3.3.1.Elektrokimyasal Biyosensörler	11
3.3.2.Optik Biyosensörler	13
3.3.3.Kütle Değişimine Dayalı Biyosensörler	13
3.3.4.Isı Değişimine Dayalı Biyosensörler	14
3.4.Enzim Tabanlı Amperometrik Biyosensörler	15

3.4.1.İletken Polimerlerin Kullanılması	16
3.4.2.Enzim Sabitleme Yöntemleri	18
3.4.3.Nitrit Biyosensörlerinde Kullanılan Enzimler	21
3.5.Enzim Tabanlı Nitrit Biyosensör Çalışmaları	23
4.MATERYAL ve METOT	27
4.1.Materyal	27
4.1.1.Kullanılan Kimyasallar	27
4.1.2.Enzim	27
4.1.3.Üçlü Elektrot Sistemi	27
4.2.Metot	28
4.2.1.Çözeltilerin Hazırlanması	28
4.2.2.Çalışma Elektrotunun Hazırlanması	29
4.2.3.Elektrot Yüzeyinin Temizlenmesi	29
4.3.Optimizasyon Çalışmaları	30
4.3.1.Pirolün Elektropolimerizasyon Süresi	30
4.3.2.Pirol Konsantrasyonu	30
4.3.3.pH	30
4.3.4.SDS Konsantrasyonu	31
4.3.5.Glutaraldehitte Bekletme Süresi	31
4.4.Biyosensör Karakterizasyonu	31
4.4.1.Belirleme Limiti	31
4.4.2.Hassasiyet	32
4.4.3.Kararlılık	32
5.BULGULAR ve TARTIŞMA	34
5.1.GCE/PPy/PGA/NirB Çalışma Elektrotuna Ait Film Karakterizasyonu	34
5.2.Optimizasyon Çalışmaları	35
5.2.1.Pirolün Elektropolimerizasyon Süresinin Akıma Etkisi	36
5.2.2.Pirol Konsantrasyonunun Akıma Etkisi	37
5.2.3.pH Değerinin Akıma Etkisi	38
5.2.4.SDS Konsantrasyonunun Etkisi	38
5.2.5.Glutaraldehitte Bekletme Süresi	39
5.3.Tarama Hızı Etkisi	40

5.4.Medyatörün Etkisi	42
5.5.Biyosensör Karakterizasyonu	43
5.5.1.Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması	43
6.SONUÇ	47
 KAYNAKLAR	 50
ÖZGEÇMİŞ	56



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kısaltmalar</u>	<u>Acıklamalar</u>
A	: Amper
Au	: Altın
Ag/AgCl	: Gümüş/Gümüş klorür
E	: Potansiyel
Hb	: Hemoglobin
HRP	: <i>Horseradish peroxidase</i>
Ig	: İmmünoglobulin
M	: Molar
Mb	: Miyoglobin
mV	: Milivolt
NaR	: Nitrat redüktaz
NiR	: Nitrit redüktaz
NOx	: Nitrojen oksit
PPy	: Polipirol
Pt	: Platin
PTh	: Politiyofen
s	: Saniye
V	: Volt
μM	: Mikromolar
CE	: Kapiler elektroforez
CL	: Kemilüminesans
CNT	: Karbon nanotüp
CV	: Döngüsel voltametri
DPV	: Diferansiyel darbe voltametri
ECL	: Elektrokemilüminesans
EIS	: Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
EPA	: Çevre Koruma Ajansı
GCE	: Camsı karbon elektrot
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
ISFET	: İyon seçici alan etkili transistör

LOD	:	Belirleme limiti
MV	:	Metil violojen
MWCNT	:	Çok duvarlı karbon nanotüp
NED	:	N-naphthyl-ethylenediamine
PAH	:	Poli(allilamin hidroklorür)
PBS	:	Fosfat tampon çözeltisi
PGA	:	Poliglutaraldehit
PL	:	Fotoluminesans
PVA	:	Polivinil alkol
SA	:	Sülfanilamid
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
SPR	:	Yüzey plazmon rezonans
SOD	:	Süperoksit dismutaz
ZrPNS	:	Zirkonyum fosfat nano tabaka

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: Biyosensörün bileşenleri.	5
3.2: Scopus’da biyosensörler hakkında yıllık yayınlar.	7
3.3: Biyosensörlerin sınıflandırılması.	8
3.4: Amperometrik biyosensörde yer alan üç nesil.	12
3.5: Bazı iletken polimerlerin kimyasal yapıları.	17
3.6: Enzim immobilizasyon yöntemleri.	18
3.7: Farklı enzimatik nitrit biyosensörlerinin çalışma prensiplerinin gösterimi.	26
4.1: Üçlü elektrot sistemi deney düzeneği.	28
4.2: Kalibrasyon eğrisi ve biyosensör karakteristiğinin şematik gösterimi.	33
5.1: Pirelün elektropolimerizasyonuna ait dönüşümlü voltametri grafiği.	34
5.2: Polipirel/Poliglutaraldehit film tabakası (GCE/PPy/PGA) ve enzim tutuklu (GCE/PGA/PPy/NirB) elektrotların nitrit varlığındaki CV görüntüleri.	35
5.3: Pirelün elektropolimerizasyon süresinin etkisi.	36
5.4: Pirel konsantrasyonunun etkisi.	37
5.5: pH’ın etkisi.	38
5.6: SDS konsantrasyonunun etkisi.	39
5.7: Glutaraldehitte bekletme süresinin etkisi.	40
5.8: GCE/PGA/PPy/NirB elektrodunun çeşitli tarama hızlarında nitrite verdiği yanıtlar.	41
5.9: Metil violojenin nitrit ölçümüne etkisi.	43
5.10: GCE/PGA/PPy/NirBelektrodundan nitrit eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği.	44
5.11: Nitrit kalibrasyon eğrisi.	44
5.12: Elektrotun aynı gün içerisinde farklı setlerde 200 uM nitrite verdiği yanıtlar.	45

TABLÖLER DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Nitrit analiz yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları.	4
3.1: Biyosensörün tarihçesi ve önemli buluşlar.	6
3.2: Enzim immobilizasyon metodlarının avantaj ve dezavantajları.	21
5.1: Protein miktarları.	46
5.2: Enzim tabanlı amperometrik nitrit biyosensörleri literatür bulguları.	46

1. GİRİŞ

Nitrit, gıda ürünlerinin bozulmasını engellemek üzere katkı maddesi olarak kullanıldığından gıda ürünlerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Gıda sanayi dışında tekstil, metal, ilaç gibi diğer endüstrilerde de kullanılan bir ham maddedir. Nitritin hemoglobini bağlama kapasitesi yüksek olduğundan aşırı alımı sonucunda kandaki oksijen taşınım mekanizmasına zarar verir. Bu nedenle nitrit için sınır değerler bulunmaktadır. Son derece kararsız bir form olan nitritin tespit edilmesi, çevre ve insan sağlığına olan zararları göz önüne alındığında son derece önemlidir.

Nitritin analizi için; spektrofotometrik, kemilüminesans, kromatografik, elektrokimyasal ve kapiler elektroforez gibi birçok geleneksel yöntem bulunmaktadır. Ancak bu yöntemlerin yerinde kullanılamama, ekstra sarf maddeler gerektirmesi ve uzun tespit süreleri gibi dezavantajları vardır. Biyosensör teknolojisi çeşitli avantajlarından dolayı nitrit tespitinde sıkça çalışılmıştır. Biyosensörler, hızlı ölçüm, yüksek hassasiyet, düşük tespit limiti ve yerinde kullanım gibi geleneksel ölçüm yöntemlerine göre birçok avantaja sahiptir.

Biyosensör çalışmalarında seçicilik çok önemli bir yere sahiptir ve analiz edilecek analite spesifik olarak seçilebildikleri için enzimler en çok kullanılan biyoreseptörlerdir. Nitrit biyosensörlerinde kullanılan en yaygın enzim nitrit redüktazdır.

Bu çalışmada düşük konsantrasyonlardaki nitrit tespitine yönelik amperometrik bir nitrit biyosensörü geliştirilmiştir. Ekibimiz tarafından daha önce pET28 vektöründe klonlanmış olan *E. coli* NADH bağımlı nitrit redüktaz B (NirB) enzimi biyoreseptör olarak kullanılmıştır. Bu enzim, amperometrik bir nitrit biyosensörünün hazırlanması için ilk kez denenmiştir. Polipirol (PPy), camsı karbon elektrot yüzeyinde poliglutaraldehit (PGA) ile kopolimerize edilmiştir. Glutaraldehit çözeltisi kullanılarak enzimin PPy/PGA film yüzeyine immobilize edilmesi sağlanmıştır. Hazırlanan enzim tabanlı amperometrik nitrit elektrotu tepki süresi, belirleme limiti, tekrarlanabilirlik, girişime karşı direnç gibi temel sensör parametreleri açısından değerlendirilmiş ve karakterize edilmiştir.

2. NİTRİT

2.1. Nitritin Çevre ve Sağlık Açısından Önemi

Nitrit çevrede ve gıda ürünlerinde yaygın olarak bulunur ve inorganik bir kirleticidir. Gıda zehirlenmesine neden olan mikroorganizmaların yayılmasının önlenmesinde ve et ürünlerinin tatlarının iyileştirilmesinde kullanılmaktadır [Wang et al., 2017]. Nitritin tekstil, metal, petrol ve ilaç endüstrilerinde de uygulamaları bulunmaktadır. Nitritin çevreye insan kaynaklı girişi endüstriyel süreçlerle doğrudan olmakla beraber, her türlü yakma işlemi sonucu oluşan nitrojen oksitlerin (NO_x) fotokimyasal dönüşümü ile de gerçekleşir [Almeida et al., 2010]. Denitrifikasyon/nitrifikasyon süreçlerine müdahale ederek biyojeokimyasal nitrojen döngüsünün dengesini bozar. Yakma işlemi ile beraber tarım alanlarına azotlu gübrelerin yoğun şekilde verilmesi fosforlu gübrelerle bağlantılı olarak toprağın, yüzey sularının ve yeraltı sularının kirlenmesine neden olur [Gahlaut et al., 2018]. Nitrit, aminlerle kolayca etkileşime girebilmektedir böylece toksik ve kanserojen nitrosaminleri oluşturmaktadır. Hamile kadınların yüksek miktarda nitrite maruz kalması bebeklerde mavi-bebek sendromuna yol açmaktadır [Titov and Petrenko, 2005], [Zhang et al., 2022]. Nitritin insan vücuduna aşırı alınmasındaki diğer önemli zarar ise nitritin oksihemoglobini methemoglobine dönüştürebilmesi ve böylece kandaki oksijen taşınmasına müdahale etmesidir [Vishnuvardhan et al., 2008]. Nitritin olası zararları göz önüne alındığında yasal sınırlandırmalar zaruri hale gelmiştir. ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA), içme sularında maksimum nitrit iyonlarının kirliliğini 1 mg/L olarak belirlemiştir [Web 1, 2022]. Türkiye’de de İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik’te bu değer 0.5 mg/L olarak verilmiştir.

2.2. Nitrit Analiz Yöntemleri

2.2.1. Spektrofotometrik Yöntemler

Nitritin spektrofotometrik tespiti için en çok kullanılan yöntem Griess testidir. 1879 yılında Griess tarafından ilk uygulamaları gerçekleştirilmiş ve zaman içerisinde bazı değişiklikler yapılmıştır. Bu yöntemin genel prensibi, asidik koşullar altında

nitritin diazonyum katyonu oluşturması için sülfanilamid (SA) ile reaksiyona girmesi ve sonrasında N-naphthyl-ethylenediamine (NED) ile birleşerek mor-pembe renkli bir azo boya üretmesidir. Numunenin 540 nm'deki absorbanşı, numunedeki nitrit konsantrasyonu ile doğrusal orantılıdır [Sun et al., 2003], [Wang et al., 2017]. Griess Assay'in temeli diazo-bağlama reaksiyonu olmakla birlikte, nitrit tayininde nitrozasyon reaksiyonu da uygulanmaktadır. Bu yöntemde nitritin belirlenmesi için nitrozasyon reaksiyonu durumunda renkli ürünler vermek üzere birkaç gösterge türü nitrit ile reaksiyona girer [Wang et al., 2017]. Nitritin, bazı organik boyaların uygun oksitleyici maddelerle oksidasyonu üzerindeki katalitik etkisine dayanan çeşitli katalitik-spektrofotometrik yöntemler de yaygın olarak kullanılmaktadır [Singh et al., 2019].

2.2.2. Kemilüminesans (CL) ve Elektrokemilüminesans (ECL)

Kemilüminesans (CL) metodu, uyarılmış durumdan temel duruma geri geçişin bir sonucu olarak CL reaktiflerinden yayılan optik sinyalin ve ısının emisyonudur. Örneğin nitrit, asidik bir ortamda H₂O₂ tarafından peroksinitröz aside oksitlenir, bu da alkali bir ortamda peroksinitrit anyonuna dönüştürülür ve luminol oksitleyerek CL emisyonu oluştur. Optik Sinyal ve ısı takibi ile ölçüm gerçekleştirilir [Yilong et al., 2015]. CL testi, harici ışık kaynağı olmaması, yüksek hassasiyet, rahat çalışma, hızlı analiz ve kolay otomasyon gibi önemli avantajlara sahiptir ve klinik teşhis, ilaç analizi ve çevresel izlemede yaygın uygulamaları bulunmaktadır [Liu et al., 2016]. Elektrokemilüminesans (ECL) yönteminde, elektrotlara yerleştirilen analitler, yüksek enerjili elektron transferi ile optik sinyaller yayar. ECL sistemleri  sistemin kombinasyonundan elde edilmiştir ve fotolüminesans (PL), CL ve elektrokimyasal gibi geleneksel algılama yöntemlerine göre daha fazla avantaj sağlar [Bhaiyya et al., 2021].

2.2.3. Kapiler Elektroforez (CE)

Katyonik, anyonik ve nötr bileşikleri analiz etmek için kullanılabilen kapiler elektroforez, ilk olarak 1992 yılında klinik uygulamalar için bulunmuş olsa da sonrasında bir çok analitin tespiti için geliştirilmiştir. Kapiler kolonların ana dezavantajı, sınırlı kapasiteleridir. Küçük apı ve kısa optik yolu nedeniyle ultraviyole

(UV) dedektörünün hassasiyeti düşüktür [Moorcroft et al., 2001], [Wang et al., 2017], [Monnig et al., 1994].

2.2.4. Kromatografi

Kromatografi, ayrıştırılmak istenen maddenin, bileşenin sabit bir faza eklenmesi ve bu yüzey üzerinde akan başka bir hareketli faz yardımıyla birbirinden ayrılması esasına dayanır. Kolon kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, jel geçirgenlik kromatografisi, afiniti kromatografisi, kağıt kromatografisi, ince-tabaka kromatografisi, gaz kromatografisi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi bir çok yöntem vardır [Coşkun et al., 2016]. Doğrudan numune analizi, çoğunlukla HPLC ve iyon kromatografi tekniği ile elde edilebilir [Wang et al., 2017], [Moorcroft et al., 2001].

2.2.5. Elektrokimyasal Yöntemler

Elektrokimyasal yöntemler, nitrit iyonlarını akım, potansiyel fark ve impedansa dönüştürerek tayin edilmesine olanak verir. Çok az reaktif maddeye ihtiyaç duyar, numunenin ön işlemi gerekmez ve tasarımı kolaydır [Yilong et al., 2015]. Nitrit analiz yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları Tablo 2.1’de verilmiştir [Sepahvand et al., 2021], [Bellavia et al., 2015].

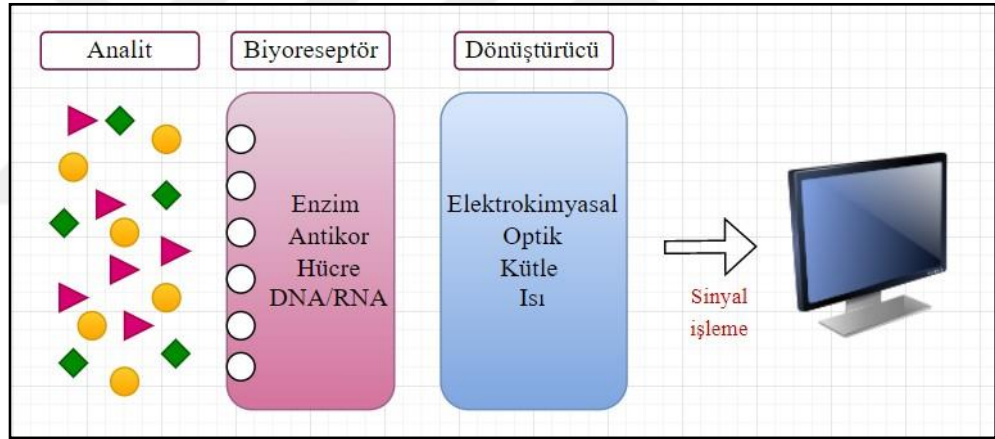
Tablo 2.1: Nitrit analiz yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları.

Yöntem	Avantaj	Dezavantaj
Griess Metodu	Basit ve ucuz uygulama	Kirliliğe duyarlı
Kromatografi	Kısa yanıt süresi, yüksek hassasiyet ve seçicilik	Pahalı ve sıcaklıktan etkilenme
Kemilüminesans	Basit ve ucuz uygulama, geniş tespit aralığı	Düşük kararlılık ve yeniden uygulanabilirlik
Kapiler Elektroferez	Yüksek hassasiyet ve kısa yanıt süresi, düşük hacimde numune ihtiyacı	Pahalı ve girişim yapabilecek maddelerden çabuk etkilenme
Elektrokimyasal Yöntemler	Yüksek seçicilik ve hassasiyet, basit ve ucuz uygulama	Azalan doğruluk

3. BİYOSENSÖRLER

3.1. Biyosensör Tanımı ve Kullanım Alanları

‘Biyolojik sensör’ün kısaltması olan biyosensörler, patojenlerin, proteinlerin ve diğer analitlerin hızlı tespiti için hazırlanmış, taşınabilir ve düşük maliyetli araçlardır. Diğer bir tanımla, biyosensörler, biyolojik sinyalleri ölçen ve bu sinyalleri elektrik sinyallerine dönüştüren cihazlardır (Şekil 3.1). Biyosensörün temel bileşenleri alıcı (receptor), dönüştürücü (transducer) ve sinyal işleme sistemidir. Alıcılar enzim, antikor, oligonükleotid, hücre, doku vb. biyolojik bileşenlerdir ve DNA/RNA, ağır metal, enzim, pestisit gibi analitler ile etkileşime girerek biyokimyasal sinyaller üretirler. Bu sinyaller bir çevirici tarafından elektrik sinyallerine dönüştürülür ve böylece anlaşılması ve analiz edilmesi kolay çıktılar elde edilir.



Şekil 3.1: Biyosensörün bileşenleri.

Biyosensörlerin tarihi Leland Clark’ın 1950 yıllarında kandaki oksijen miktarını bir elektrot vasıtasıyla ölçmesi ile başlamıştır. Clark ve çalışma arkadaşı Champ Lyons 1962 yılında, glikoz oksidaz enzimini bu elektrot ile birleştirerek kandaki glukoz miktarını ölçebilmişlerdir [Clark and Lyons, 1962]. 1969 yılında Guilbault ve Montalvo tarafından üre tespiti için ilk potansiyometrik biyosensör geliştirilmiştir [Guilbault and Montalvo, 1969]. 1970’li yıllarda ise biyosensörlerin ilk prototipleri geliştirilmiştir.

Tablo 3.1’de biyosensörlerin gelişim tarihindeki bazı önemli mihenk taşları verilmiştir.

Tablo 3.1: Biyosensörün tarihçesi ve önemli buluşlar.

1956	İlk oksijen elektrodunun icadı [Heineman and Jensen, 2006]
1962	Glikoz tespiti için ilk amperometrik enzim elektrotunun geliştirilmesi [Clark and Lyons, 1962]
1969	Üre tespiti için ilk potansiyometrik biyosensörün geliştirilmesi [Guilbault and Montalvo, 1969]
1970	İyon seçici alan etkili transistörün (ISFET) bulunması [Bergveld, 1970]
1973	Platin elektrotta hidrojen peroksit tespitine dayalı glikoz ve laktat enzim sensörü geliştirilmesi [Guilbault and Lubrano, 1973]
1974	Enzim termistörünün geliştirilmesi [Mosbach and Danielsson, 1974]
1975	İlk ticari glikoz biyosensörü [Yoo and Lee, 2010]
1975	İlk mikrop tabanlı immünosensör [Suzuki et al., 1975]
1982	İlk glikoz fiber optik biyosensör [Naresh and Lee, 2021]
1983	Yüzey plazmon rezonans (SPR) immünosensörler [Liedberg et al., 1983]
1983	Piezoelektrik algılamaya dayalı ilk immünosensörün geliştirilmesi [Roederer and Bastiaans, 1983]
1984	Amperometrik biyosensörlerde ilk kez medyatör kullanılması [Cass et al., 1984]

Zaman içerisinde biyosensörler, başta tıp ve çevre alanında olmak üzere savunma sanayisi, gıda teknolojisi, nanoteknoloji, genetik mühendisliği gibi bir çok alanda kullanılmaya başlanmıştır.

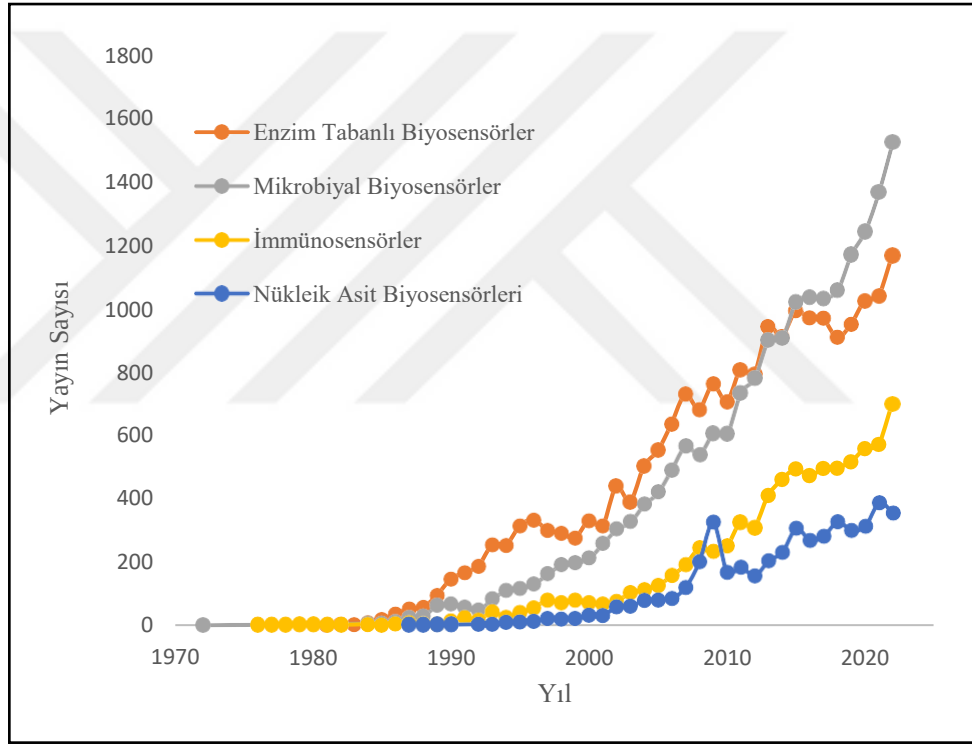
Pestisit, ağır metal gibi kirleticilerin sanayi ve tarım faaliyetleri ile çevreye salınması çevre kalitesini bozmaktadır. Çevreye yayılan ve pek çok hastalığa da sebebiyet veren bu kirleticilerin takibi bir çok geleneksel yöntem ile yapılabilmektedir. Fakat bu yöntemler, sonuçlara ulaşmanın zaman alması, yerinde ölçümlerin yapılamaması, işletme maliyetinin yüksek olması gibi dezavantajlara sahiptir. Biyosensörlerin hızlı ve yerinde analiz yapabilme gibi avantajları; çevredeki kirleticilerin tespiti, suda bulunan patojen mikroorganizmaların tespiti, su kalitesinin izlenmesi gibi çevresel uygulamalarda, biyosensörün önemini ve kullanımını arttırmaktadır.

Gıda güvenliği ve kalitesi, karbonhidrat, aminoasit, vitaminler gibi gıda bileşenlerinin analizlerinde de biyosensörler önemli rol oynamaktadır. Örneğin;

nişasta ve selülozun glikoza hidrolizinin gerçekleşmesiyle gıda selülozu ve nişasta polisakkaritleri, glikoz biyosensörü ile ölçülebilmektedir [Chadha et al., 2022].

Biyosensörler; toksisite, bağlanma afinitesi ve vücuttaki ilaçların etkileşimi hakkında bilgi verir. Kan basıncı, kan şekeri, nabız, vücut ısısı, vücuttaki ağır metallerin konsantrasyonu biyosensörler ile incelenebilmektedir. Aynı zamanda elektrokimyasal sensörler ile ilaçlardan kaynaklanabilecek DNA hibridizasyonunun olup olmadığı da gözlemlenebilmektedir [Sharma et al., 2019].

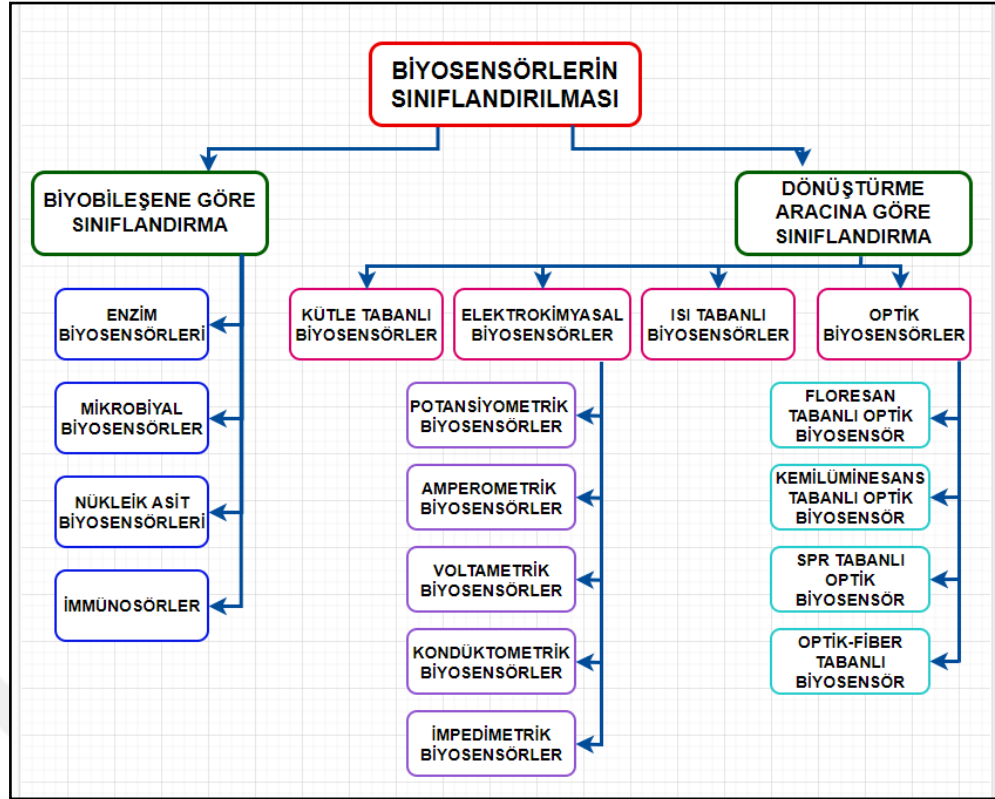
Şekil 3.2, Scopus veritabanındaki biyosensörler ile ilgili çıkarılmış yıllık yayınları göstermektedir. Biyosensörler ve bunlarla ilgili yayınlar yıllar içinde önemli derecede artış göstermiştir.



Şekil 3.2: Scopus’da biyosensörler hakkında yıllık yayınlar.

Biyosensörler, biyo alıcıların doğasına ve kullandığı dönüştürücülerin çalışma prensibine göre iki sınıfta incelenir. Biyo-alıcıların doğasına göre sınıflandırma kendi içerisinde enzim tabanlı biyosensörler, mikrobiyal biyosensörler, immüno-sensörler ve nükleik asit sensörler olarak ayrılır. Dönüştürme aracına göre sınıflandırmada ise biyosensörler elektrokimyasal çeviriciler, ısı değişimli çeviriciler, kütle değişimli çeviriciler ve optik çevirici biyosensörler olarak alt başlıklarda incelenmektedir.

Şekil 3.3’de biyosensörlerin genel sınıflandırması verilmiştir.



Şekil 3.3: Biyosensörlerin sınıflandırılması.

3.2. Biyosensörlerin Biyobileşene Göre Sınıflandırılması

3.2.1. Enzim Biyosensörleri

Enzimler doğal olarak oluşan 20 amino asitten ve yüksek derecede özgüllüğe sahip, biyolojik reaksiyon hızını arttırmada etkili olan biyokatalizörlerdir [Zhu et al., 2019], [Naresh and Lee, 2021]. Enzim ve substrat arasındaki ilişkiye dayalı çalışan biyosensörler enzimatik biyosensörler olarak adlandırılır. Bu tip biyosensörler hedef analite bağlı olarak substrat tespiti ve enzim inhibisyonu olmak üzere iki ana mekanizma üzerine çalışmaktadır. Substrat tespiti, substratın biyosensörün bir parçası olan enzim tarafından dönüştürülmesine dayanır. Enzim inhibisyonu ise inhibitör bileşiklerin varlığında ve yokluğunda enzim aktivitesinin belirlenmesi esasına dayanır [Wang et al., 2014].

Enzimatik biyosensörler, elektrokimyasal, optik veya kalorimetrik dönüştürücüler içerebilir. Elektrokimyasal dönüştürücüler, ilk geliştirilen biyosensörün enzim tabanlı elektrokimyasal biyosensör olması nedeniyle literatürde en yaygın kullanılan tiptir [Asal et al., 2018].

Enzim biyosensörleri tıp, çevre, gıda, tarım ve ilaç endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Uygun maliyetli olmalarına ek olarak, hızlı sonuçlar sundukları bilinmektedir. Bununla birlikte, enzim yapısı son derece hassastır, bu da biyosensörün hassasiyetini, kararlılığını ve tekrarlanabilirliğini geliştirmeyi karmaşık hale getirir [Naresh and Lee, 2021]. İmmobilizasyon tekniği, yapılan enzim biyosensörünün duyarlılığını, seçiciliğini, kararlılığını ve tekrar üretilebilirliğini doğrudan etkileyebilir. Ayrıca enzimlerin biyokatalitik aktivitesi büyük ölçüde çözelti ortamının sıcaklığına ve pH'ına bağlıdır. Tüm bu faktörler, substrat konsantrasyonuna, oksijenin varlığına veya yokluğuna ve enzimin özelliklerine bağlanabilir. Optimum pH ve sıcaklıkta, en yüksek tekrarlanabilirlik ve hassasiyet elde edilir [Zhu et al., 2019].

3.2.2. Hücre - Mikrobiyal Biyosensörler

Tüm hücre biyosensörleri, genel metabolik durumlarını ölçerek tanıma öğeleri olarak bakteri, maya, alg, virüs, mantar ve doku kültürü hücreleri gibi canlı organizmaları kullanır [Wang et al., 2014]. Enzim elektrotlarından daha uzun ömürlülerdir ancak hücre birçok enzim içerdiğinden çok çeşitli analitlerle etkileşime girebilir ve hedeflenen tayin tepkimesinin diğer enzimler tarafından etkilenmesi söz konusu olabilir.

Ağır metaller, pestisitler ve diğer organik kirleticiler dahil olmak üzere çevresel izlemelerde, gıda analizi ve ilaç taramalarında kullanımları bulunmaktadır [Naresh and Lee, 2021].

3.2.3. Nükleik Asit Biyosensörleri

Aptamerler, iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) yapılara yerleşebilen ve belirli hedeflere bağlanabilen sentetik tek sarmallı DNA veya RNA dizileridir. DNA, genetik bilgiyi taşıma ve iletilme işlevine sahip bir tür biyomakromoleküldür. Geniş fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri nedeniyle, biyotanıma elemanı olarak DNA, biyosensör uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır [Wang et al., 2014]. Bu sensörlerin prensibi, hedef DNA ve onun tamamlayıcı sarmalı arasında kendiliğinden hidrojen bağı yoluyla hibridizasyonu sürecinde yatmaktadır [Asal et al., 2018]. Aptamerler nükleik asit karakterinden dolayı, geniş bir sıcaklık ve saklama koşulları aralığında yapısal ve işlevsel olarak kararlıdır. Biyolojik sistemlerce üretilmesi

gereken antikorların aksine, aptamerler kimyasal olarak sentezlenebilir ve 2-12 pH aralığında kararlıdır. Aptamerlerin bir diğer faydası da hedef molekül için tespit kriterlerine göre kimyasal olarak modifiye edilebilmeleridir [Kumar et al., 2019]. Bu biyosensörlerde elektrokimyasal ve optik dönüştürücüler sıklıkla kullanılır [Naresh and Lee, 2021].

Kliniklerde spesifik mutasyonları tespit etmek için DNA tabanlı biyosensörler kullanılmaktadır [Asal et al., 2018]. DNAzim, RNA bölünmesi dahil, peptit bağı oluşumu, polimerizasyon vb. olmak üzere katalitik reaksiyonları gerçekleştirebilen bir tür fonksiyonel nükleik asittir. Bilinen tüm DNAzimler, iyi stabiliteye sahip olan ve uygun maliyetli bir şekilde sentezlenen in vitro seçim ile izole edilir, bu nedenle tanıma elemanı olarak DNAzim, biyo-algılama uygulaması için mevcuttur. Ek olarak, DNAzyme'in doğal katalitik aktivitesi nedeniyle, kofaktör olarak bakır, kurşun gibi metal iyonları katalitik reaksiyonu hızlandırabilir veya reaksiyonun bir inhibitörü olarak görev yapabilir. Dolayısıyla DNAzim biyosensörleri, ağır metal kontaminasyonlarını tespit etme yeteneğine sahiptir [Wang et al., 2014].

3.2.4. İmmünosensörler

Antikorlar, disülfid bağları ile birbirine bağlanan iki ağır ve iki hafif polipeptit zincirinden oluşan “Y” şeklinde immüoglobulinlerin (Ig) yapısına sahiptir. Ağır zincirlerdeki farklılıklara dayalı olarak beş antikor sınıfı tanımlanmıştır: IgG, IgM, IgA, IgD ve IgE. Ligand olarak gömülü bir antikora sahip olan veya antikor-antijen etkileşimi üzerinde işlev gören biyosensörler, immünosensörler olarak adlandırılır. İmmünosensörler, antikor-antijen (Ab-Ag) etkileşimlerinin dönüştürücü sistemi (elektrokimyasal, optik ve piezoelektrik) tarafından ölçülebilir bir sinyale dönüştürülmesi prensibine dayanır. İmmünosensörler; etiketsiz ve etiketli olarak sınıflandırılır. Etiketlenmemiş immünosensörler, kompleksin gelişiminin neden olduğu fiziksel değişiklikleri tahmin ederek antijen-antikor kompleksini spesifik olarak belirlemek için oluşturulur. Etiketli immünosensörlerde hassas olarak algılanabilir bir etiket eklenir. Antijen-antikor kompleksi, etiket ölçümü aracılığıyla hassas bir şekilde değerlendirilir [Naresh and Lee, 2021]. İmmünosensörler, aşırı özgüllükleri nedeniyle klinik teşhis, çevresel izleme ve gıda güvenliği alanlarında sıkça çalışılmaktadır [Asal et al., 2018].

3.3. Biyosensörlerin Dönüştürücüye Göre Sınıflandırılması

3.3.1. Elektrokimyasal Biyosensörler

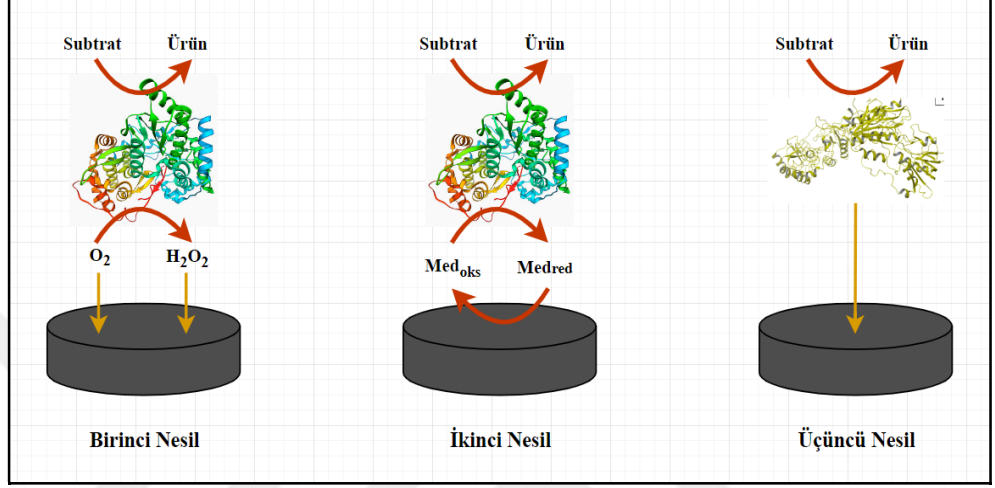
Tipik bir elektrokimyasal biyosensörde, dönüştürücü yüzeyinde biyoreseptör ile analit arasında voltaj, akım, empedans ve kapasitans açısından saptanabilir elektrokimyasal sinyaller üreten bir elektrokimyasal reaksiyon meydana gelir. Sonuç olarak elektrik sinyali üretilir ve ardından dönüştürücü aracılığıyla sinyal işlemciye aktarılır [Naresh and Lee, 2021], [Zhu et al., 2019]. Bu sensörde, elektrokimyasal hücre bir çalışma ve bir referans elektrottan oluşur [Chadha et al., 2022]. En yaygın olarak araştırılan ve kullanılan elektrokimyasal biyosensörler, yüksek hassasiyet, seçicilik ve algılama kabiliyeti sergiler. Aynı zamanda elektrokimyasal biyosensörler, geleneksel sensörlere göre düşük maliyetli, kullanıcı dostu ve minyatürleştirilmeleri kolay, sağlam, kısa yanıt süresine sahip ve ayrıca küçük hacimli analitler için bile geniş algılama limiti aralığı sağlamak gibi çeşitli avantajlara sahiptir [Chadha et al., 2022]. İlk biyosensör de olan ilk elektrokimyasal biyosensör, Clark tarafından insan kanındaki glikoz seviyesini tespit etmek için geliştirilmiştir. Elektrokimyasal biyosensörler, enzimler, proteinler, virüsler, antikorlar vb. gibi çeşitli biyolojik varlıkları tespit etmek için de sıkça çalışılmaktadır [Singh et al., 2021].

İletim ilkesine dayalı olarak, elektrokimyasal biyosensörler; potansiyometrik, amperometrik, impedimetrik, kondüktometrik ve voltammetrik olarak kategorize edilir.

Potansiyometrik biyosensörler, sıfır akım altında referans elektroda göre çalışan elektrotta analit ve biyoreseptör etkileşimi nedeniyle biriken yükü ölçer. Biyokimyasal reaksiyonu potansiyel bir sinyale dönüştürmek için iyon seçici elektrotlar ve iyon duyarlı alan etkili transistörler kullanılır [Naresh and Lee, 2021]. Potansiyometrik biyosensörlerin en büyük avantajı, oldukça kararlı ve doğru bir referans elektrot kullanıldığında hassasiyetleri ve seçiciliklerinin yüksek olmasıdır. Sensörler alanında en çok kullanılan elektrokimyasal teknik olan potansiyometri, uygun maliyetlidir ve çok çeşitli iyon konsantrasyonlarında kullanılır [Singh et al., 2021].

Amperometrik biyosensörler, iki veya üç elektrot konfigürasyonunda çalışır. Diğer elektroaktif maddelerden kaynaklanan parazitler bu sensörlerin dezavantajlarıdır [Naresh and Lee, 2021]. Amperometrik biyosensörler, elektroaktif

türlerin biyokimyasal reaksiyonlarının (oksidasyonu veya redüksiyonu) sonucu olarak akımı sürekli olarak izleyen ve kantitatif analitik bilgi sağlayan entegre cihazlardır. En eski biyosensörler olan amperometrik biyosensörler, elektron transfer izleme mekanizmalarına dayalıdır ve amperometrik biyosensör tarafından üretilen akım, saptanması gereken substrat konsantrasyonuyla orantılıdır [Chadha et al., 2022]. Bu nedenle iletkenlik analit konsantrasyonunun belirlenmesinde önemli rol oynar.



Şekil 3.4: Amperometrik biyosensörde yer alan üç nesil.

Kondüktometrik biyosensörler, bir elektrokimyasal reaksiyon nedeniyle elektrot çiftleri arasındaki iletkenlikteki değişikliği nicelleştirir. Metabolik süreçte yer alan iyonik türlerin sentezi ve tüketimi, kondüktometrik bir biyosensörün temelidir [Chadha et al., 2022]. Kondüktometrik ve impedimetrik biyosensörler genellikle canlı biyolojik sistemlerdeki metabolik süreçleri izlemek için kullanılır [Naresh and Lee, 2021]. Bu biyosensörde sinyal-gürültü oranının %2'den büyük olması gerekir. Ayrıca ortamdaki yüksek iyonik güce sahip küçük iletken değişikliklerin ölçümü biyosensörün yeteneğini sınırlar [Chadha et al., 2022]. İnsan idrarında uyuşturucu tespiti ve çevresel izlemede kirletici madde gibi çeşitli alanlarda kullanımı bulunmaktadır.

İmpedimetrik biyosensörler, küçük bir sinüzoidal uyarma sinyali uygulandığında elektrot/elektrolit arayüzünde üretilen elektrik empedansını ölçer. Sensör elektrodunda düşük genlikli AC voltajının uygulanmasını içerir ve ardından faz içi/dışı akım tepkisi, bir empedans analiz cihazı kullanılarak frekansın bir fonksiyonu olarak ölçülür [Naresh and Lee, 2021]. Bu yöntemde kullanılan en yaygın teknik elektrokimyasal empedans spektroskopisidir (EIS) [Singh et al., 2021].

Voltammetrik biyosensörler, uygulanan potansiyelin kontrollü değişimi sırasında akımı ölçerek analiti algılar [Naresh and Lee, 2021]. Algılama için diferansiyel darbe voltametrisi (DPV), döngüsel voltametri (CV) gibi voltammetrik tekniklerin kullanıldığı elektrokimyasal biyosensörler voltammetrik biyosensörler olarak bilinir. Voltammetrik yöntemler, düşük maliyetleri, iyi seçicilikleri ve yüksek hassasiyetleri nedeniyle algılama platformlarında yaygın olarak kullanılmaktadır [Singh et al., 2021].

3.3.2. Optik Biyosensörler

Optik biyosensörler, bir optik dönüştürücü sistemine entegre edilmiş biyotanıma elemanından oluşan analitik cihazlardır. Optik biyosensörün çalışma prensibi, analitin konsantrasyonuyla orantılı sinyaller üreterek gerçek zamanlı paralel algılama sağlamaktır [Zhu et al., 2019]. Bu biyosensörler, sağlık hizmetleri, klinik teşhis, ilaç keşfi, biyomedikal araştırma, güvenlik amaçları, çevresel izleme ve ayrıca gıda proses kontrolü alanında yardımcı olan analitik araçlardır. Etkinliği, analitlere hızlı yanıtı, seçiciliği, özgülüğü ve duyarlılığı nedeniyle yaygın olarak kullanılan bir biyosensör olarak kabul edilir [Chadha et al., 2022].

Optik biyosensörler, biyotanıma öğeleri olarak enzimleri, antikorları, aptamerleri, tüm hücreleri ve dokuları kullanır. Optik biyosensörler etiketsiz ve etiket tabanlı olarak iki kategoride incelenir. Etiketsiz algılamada, algılanan sinyal, analitin dönüştürücüyle olan etkileşimi ile üretilir. Etiket tabanlı algılamada ise optik sinyal kalorimetrik, floresan veya lüminesan yöntemlerle üretilir [Naresh and Lee, 2021]. En yaygın kullanılan optik tabanlı biyosensörler; floresan tabanlı optik biyosensörler, kemilüminesans tabanlı optik biyosensörler, yüzey plazma rezonansı (SPR) tabanlı optik biyosensörler ve fiber optik tabanlı optik biyosensörlerdir [Nnachi et al., 2022].

3.3.3. Kütle Değişimine Dayalı Biyosensörler

Kütle tabanlı biyosensörler tamamen kütledeki değişikliklere bağlıdır. Biyomoleküller veya herhangi bir tür analit etkileşime girdiğinde, kütlede bir değişiklik olur, bu da salınım frekansında bir değişiklikle sonuçlanır ve bu değişiklik, kütle tabanlı sensörler tarafından ölçülür [Chadha et al., 2022].

Diğer bir tanımla; üretilen herhangi bir kimyasal reaksiyon, salınım frekansını etkiler, dolayısıyla bu kütleye duyarlı biyosensörler, biyotanıma elemanı ile analit arasındaki etkileşimin neden olduğu frekanstaki değişiklikleri ölçer [Nnachi et al., 2022]. Kütle değişimine dayalı biyosensörler, optik ve elektrokimyasal biyosensörlere kıyasla sıklıkla kullanılsa da uygun maliyetlidir ve genellikle analitin taşınabilir formatlarda hızlı tespiti için uygundur [Guo et al., 2016]. Kütleye duyarlı ölçümler için kullanılan en yaygın aletler arasında kuvars kristali mikro terazisi (QCM), piezoelektrik kristalleri ve yüzey akustik dalgaları bulunur. Bununla birlikte, bu araçlar arasında en popüler olanı QCM'dir çünkü etiket içermez ve analitlerin biyotanıma öğelerine bağlanmasını gerçek zamanlı olarak izler [Nnachi et al., 2022]. Piezoelektrik kuvars sensörler, algılama sürelerinin kısa olması, düşük maliyetli olması, kolay ulaşılabilir olması ve etiketsiz sensör üretiminin mümkün olması nedeniyle yaygın olarak kullanılan kütle sensörleridir [Chadha et al., 2022].

Bu transdüserler ayrıca bağlanma etkileşimleri yoluyla patojenleri ve antijenleri tanımlamak için kullanılır [Naresh and Lee, 2021].

3.3.4. Isı Değişimine Dayalı Biyosensörler

Termal biyosensör, biyolojik reaksiyonların (ekzotermik veya endotermik) temel özelliklerinden, yani reaksiyon sırasında emilen veya salınan ısı enerjisinin ölçülmesinden yararlanır. Diğer bir tanımla bu biyosensörler, katalizör için reaksiyon derecesini veya çözünmüş durumdaki biyomoleküllerin yapısal dinamiklerini hesaplamak için doğrudan izlenen ısıdaki değişimi ölçer [Danielsson, 1991]. Emilen/gelişen toplam ısı enerjisi veya termal biyosensör tarafından ölçülen sıcaklık değişimi (ΔT), entalpi (ΔH) ve biyokimyasal reaksiyonda oluşturulan ürün moleküllerinin toplam sayısı (np) ile orantılıdır ve reaksiyonun ısı kapasitesi (C_p) ile ters orantılıdır.

$$\Delta T = - \frac{np \Delta H}{C_p} \quad (3.1)$$

Nispeten uzun deneysel prosedürler ve sıcaklık ölçümünde özgüllüğün olmaması nedeniyle ısı değişimine dayalı biyosensörlerin kullanımı sınırlıdır [Naresh and Lee, 2021]. Spesifik ve spesifik olmayan ısı değişimleri arasında ayırım

yapmanın doğrudan bir yolu yoktur fakat hareketsizleştirilmiş bir biyokatalizör ve ısı algılama elemanı ile kombinasyon halinde akış enjeksiyon analizine dayalı enzim termistörünün icadı, bu eksikliklerin birçoğunu gidermektedir [Ramanathan and Danielsson, 2001].

Termal biyosensörler genellikle, enzim reaktörü boyunca diferansiyel sıcaklık ölçümü ile birlikte hareketsizleştirilmiş enzim reaktörü kullanan akış enjeksiyon analizi yöntemi kullanır. Konfigürasyon, belirli substratın ürüne dönüştürülmesi için immobilize enzimlerle dolu enzim kolonu boyunca konumlandırılan termistörler veya termopiller gibi bir çift termal dönüştürücü içerir. Bu diferansiyel ölçüm sistemi, ortam sıcaklığındaki dalgalanmaların etkilerini büyük ölçüde azaltır ve enzim katalizinin spesifik ölçümüne izin verir. Termistör tarafından algılanan katalitik reaksiyon sırasında üretilen termal sinyaller, substratın konsantrasyonu ile orantılıdır [Naresh and Lee, 2021]. Termistörler veya termopiller en yaygın kullanılan sıcaklık sensörleridir. Termistör, mutlak sıcaklığın belirlenebildiği, ancak sınırlı duyarlılığa sahip, sıcaklıkla elektrik direncindeki değişikliklere bağlı olan hassas bir sıcaklık dönüştürücüsüdür. Termopiller metallere, yarı iletkenlerden ve çeşitli alt tabaka yarı iletken bileşenlerden üretilir ve iki bölge arasındaki sıcaklık farkını ölçer.

3.4. Enzim Tabanlı Amperometrik Biyosensörler

Amperometrik enzim biyosensörleri, biyokimyasal reaksiyonların belirlenmesi sırasında elektron transferinin şekline göre genel olarak üç nesilde sınıflandırılabilir. Biyosensörün üç neslinin geleneksel konfigürasyonları Şekil 3.4’de gösterilmektedir. Birinci nesil amperometrik biyosensörlerde; enzimatik reaksiyonlarda üretilen H_2O_2 veya NADH’in ya da oksijen gibi kofaktör tüketiminin neden olduğu elektrik sinyalleri izlenerek hedef analitlerin veya ürünlerin konsantrasyonu ölçülür. Birinci nesil biyosensörlerin ana avantajları, yüksek hassasiyetleri ve düşük tepki süreleridir fakat elektroaktif girişim, oksijen bağımlılığı ve yüksek redoks potansiyeli gerekliliği gibi dezavantajları vardır. Bu nedenle ikinci nesil biyosensörler geliştirilmiştir. İkinci nesil biyosensörlerde enzimden elektrota iletilen elektronlar bir mediatör (aracı madde) tarafından desteklenir. Sisteme aracı maddenin eklenmesi, oksijen bağımlılığından ve karışan maddelerin etkisinden yüksek oranla kaçınmaya yardımcı olur. Üçüncü nesil biyosensörlerde, enzim ve elektrot arasındaki elektron transferi, substratın ürüne

katalitik dönüşümü sırasında araçlar veya yardımcı substratlar olmadan doğrudan gerçekleşir [Zhu et al., 2019].

3.4.1. İletken Polimerlerin Kullanılması

İletken polimerlerin geliştirilerek kullanılması enzim tabanlı biosensörlerin de daha hassas, hızlı, seçici olmalarına kapı açmıştır. Shirakawa ve arkadaşları 1977'de poliasetilenin halojen katkısının iletkenliğini güçlü bir şekilde artırdığını göstermiş ve bu çalışmaları ile Shirakawa, MacDiarmid ve Heeger 2000 yılında Nobel Kimya Ödülü'nü almışlardır. Bu durum organik polimerlerin özelliklerini ve yarı iletkenlerin elektronik özelliklerini birleştiren diğer iletken polimerlerin geliştirilmesinin yolunu açmıştır. Poliasetilen, polipirol (PPy), polianilin, polikarbazol, politiyofen (PTh), poli(3,4 etilendioksitiyofen), polifenilen, poli(fenilen vinilen) ve polifloren gibi çok sayıda iletken polimer hazırlanmış ve çeşitli uygulamalarda kullanılmıştır [Lakard, 2020].

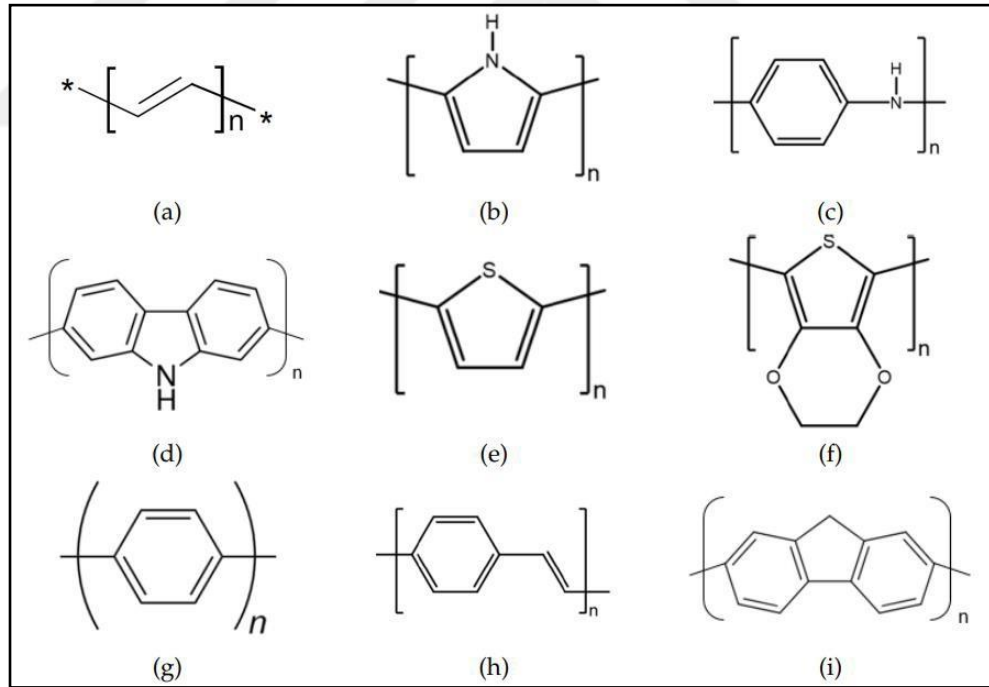
Tüm bu organik polimerler, değişen tek (σ) ve çift (π) bağları ve tüm konjuge yapıları boyunca delokalize edilmiş π elektronlarının varlığı ile karakterize edilir, böylece kolayca oksitlenebilen veya indirgenebilen polimerler elde edilir. Oksidasyon (p-doping) veya indirgeme (n-doping) üzerine gerçekleştirilebilen bu katkı, polimerlerin iletkenliğini önemli ölçüde artırır [Gerard et al., 2002]. Polimerlerin iletkenliği ayrıca katkı maddesinin doğası ve konsantrasyonuna, sıcaklığa, polimer morfolojisine, pH'a, uygulanan potansiyel ve polimer zincir uzunluğuna bağlıdır.

PPy veya PTh gibi çoğu heterosiklik polimer için, iletim mekanizması bir p-doping'e karşılık gelir. İlk monomerden bir elektronun çıkarılmasıyla başlar ve kararsız bir radikal katyonun (polaron) oluşumuna yol açar. Daha sonra, başka bir monomerden veya bir oligomerden ikinci bir elektron çıkarılır ve bu da bipolaron oluşumuna yol açar. Uygulanan elektrik alanı altında, bu polaronlar ve bipolaronlar, polimer zincirleri üzerinde delokalize olan yük taşıyıcıları olarak hizmet eder ve polimer zincirleri boyunca hareketleri elektronik iletkenlik üretir [Lakard, 2020].

İletken polimerler çoğunlukla kimyasal veya elektrokimyasal oksidatif polimerizasyon yoluyla hazırlanır. Kimyasal oksidatif polimerizasyonda, polimerlerin sentezi, sert oksidatif koşullar altında $K_2Cr_2O_7$, $KMnO_4$, $K_2S_2O_8$, KIO_3 ve $FeCl_3$ gibi oksidanların kullanımıyla ya da ılımlı koşullar altında, polimerizasyonu başlatan hidrojen peroksit üretmek için redoks enzimlerinin katalitik etkisini kullanarak

yapılabilir [Erdem et al., 2004], [Ramanavicius et al., 2005]. İletken polimerlerin elektrokimyasal polimerizasyonu; sabit akım veya galvanostatik; sabit potansiyel veya potansiyostatik; potansiyel tarama/döngü yöntemleri ile kategorize edilir. Çalışma elektrotu, karşıt elektrot ve bir referans elektrot içeren kesikli hücre kullanan standart elektrokimyasal teknik, genellikle en iyi filmleri üretir. Yaygın olarak kullanılan anotlar krom, altın, nikel, paladyum, titanyum, platin ve indiyum-kalay oksit kaplı cam plakalardır.

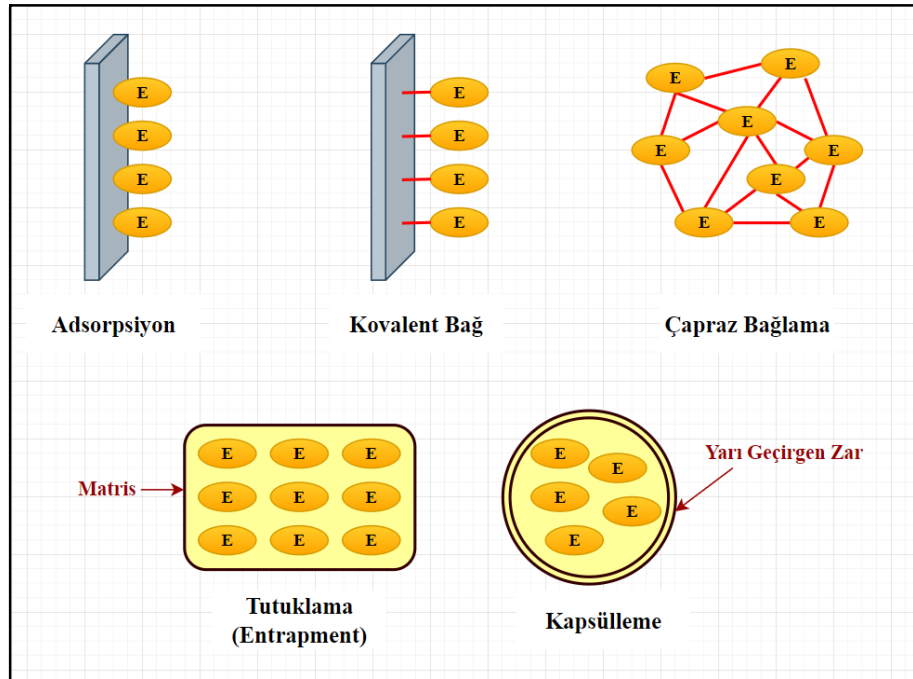
Polipirol (PPy) ve türevleri genellikle biyomoleküller için sabitleyici substratlar olarak kullanılır. Ortam koşulları altında kararlılık, doğal ve sulu koşullar altında polimerize olma yeteneği, elektrot yüzeyinde basit tek adımlı elektrodepozisyon, kolay enzim yakalama işlemi, uzun vadeli çevresel kararlılık gibi olumlu özelliklerinden dolayı kimyasal sensörlerde ve biyosensörlerde sıkça kullanılır. PPy, enzim immobilizasyonuna dayalı biyosensörlerin, immünosensörlerin ve DNA saptama biyosensörlerinin tasarımında yaygın olarak kullanılmaktadır [Zamani et al., 2019]. Şekil 3.5’de bazı iletken polimerlerin kimyasal yapıları gösterilmiştir.



Şekil 3.5: Bazı iletken polimerlerin kimyasal yapıları: a) poliasetilen, b) polipirol, c) polianilin, d) polikarbazol, e) politiyofenler, f) poli (3,4-etilendioksitiyofen), g) polifenilenler, h) poli(fenilen vinilen), i) poliflorene.

3.4.2. Enzim Sabitleme Yöntemleri

Enzimler, analitin algılanmasında daha spesifik özellik göstermelerine ve çevreci yaklaşım için daha uygun olmalarına rağmen zayıf adaptasyon, stabilite, yeniden kullanım gibi zorluklardan dolayı serbest olarak kullanımları zordur. Serbest enzimlerle karşılaştırıldığında, immobilize enzimlerin çevresel değişikliklere karşı daha dayanıklı olduğu ve katalitik aktivitelerini koruduğu gözlemlenmiştir [Nemiwal et al., 2022]. Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik birçok madde kullanılmaktadır. Taşıyıcı, çevre koşullarına dayanıklı, tehlikesiz, suda çözünmeyen formda ve ucuz olmalıdır. Enzimlerin polimerlerle modifikasyonu, analitin tespitinde bazı avantajlar sağlar. Polimerlerin enzimlere dahil edilmesi, enzim stabilitesini, çözünürlüğü ve biyoyumluluğu iyileştirebilir [Romero et al., 2012]. Ayrıca birçok reaktif grup içeren çok işlevli polimerler, enzimlerin çoklu molekül içi veya alt birimler arası çapraz bağlantıları için çapraz bağlama maddeleri olarak hizmet edebilir, bu da hedef analitlerin saptanmasında artan hassasiyetlere veya etkinliklere sahip büyük komplekslerle sonuçlanır [Nguyen et al., 2019]. Stabilite, yeniden kullanılabilirlik ve katalitik aktivite immobilizasyon yöntemine göre değişiklik göstermektedir [Nemiwal et al., 2022]. Şekil 3.6’da Enzim immobilizasyon yöntemleri gösterilmiştir.



Şekil 3.6: Enzim immobilizasyon yöntemleri.

- Fiziksel Adsorpsiyon

Adsorpsiyon, enzimin fiziksel immobilizasyonun en basit yöntemlerinden biridir. Bu yöntemde enzim, hidrofobik etkileşimler ve tuz bağları yoluyla inert bir desteğin yüzeyinde fiziksel olarak adsorbe edilir [Gahlaut et al., 2018]. Destek ya bir enzim çözeltisine batırılır ya da enzim, fiziksel adsorpsiyon için elektrot yüzeyinde kurutulur. Adsorpsiyon mekanizmaları, Van Der Waals kuvvetleri ve elektrostatik/hidrofobik etkileşimler gibi zayıf bağlara dayanır. Bu tür bağlar zayıf olsa da enzimlerin temel yapısı değişmez ve enzimlerin aktivitesi değişmeden kalır [Nemiwal et al., 2022]. Adsorpsiyonun gücü, enzimlerin konsantrasyonu ve çözücülerin özellikleri (sıcaklık, pH, iyonik güç, vb.) gibi diğer faktörlere bağlıdır. Bu immobilizasyon yöntemi çok az enzim inaktivasyonuna neden olmasına veya hiç olmamasına rağmen, doğrudan adsorbe edilen enzimlerin stabilitesi iyi değildir ve enzimin aktivitesinin bir süre sonra bozulduğu görülür [Sassolas et al., 2012].

- Kovalent Bağlama

Enzimlerin polimerik desteklere kovalent bağlanması, geri dönüşümsüz enzim immobilizasyonunda en yaygın kullanılan tekniktir. Bağ oluşumu, enzim üzerinde bulunan kimyasal grup ile destekleyici materyal üzerinde bulunan bağlayıcı kimyasal grup arasında meydana gelir. Kovalent bağ oluşumu, amino grupları, alkilasyon, peptit ve diazotizasyon reaksiyonları yoluyla gerçekleşebilir [Nemiwal et al., 2022]. Enzimlerin katı desteğe bağlanması genellikle çok işlevli reaktifler (örn. glutaraldehit veya karbodiimid) kullanılarak yüzeyin ilk aktivasyonu, ardından aktive edilmiş desteğe enzim bağlanması, ardından fazla ve bağlanmamış biyomoleküllerin çıkarılmasıyla gerçekleştirilir [Sassolas et al., 2012]. Taşıyıcı malzemenin boyutu ve şekli, taşıyıcı malzemenin bileşimi, birleştirme yönteminin doğası ve birleştirme sırasındaki açık koşullar, kovalent bağlı enzimin aktivitesinden sorumludur. Kovalent bağlar enzimleri tutacak ve enzimlerin biyolojik bozunmasını önleyecek kadar güçlüdür, ancak enzimlerin aktivitesi kimyasal modifikasyonlar nedeniyle bozulabilir.

- Çapraz Bağlama

Çapraz bağlamada, enzimler, çok işlevli reaktifler aracılığıyla aralarında çapraz bağlar oluşturarak doğrudan bağlanır. Bu yöntem enzim immobilizasyonunun geri dönüşü olmayan bir yöntemidir. Çapraz bağlama yönteminde, enzimleri doğrudan dönüştürücülere immobilize etmek için glutaraldehit gibi çok işlevli reaktifler

kullanılır [Peralta et al., 2019]. Amino asitlerle bağlanmak için bu reaktifler -OH, -SH, -COOH, -NH₂, vb. gibi fonksiyonel gruplara sahiptir [He et al., 2020]. Glutaraldehit ve diazonyum tuzları, uygun maliyetli oldukları ve büyük miktarlarda kolayca bulunabildikleri için en yaygın kullanılan çapraz bağlama reaktifleridir. Kimyasal çapraz bağlama yöntemi, kombinasyonun sıklığı ve basit çalışması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Ana dezavantaj, aktif enzim konformasyonunun bozulması ve aktif bölgenin çapraz bağlama sırasındaki kimyasal değişimleri nedeniyle aktivite kaybı olasılığıdır [Sassolas et al., 2012].

- Tutuklama (Entrapment)

Bu yöntemde, enzimler, substratın ve ürünlerin geçmesine izin veren ancak enzimi tutan elektropolimerize bir film, polidimetilsiloksan (PDMS), silika jel, polisakarit veya karbon macundan oluşan bir amfifilik (hem hidrofilik hem hidrofobik) ağ gibi üç boyutlu matrislerde hareketsiz hale getirilebilir. Elektrokimyasal polimerizasyon yöntemlerinde, anyonik enzimler ile katyonik polimer iskeleti arasında elektrostatik etkileşim sağlanır. Bu tür etkileşim, elektrotlarda oksidasyon-indirgeme verimini kolaylaştırır [Li et al., 2019]. Enzim, araçlar ve katkı maddeleri aynı anda biriktirilebilir. Bu tek adımlı yöntem, hem enzim hem de monomer molekülleri içeren sulu bir çözeltiye batırılmış dönüştürücüye uygun bir potansiyel veya akım uygulanmasından oluşur. Monomer oksidasyonu, daha sonra oksitlenen bir dimer elde etmek için ikinci bir radikal katyonla veya nötr bir monomer ile reaksiyona girebilen bir radikal katyona yol açar. Son olarak elektrot yüzeyinde bir polimer oluşur. Elektrot yüzeyinin hemen yakınında bulunan enzim molekülleri, büyüyen polimer ağı içinde fiziksel olarak birleştirilir [Sassolas et al., 2012]. Biyomolekül immobilizasyonu için kullanılan elektropolimerize filmlerin çoğu, polianilin, polipirol veya politiyofen gibi iletken polimerlerdir. Özellikle polipirol (PPy), nispeten kararlı bir elektrik iletkenliği sunar ve düşük oksidasyon potansiyeli ve nötr pH gibi biyouyumlu koşullar altında elektrosentezlenebilir.

- Kapsülleme

Kapsüllemede enzim, mikrokapsül adı verilen küresel bir parçacık oluşturan polikarbonat, naylon, polivinil alkol (PVA), polivinil klorür (PVC), poliakrilik asit amin vb. yarı geçirgen bir zar içine alınır [Nemiwal et al., 2022]. Membran yapısı polimerik, iyonik olmayan veya lipoidal olabilir. Bu hareketsizleştirme yöntemi,

enzim ve substrat veya ürün moleküllerinin boyutundaki farka, zarın gözenek boyutu ile korelasyona bağlıdır. Substrat/ürün gibi küçük boyutlu moleküller, zardan içeri ve dışarı yayılırken, daha büyük boyutlu enzim molekülleri, kapsülün içinde serbest yüzer halde kalır. Ek olarak, çoklu enzim sistemi geliştirmek için zar içinde birden fazla enzim tutulabilir [Park and Chang, 2000]. Enzim immobilizasyon metodlarının avantaj ve dezavantajları Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2: Enzim immobilizasyon metodlarının avantaj ve dezavantajları.

İmmobilizasyon Yöntemi	Avantajları	Dezavantajları
Fiziksel adsorpsiyon	Reaktif gerekmez; ucuz, yüksek enzim aktivitesi, az enzim hasarı	Enzimlerin kolay desorpsiyonu, çevresel değişimlerden kolay etkilenme
Kovalent bağ	Sızıntı sorunu olmaması, farklı fonksiyonel gruplarla çeşitli desteklerin varlığı	Kimyasal modifikasyonlar nedeniyle enzimin aktivitesinin kaybı
Çapraz bağlama	Az desorpsiyon, basit, ekonomik	Enzim denatürasyonu
Tutuklama	Az enzim aktivitesi kaybı, hızlı immobilizasyon yöntemi, ucuz, küçük ölçekte uygulanması kolay	mikrobiyal kontaminasyon riski, endüstriyel işlemlerde daha az başarı
Kapsülleme	Çok miktarda enzim immobilize edilebilir, minimum enzim sızıntısı, basit ve ucuz	Gözenek boyutu sınırlaması

3.4.3. Nitrit Biyosensörlerinde Kullanılan Enzimler

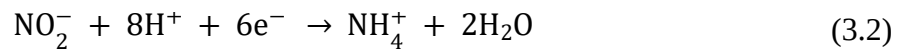
Nitritin tespiti için geliştirilen biyosensörlerde immobilize edilen enzimler iki grupta incelenebilir. Bunlar; hemoglobin (Hb), miyoglobin (Mb), horseradish

peroxidase (HRP), sitokrom c ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi nitrite spesifik olarak cevap vermeyenler ve nitrite spesifik olan nitrit redüktaz (NiR) enzimleridir [Gahlaut et al., 2018].

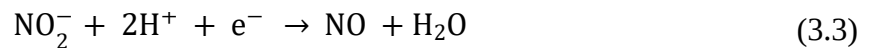
Miyoglobin ve hemoglobin oksijen bağlayan proteinlerdir. Miyoglobin, kas dokusunda bulunan ve oksijen için hücre içi bir depolama alanı olarak hizmet eden monomerik hemoproteindir. Hemoglobin ise çok sayıda omurgalı ve omurgasızın alyuvarlarında bulunan ve burada geri dönüşümlü olarak O₂ ile birleşerek onu hücrelere taşıyan proteindir. Bu proteinler nitrit biyosensörlerinin geliştirilmesinde model proteinler olarak kullanılmıştır. Bu çalışmalarda elektrokimyasal tepki yoluyla hidrojen peroksitin (H₂O₂) saptanması amaçlanmıştır ve biyosensörlerin nitrit iyonlarının da tespit ettiği yeterince açıklanmasa da belirtilmiştir [Almeida et al., 2010].

Bununla birlikte, bu proteinlerin substrat karışıklığı, belirleme seçiciliğini riske atar, bu nedenle nitrit biyosensörün geliştirilmesi için seçici biyokatalizörler kullanılmalıdır. Bu amaçla; nitrit biyosensörü geliştirilmesine ait çalışmalarda yaygın olarak nitrit redüktaz (NiR) enzimleri kullanılmıştır [Tan et al., 2022]. Nitrit indirgeyen enzimler kofaktörlerin veya reaksiyon ürününün tipine göre dört sınıfta incelenir.

Sülfat veya kükürt indirgeyen bakterilerden izole edilen sitokrom c nitrit redüktazlar (ccNiR) ve bitkiler, algler ve siyanobakteriler gibi fotosentetik organizmalardan izole edilen ferredoksin bağımlı nitrit redüktazlar nitritin amonyağa (NH₄⁺) altı elektron indirgenmesini katalize edebilir. Nitritin amonyağa indirgenmesi aşağıdaki eşitlik ile ifade edilir:



Bakır içeren nitrit redüktazlar (CuNiR) ve sitokrom cd1 nitrit redüktazlar (cd1NiR) nitritin nitrik oksite tek elektronla indirgenmesini katalize eder. Nitritin nitrik oksite indirgenmesi aşağıdaki eşitlik ile ifade edilir:



3.5. Enzim Tabanlı Nitrit Biyosensör Çalışmaları

Zhang ve ark. 2008’de, Miyoglobin (Mb) enzimini, camı karbon elektrot üzerine biyouyumlu ve Mb’nin biyoaktivitesini koruyabilen zirkonyum fosfat nano tabakaları (ZrPNS) ile immobilize eder. Çalışmalarında biyosensörün H_2O_2 , O_2 ve $NaNO_2$ indirgenmesine yönelik bulgular elde edilmiştir. Akım-zaman deneyleri 0.1 M fosfat tamponu (pH:6.5)’ta gerçekleştirilmiştir. Çalışma potansiyeli -0.75 V ve referans elektrot Ag/AgCl’dür. Nitritin indirgeme lineer aralığı 3-800 mM ($R^2=0.999$) ve belirleme limiti 0.66 mM’dır. Biyosensörün nitrite yanıt süresi 3 saniyeden az bulunmuştur.

Hong ve ark. 2009 yılında, Hemoglobin (Hb) enzimini, tek boyutlu altın (Au) nanoparçacıkları üzerine immobilize ettiler. Bu biyosensör ile hem hidrojen peroksit (H_2O_2) hemde nitrite yanıt alındı. Optimum koşullarda elektrotun nitrite verdiği sinyallere bakıldığında elektrotun cevap verdiği lineer aralık 0.4 -14.8 μM ve belirleme limiti 0.065 μM olarak hesaplanmıştır. Michaelis-Menten sabiti (K_M^{app}) 35.3 μM hesaplanmıştır.

Liu ve ark. 2017’de, Horseradish peroxidase (HRP)’ın doğrudan elektrokimyasına dayalı yeni bir medyatör kullanılmayan biyosensör ürettirler. Enzim, indirgenmiş grafen oksit kompozit ile modifiye edilmiş camı karbon elektrot (GCE) ile birlikte Co_3O_4 nano tabakaları üzerine immobilize edildi. Hazırlanan nitrit biyosensörü, 0.21 μM ’lik düşük algılama limiti ve 1-5400 μM ’lik geniş bir lineer aralığa sahiptir.

Madasamy ve ark, 2014 yılında nitrit ve nitratın eş zamanlı tespitini gerçekleştirebilmek için biyosensör geliştirdiler. Çalışmada superoksit dismutaz (SOD1) ve nitrat redüktaz (NaR), karbon nanotüp (CNT) ve polipirrol (PPy) ile platin elektrot üzerine immobilize edilmiştir. Elektrotun yanıt verdiği lineer aralık 100 nM ile 1 mM arası ve belirleme limiti 50 nM olarak hesaplanmıştır.

Chen ve ark. 2009’da, Sitokrom c (Cyt C) enzimini çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT), poli(amidoamin) (PAMAM) ve kitosan (MWCNT-PAMAM-Chit) nanokompoziti ile modifiye edilmiş cam karbon elektrotu (GCE) üzerine immobilize ederek bir nitrit biyosensörü geliştirmişlerdir. Elektrot 5 saniyelik yanıt süresine sahiptir. Biyosensör için iki farklı lineer yanıt aralığı verilmiştir. Bunlardan birisi 1-29 μM ve diğeri 29-254 μM ’dır. Belirleme limiti 0.01 μM olarak hesaplanmıştır.

Haldorai ve ark. 2016'da, titanyum nitride (TiN) nanoparçacıkları ilave edilmiş çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT)'i camı karbon elektrot üzerine modifiye etmiş ve sitokrom c'nin immobilizasyonunu sağlamışlardır. Optimum koşullarda hazırlanan elektrotun hassasiyeti $121.5 \mu\text{A}/\mu\text{M}\cdot\text{cm}^2$ olarak verilmiştir. Lineer yanıt aralığı ve belirleme limiti sırasıyla, 1-2000 μM ve 0.0014 μM olarak hesaplanmıştır. Elde edilen biyosensör yüksek stabilite ve tekrarlanabilirliğe sahip olduğu ve deniz sularında nitritin başarılı tespitini sağladığı belirtilmiştir.

Sasaki ve ark. 1998'de, çalışmalarında NIR geni taşıyan *E.coli* kültüründen elde edilmiş olan *Alcaligenes faecalis* S-6'dan nitrit redüktazı, altın elektrot üzerine diyaliz membran kullanılarak immobilize etmiş ve nitrit ölçümü için üçlü elektrot sisteminde çalışma elektrotu olarak kullanmışlardır. Elektron transferi 1-metoksi PMS (1-metoksi-5-metilfenazinyum metilsülfat) aracısı ile sağlanmıştır. Lineer ölçüm aralığı 0-1 mg/L ve belirleme limiti 0.01 mg/L olarak bulunmuştur. Doğal sularda nitrit ölçümü için uygundur.

Silva ve ark. 2004'te, *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774'ten elde edilen bir sitokrom c nitrit redüktaz (ccNiR) kullanarak nitritin tayini için biyosensör geliştirdiler. ccNiR camı karbon elektrot yüzeyine poli(pirrol-violojen) matrisinde tutularak elektriksel olarak immobilize edildi. Elektrotun lineer aralığı 5,4-43,4 μM , belirleme limiti ve hassasiyeti sırasıyla 5,4 μM ve $1721 \text{ mA}/\text{M}\cdot\text{cm}^2$ olarak bulunmuş ve Lineweaver-Burk grafiğinden belirlenen K_M^{app} değeri 86 μM olarak hesaplanmıştır. Nitratın herhangi bir etkisi görünmezken sülfitin ihmal edilebilir düzeyde ölçümleri etkilediği bulunmuştur.

Quan ve ark. 2006'da yaptıkları çalışmada nitrit redüktaz ve elektron transferinde görev alması için kullanılan metil violojeni, poli(vinil alkol) polimeri ile camı karbon elektrot yüzeyine immobilize etmişlerdir. MV ve enzimin sızmasını engellemek için poli(allilamin hidroklorür) (PAH) katmanı eklenmiş daha sonrasında da kloroform içerisinde çözünen hidrofilik poliüretan (HPU) katmanı eklenmiştir. Biyosensörün yanıt süresi $t_{90\%}$ 20 saniyedir. Biyosensörün hassasiyeti $11.8 \text{ nA}/\mu\text{M}$ bulunmuştur. Elektrotun lineer aralığı ve belirleme limiti sırasıyla 1.5-260 μM ($R^2 = 0.996$) ve 1.5 μM ($S/N = 3$) olarak belirlenmiştir. Nitratın ölçümlere %38'lik hassasiyetle etki ettiği görülmüştür. Biyosensör 24 gün boyunca ilk aktivitesinin %80'ini korumuştur. K_M^{app} değeri 770 μM olarak hesaplanmıştır.

Almeida ve ark. 2007' de ccNiR ve aracı madde olarak metil violojen yüklü Nafion iyonomerik matrise dayalı bir biyosensör geliştirdi. Çalışmada medyatör

miktarının analitik parametreler üzerine etkiside incelenmiş ve violojenin artması ile hassasiyetin düştüğü ama lineer aralığın genişlediğini gözlemlemişlerdir. Optimize koşullarda hazırlanan elektrotun hassasiyeti 445 mA/M.cm^2 olarak hesaplanmıştır. Lineer aralık $75\text{-}800 \text{ }\mu\text{M}$ ve belirleme limiti $60 \text{ }\mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Nitrit ölçümlerine etki edebilecek maddeler incelenmiş ve nitrit ve sülfitin ihmal edilebilir düzeyde ölçümleri etkilediği ancak hidroksilaminin ölçümleri %49 hassasiyetle etkilediği görülmüştür.

Chen ve ark. 2007'de yaptıkları çalışmada ccNir, antraknon-2-sülfonat (AQS) içeren redoks aktif [ZnCr-AQS] katmanlı hidroksit ile beraber camı karbon elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir. Biyosensör 5 saniye gibi hızlı yanıt süresine sahiptir ve hassasiyeti 1.8 A/M.cm^2 olarak bulunmuştur. Elektrotun lineer yanıt aralığı ve belirleme limiti sırasıyla $0.015\text{-}2.35 \text{ }\mu\text{M}$ ve 4 nM olarak hesaplanmıştır. Michaelis-Menten sabiti (K_M^{app}) $7.5 \text{ }\mu\text{M}$ hesaplanmıştır.

Silveira ve ark. 2010 yılında ccNir'i pirolitik grafit (PG) üzerine sol-jel işlemiyle yapılan gözenekli bir silika camı vasıtasıyla immobilize ederek herhangi bir medyatör kullanmadan nitrit biyosensörü geliştirdiler. Tatlı sularda nitrit analizinde yüksek doğruluk sağlayan bu biyosensörün hassasiyeti 430 mA/M.cm^2 olarak bulunmuştur. Elektrotun lineer yanıt aralığı ve belirleme limiti sırasıyla $0.25\text{-}50 \text{ }\mu\text{M}$ ve 120 nM 'dir. Bu lineer aralıkta iki haftaya kadar stabil sonuçlar alınmıştır.

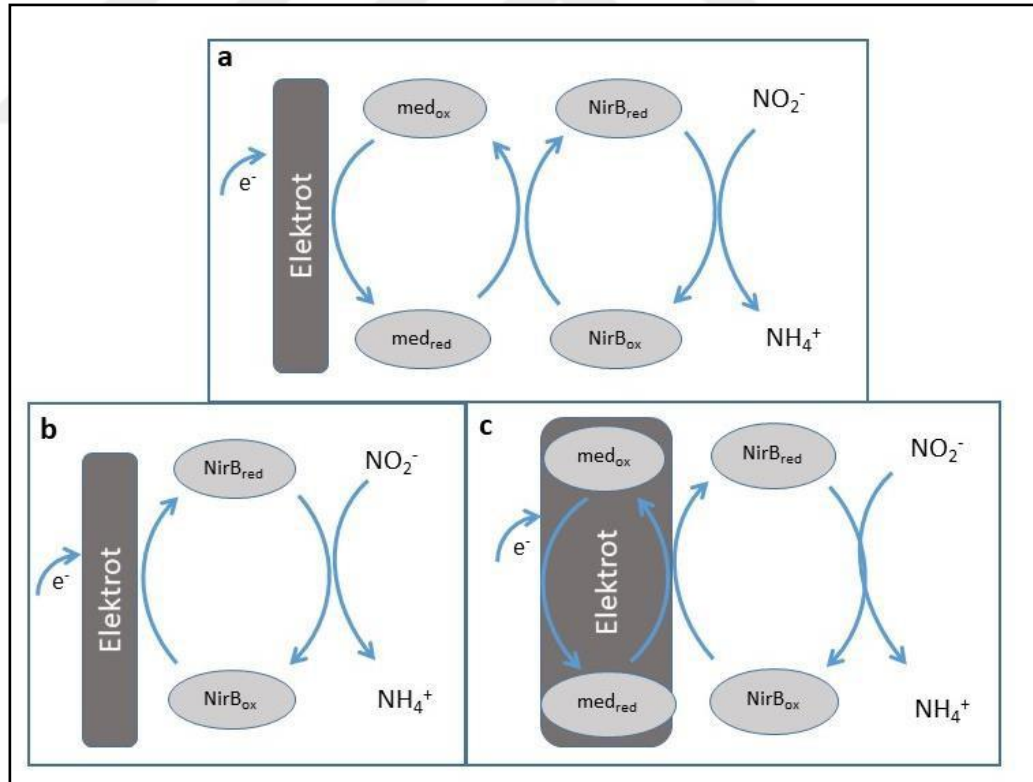
Serra ve ark. 2011'de, *Marinobacter hydrocarbonocasticus* suşu 617'den sitokrom-cd1 (cyt-cd1) nitrit redüktazı kullanarak enzimatik biyosensör geliştirdiler. Elektron transferi olarak enzimin fizyolojik redoks ortağı sitokrom-c552 (cyt-c552) kullanılmıştır. Proteinler, polivinil alkol (PVA) türevi kullanılarak karbon macun ekran baskılı elektrotlar (CPSPE'ler) üzerine birlikte immobilize edildi. Biyosensör hassasiyeti $2.49 \text{ A/}\mu\text{M.cm}^2$ olarak bulunmuştur. Elektrotun lineer yanıt aralığı ve belirleme limiti sırasıyla $10\text{-}200 \text{ }\mu\text{M}$ ve $7 \text{ }\mu\text{M}$ 'dir. Çalışmalarda çözünmüş oksijenin ölçümlere etki ettiği fakat döngüsel voltametri çalışmalarında tarama hızlarının artırılması ile tolere edilebileceği belirtilmiştir. Ayrıca, 1 mM sülfid varlığında sinyal %15 düştüğü ve 50 M hidroksilamin eklendiğinde biyosensör tepkisinin %18 oranında arttığı görülmüştür.

Monteiro ve ark. 2015 yılında amonyak oluşturan nitrit redüktaz (ccNiR) ile plazma, süt, idrar ve su gibi çeşitli numunelerde düşük hata oranları ile (%1-6) çalışan tek kullanımlık nitrit biyosensörü geliştirdi. ccNir'in karbon macun ekran baskılı elektrotlar (CPSPE'ler) üzerine immobilize edilerek hazırlanmasıyla oluşturulan

elektrotun hassasiyeti 0.55 A/M.cm^2 ve lineer yanıt aralığı $0.7\text{-}370 \text{ }\mu\text{M}$ olarak verilmiştir.

Santharaman ve ark. 2017 yılında, nitritin tespiti için sitokrom c redüktaz (CcR) bazlı oldukça hassas portatif elektrokimyasal analiz cihazı geliştirdi. Enzim, PPy nanokompozit ile modifiye edilmiş ekran baskılı karbon elektrot (SPCE) üzerine altın nanopariküllerle biyo-fonksiyonelleştirilen SAM üzerine immobilize edildi. Biyosensör hassasiyeti $0.172 \text{ }\mu\text{A}/\mu\text{M.cm}^2$ olarak bulunmuştur. Elektrotun lineer yanıt aralığı ve belirleme limiti sırasıyla $0.1\text{-}1600 \text{ }\mu\text{M}$ ve 60 nM 'dir.

Nitrit redüktazın nitriti NO veya NH_4^+ indirgemesine yönelik amperometrik dönüşümü temel alan araştırmalarda sıklıkla karşılaşılan farklı enzim çalışma prensipleri Şekil 3.7'de gösterilmiştir. NirB'nin nitriti NO 'ya veya NH_4^+ 'a indirgemesinde kullanılan medyatör ve enzim, birlikte çalışma elektrodundaki film matriksine tutuklanabildiği gibi bazen sadece medyatör elektrot malzemeye tutuklanmış olabilir. Medyatör kullanılmadan doğrudan elektrokimyasal dönüşüm de söz konusudur.



Şekil 3.7: Farklı enzimatik nitrit biyosensörlerinin çalışma prensiplerinin gösterimi a)medyatör ve enzimin birlikte matris film tabakada bulunduğu b)medyatörün elektrot malzemesinde tutulduğu.

4. MATERİYAL VE METOT

Seçici amperometrik bir nitrit biyosensör geliştirmek üzere çalışmada kullanılan yöntemler aşağıda ayrıntısıyla verilmiştir. Çalışmada önce elektrot yüzeyine enzim tutuklamasının aşamaları ve en iyi sonuçları almak üzere metot parametrelerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından en iyi sonuçları veren elektrodun karakterizasyon aşamasına geçilmiştir. Geliştirilen biyokatalitik elektrot yüzey sonrasında nitrit içeren numuneler ile kalibre edilerek biyosensörün kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

4.1. Materyal

4.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Deneyisel çalışmalarda kullanılan kimyasallardan; glutaraldehit (%25 w/v), metil violojen ve etanol Sigma Aldrich'ten; pirol (%99) Acros Organics'ten; sodyum hidroksit İsolab firmasından; sodyum dodesil sülfat (SDS), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), sodyum klorür (NaCl) ve sodyum nitrit (NaNO_2), sülfürik asit (H_2SO_4) Merck'ten; potasyum klorür Riedel-de Haën firmasından alınmıştır.

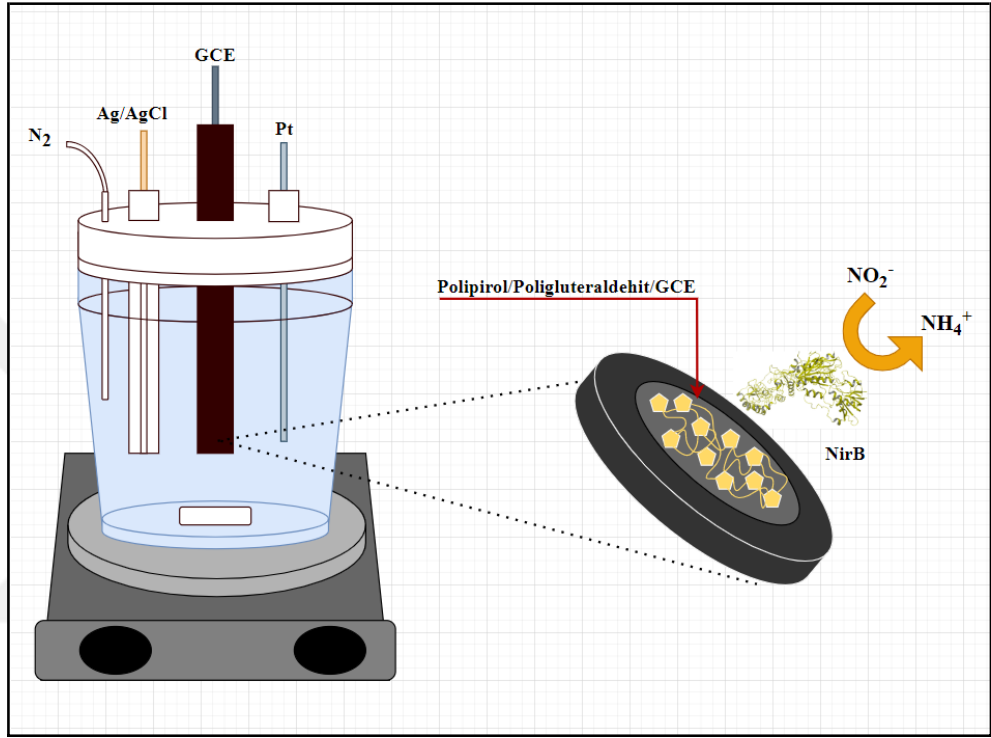
4.1.2. Enzim

Deneyisel çalışmalarda; laboratuvarımızda daha öncesinde *E.coli*'den pET28 vektörüne klonlanmış olan Nitrit Redüktaz B (NirB) enzimi kullanılmıştır [Yılmaz et al., 2022]. Enzim konsantrasyonu 265 $\mu\text{g/mL}$ olarak ölçülmüştür. Enzim, elektrot yüzeyine immobilizasyonu öncesinde -18°C 'de saklanmıştır.

4.1.3. Üçlü Elektrot Sistemi

Çalışmalar için CHI842B ve VersaSTAT 3 marka potansiyostatlar kullanılmıştır. Çalışma elektrotu olarak camsı karbon elektrot (GCE) ($d=3\text{ mm}$, CHI104), referans elektrot olarak Ag/AgCl (3 M KCl, BASI), karşıt elektrot olarak platin (Pt) elektrot

kullanılmıştır. Üçlü elektrot sistemi reaksiyon hücresi içerisine daldırılarak elektrik potansiyelleri uygulanmıştır. 0.05 M fosfat tamponu içerisine farklı konsantrasyonlarda nitrit eklemeleri yapılmış ve akım değerleri ölçülmüştür. Tampon çözeltisi ölçümler sırasında oda sıcaklığında devamlı olarak karıştırılmıştır ve sisteme devamlı N₂ akışı sağlanmıştır. Üçlü elektrot sisteminin şematik gösterimi Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1: Üçlü elektrot sistemi deney düzeneği.

4.2. Metot

4.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Ölçümlerde kullanılan 0.05M KCl içeren 0.05 M fosfat tamponu (PBS), 40 g/L NaCl, 7.2 g/L Na₂HPO₄, 1.225 g/L KH₂PO₄ ile hazırlanmış olup pH'ı 7.1 olarak ayarlanmıştır. Tampon çözelti, su arıtma sisteminden 15 MΩ kalitesinde temin edilen saf su ile hazırlanmıştır [Quan et al., 2006].

Stok metil violojen ve nitrit çözeltileri, PBS (0.05M KCl, pH=7.1) ile hazırlanmıştır. Metil violojen deneyden hemen önce taze bir şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler 4°C’de tutulmuştur.

Poliglutaraldehit çözeltisi hazırlanmasında ilk olarak, 10 mL saf su içerisine 2 mL glutaraldehit (%25 w/v) eklenmiştir ve 0.1 M NaOH ile pH 10-11 seviyelerine çıkarılmıştır. 600 rpm’de 30 dakika karıştırılarak glutaraldehitin bazik ortamda polimerizasyonu sağlanmıştır [Özöner et al., 2009].

4.2.2. Çalışma Elektrotunun Hazırlanması

Çalışma elektrotları, kaplama işleminden önce, 0.05 µm alumina tozu ile temizleme pedinde temizlenmiş ve 5 dakika su-ethanol (50 v/v %) karışımında sonike edilmiştir. N₂ gazı ile kurutulmuştur. Poliglutaraldehit (PGA) çözeltisi içerisine 2.35 mM sodyum dodesil sülfat (SDS) ve 14 mM pirol (%99 saflıkta) eklenmiş ve homojen olana kadar karıştırma işlemi uygulanmıştır. Pirolün elektrot yüzeyine elektropolimerizasyon, 3’lü elektrot sistemi ile dönüşümlü voltametri yöntemi kullanılarak sağlanmıştır. 15 döngü (25 dakika), -1V ile 1.5V potansiyel taraması ve 50 mV/s tarama hızında elektrot yüzeyine Polipirol/Poliglutaraldehit (PPy/PGA) film kaplanmıştır. Kplama işleminden sonra çalışma elektrotu kurutulmuş, %25’lik glutaraldehit içerisine daldırılmış ve 3 saat bekletilmiştir. Sonrasında üzerine 7.5 µL enzim damlatılmıştır ve bir gece 4°C’de bekletilmiştir. Bağlanmamış enzimlerin yüzeyden uzaklaştırılması için elektrotlar distile su ile yıkanmıştır ve kullanılmadıklarında PBS (0.05M KCl, pH=7.1) içerisinde 4°C’de saklanmıştır.

4.2.3. Elektrot Yüzeyinin Temizlenmesi

Deneyisel çalışmalarda kullanılan camı karbon elektrotlar, çalışma sonrası temizlenmiştir. Elektrotlar sırasıyla 1 µm, 0.3 µm ve 0.05 µm alumina tozu ile temizleme pedinde temizlenmiş ve 5 dakika su-ethanol (50 v/v %) karışımında sonike edilmiştir. Sonrasında üçlü elektrot sistemi 0.5 M H₂SO₄ çözeltisi içerisinde -0.5 V ile 1.5 V potansiyel taraması, 50 mV/s tarama hızında 10 döngü boyunca elektrokimyasal olarak temizlenmiştir.

4.3. Optimizasyon Çalışmaları

Enzim tabanlı nitrit biyosensörünün ölçümleri döngüsel voltametri ve amperometrik akım-zaman eğrileri ile yapılmıştır. Tampon içerisine, nitritin eklenmesi ile oluşan akım değerleri ölçülmüştür.

Biyosensörün en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi için; pirolün elektropolimerizasyon süresi, pirol konsantrasyonu, SDS konsantrasyonu, pH ve glutaraldehit içerisinde bekletme süresi optimize edilmiştir.

4.3.1. Pirolün Elektropolimerizasyon Süresi

Pirolün elektrot yüzeyine elektropolimerizasyonu; 15 mL poliglutaraldehit çözeltisi içerisine 2 mM SDS ve 10 mM pirol eklenerek üçlü elektrot sisteminin çözeltiye daldırılması ile gerçekleştirilmiştir. -1 ile 1.5V potansiyel taraması ve 50 mV/s tarama hızı ile farklı döngü sayılarında pirolün elektrot yüzeyine film oluşturması sağlanmıştır. Polimerizasyon süresi 10, 15 ve 20 döngü olmak üzere üç farklı elektrot hazırlanmıştır.

4.3.2. Pirol Konsantrasyonu

Pirol konsantrasyonunun, biyosensörün nitrite verdiği yanıtı etkisini incelemek için dört farklı pirol konsantrasyonunda elektrot hazırlanmıştır. Kaplama, 15 mL poliglutaraldehit çözeltisi içerisine 2 mM SDS ve 6, 10, 14, 18 mM pirol eklenerek üçlü elektrot sisteminin çözeltiye daldırılması ile gerçekleştirilmiştir. -1 ile 1.5V potansiyel taraması ve 50 mV/s tarama hızı ile 15 döngü olmak üzere elektrot yüzeyine pirolün elektropolimerizasyonu sağlanmıştır.

4.3.3. pH

Ölçümlerde kullanılan fosfat tamponunun biyosensörün yanıtına etkisinin incelenmesi için 6, 6.5, 7, 7.5 ve 8.3 olmak üzere beş farklı pH değerinde fosfat tamponu hazırlanmıştır.

Çalışma elektrotu; PGA içerisinde, 2 mM SDS, 14 mM pirol ile 15 döngü boyunca potansiyel uygulanması ile hazırlanmıştır. Çalışma elektrotu 3 saat

glutaraldehit çözeltisinde bekletilmiş daha sonra üzerine enzim damlatılarak bir gece 4°C’de bekletilmiştir.

Farklı pH’larda kullanılmak üzere birden çok elektrot aynı koşullarda hazırlanmıştır.

4.3.4. SDS Konsantrasyonu

Pirolün iletkenliğini etkileyen SDS; elektrot yüzeyine PPy/PGA film oluşumu için hazırlanan çözeltinin içerisine 1.5, 2, 2.5 ve 3 mM olmak üzere dört farklı konsantrasyonunda SDS eklenerek optimize edilmiştir. Elektrotlar, 14 mM pirol ile 15 döngüde kaplanmıştır daha sonra 3 saat glutaraldehit çözeltisinde bekletilmiş ve üzerine enzim damlatılarak bir gece 4°C’de bekletilmiştir.

4.3.5. Glutaraldehitte Bekletme Süresi

Enzimin; PPy/PGA/GCE yüzeyine immobilizasyonunu etkileyen glutaraldehitte bekletme süresi optimize edilmiştir. PPy/PGA/GCE elektrotunu, Bölüm 4.2.2.’de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Pirolün elektrot yüzeyine elektropolimerizasyonundan sonra elektrotlar 1.5, 3, 6 ve 24 saat %25’lik glutaraldehit çözeltisinde 100 rpm’de karıştırılarak bekletilmiştir. Daha sonra üzerine enzim damlatılarak bir gece 4°C’de bekletilmiştir.

4.4. Biyosensör Karakterizasyonu

Optimum koşullarda kaplanmış olan nitrit biyosensörü ile nitrit kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur ve biyosensörün belirleme limiti, hassasiyet ve kararlılık parametreleri üzerinden karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

4.4.1. Belirleme Limiti

Belirleme limiti; aynı konsantrasyondaki analitin elektrolit içerisine ard arda eklenmesi ile oluşan akım değişimlerinin standart sapmasının (s_b), oluşturulan kalibrasyon eğrisinin eğimine (m) bölümünün 3 katıdır.

$$LOD = \frac{3sb}{m} \quad (4.1)$$

Belirleme limiti biyosensörün tespit edebileceği en küçük analit konsantrasyonunu ifade eder.

4.4.2. Hassasiyet

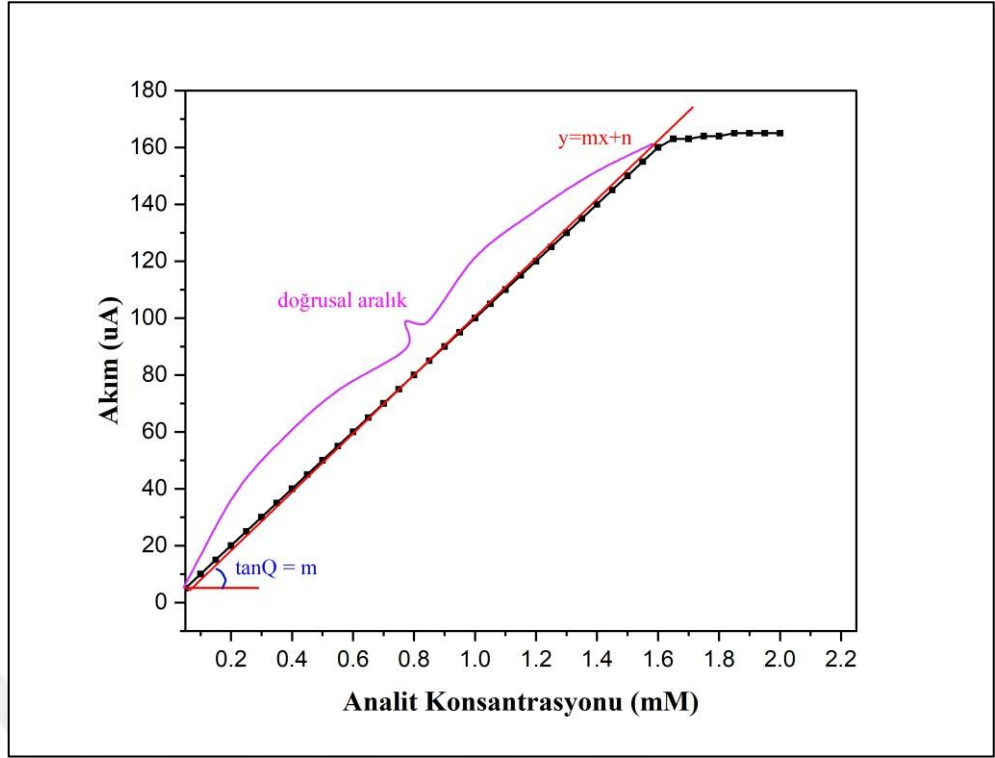
Biyosensör hassasiyeti, dönüştürülmüş sinyal yoğunluğu ile değişen biyoanalit konsantrasyonu arasındaki bir ilişki olarak tanımlanır. Yüksek hassasiyete sahip biyosensörler, bir numunenin konsantrasyonunda küçük dalgalanmalarla yanıt üretebilir. Kalibrasyon eğrisinin eğimi hassasiyet değerini verir.

4.4.3. Kararlılık

Kararlılık, biyolojilama sisteminin içindeki veya etrafındaki olumsuzluklara karşı duyarlılık derecesidir. Bu olumsuzluklar ölçüm altındaki bir biyosensörün çıkış sinyallerinde kaymaya neden olabilir. Bunun neticesinde ölçülen derişimde biyosensörün hassasiyet ve doğruluğunda hatalar olabilir.

Reaksiyon ortamına aynı konsantrasyonda analit eklenmesi ile elde edilen akım değerlerinin standart sapması kararlılığı göstermektedir.

Şekil 4.2’de kalibrasyon eğrisi ve biyosensör karakteristiğinin şematik gösterimi verilmiştir.

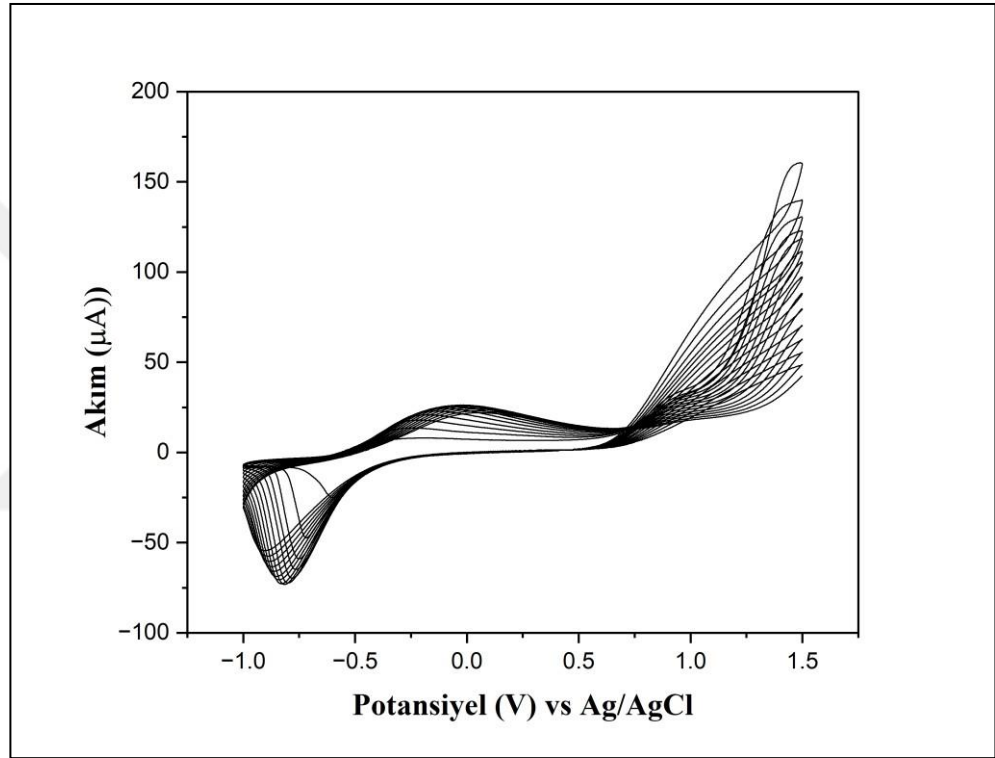


Şekil 4.2: Kalibrasyon eğrisi ve biyosensör karakteristiğinin şematik gösterimi.

5. BULGULAR ve TARTIŞMA

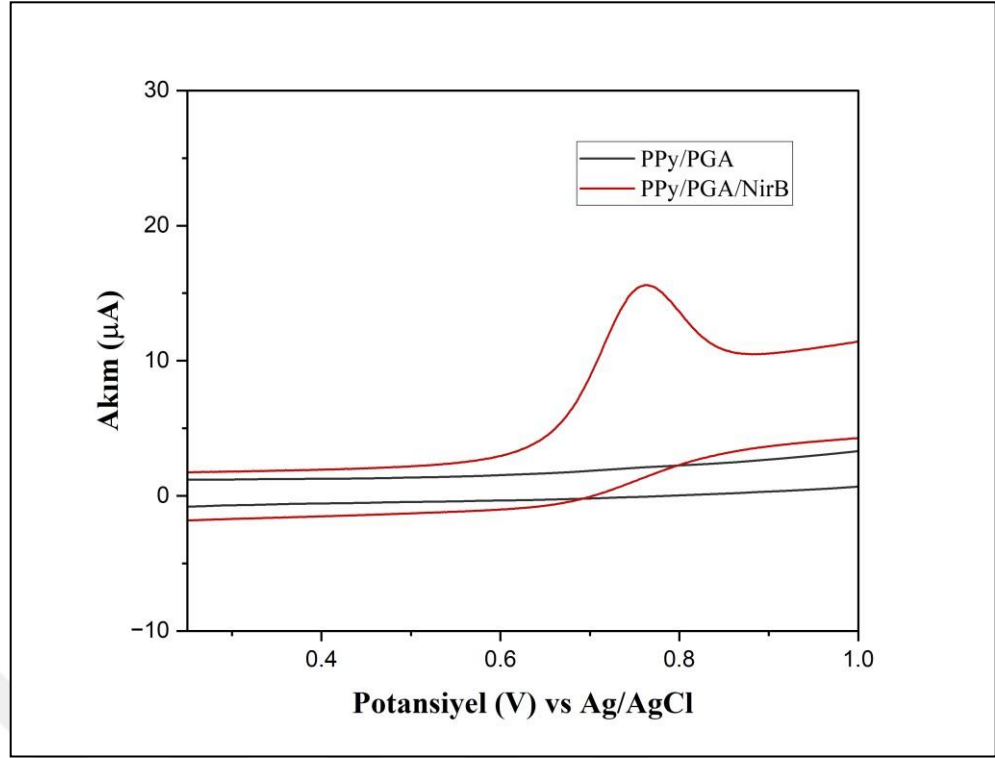
5.1. GCE/PPy/PGA/NirB Çalışma Elektroduna Ait Film Karakterizasyonu

GCE/PPy/PGA/NirB elektrotu Bölüm 4.2.2.'de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Pirolün elektrot yüzeyine elektropolimerizasyonuna ait dönüşümlü voltametri grafiği Şekil 5.1'de verilmiştir.



Şekil 5.1: Pirolün elektropolimerizasyonuna ait dönüşümlü voltametri grafiği (tarama hızı: 50 mV/s).

Pirol filminin camısı karbon elektrot üzerine tamamen aynı koşullarda elektropolimerize edildiği iki elektrot hazırlanmıştır. Hazırlanan elektrotlardan birine NirB enzimi glutaraldehit ile çapraz bağlanarak immobilize edilmiştir. Diğer elektrotta enzim eklenmemiştir. Bu iki elektrot ile NO_2^- varlığında döngüsel voltametri grafikleri alınmıştır (Şekil 5.2). GCE/PPy/PGA elektrodunun aksine enzim immobilize edilmiş elektrotun 0.8 V potansiyelde anodik pik oluşturduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, PGA/PPy'nin, NirB'nin GC elektrot yüzeyinde immobilizasyonu için bir destek matrisi olarak başarılı bir şekilde hareket ettiğini ve NirB ile elektrot arasındaki elektron transferini sağladığını göstermiştir.



Şekil 5.2: Polipirol/Poliglutaraldehit film tabakası (GCE/PPy/PGA) ve enzim tutuklu (GCE/PPy/PGA/NirB) elektrotların nitrit varlığındaki CV görüntüleri (tarama hızı: 50 mV/s).

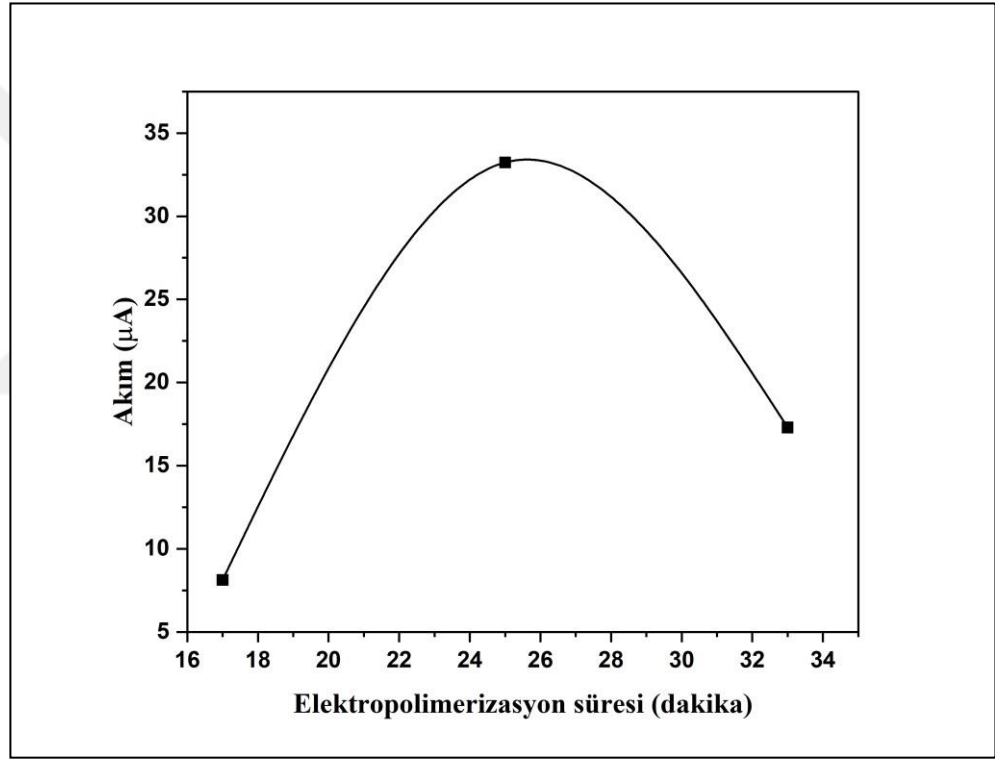
5.2. Optimizasyon Çalışmaları

GCE/PPy/PGA/NirB çalışma elektrotu ile yapılan tüm nitrit ölçümleri üçlü elektrot sisteminde, 100 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Deneyler oda sıcaklığında yürütülmüştür. Ölçümler 12 mL hacimde fosfat tamponu (PBS) içeren hücrelerde yapılmış ve ölçüm öncesinde 10 dk boyunca N_2 ile muamele edilmiştir. N_2 akışı sistemde devamlı olarak tutulmuş ve ölçümler bitene kadar kesilmemiştir. PBS içerisine 3 mM MV ve farklı konsantrasyonlarda NO_2^- eklemeleri yapılmıştır. Döngüsel voltametri grafiğindeki anodik pikin olduğu 0.8 V'daki akım değerlerindeki değişimler ölçülmüş ve biyosensör için optimum koşullar belirlenmiştir. Optimizasyon çalışmalarında immobilize edilen enzimlerin protein içeriği ve aktivitesi farklı olmakla beraber her bir parametreyi özellikteki enzim kullanılarak yapıldığı için sonuçlar etkilenmemiştir.

5.2.1. Pirolün Elektropolimerizasyon Süresinin Akıma Etkisi

Elektrot yüzeyine kaplanan polimerlerin oluşturduğu filmin kalınlığı, iletkenlik ve enzimin immobilizasyonu açısından önemlidir ve kaplama koşulları optimize edilmelidir. Pirolün elektropolimerizasyon süresi kapsamında 3 farklı döngü sayısında 3 farklı elektrot kaplanmıştır.

Çalışma ortamına 3 mM MV ve 2 mM NO_2^- eklemesi yapılarak akım değerlerindeki değişim grafiğe geçirilmiştir. Şekil 5.3; çalışma elektrotunun -1V ile 1.5V potansiyel taraması arasında farklı elektropolimerizasyon süreleriyle hazırlanmasının akıma olan etkisini göstermektedir.

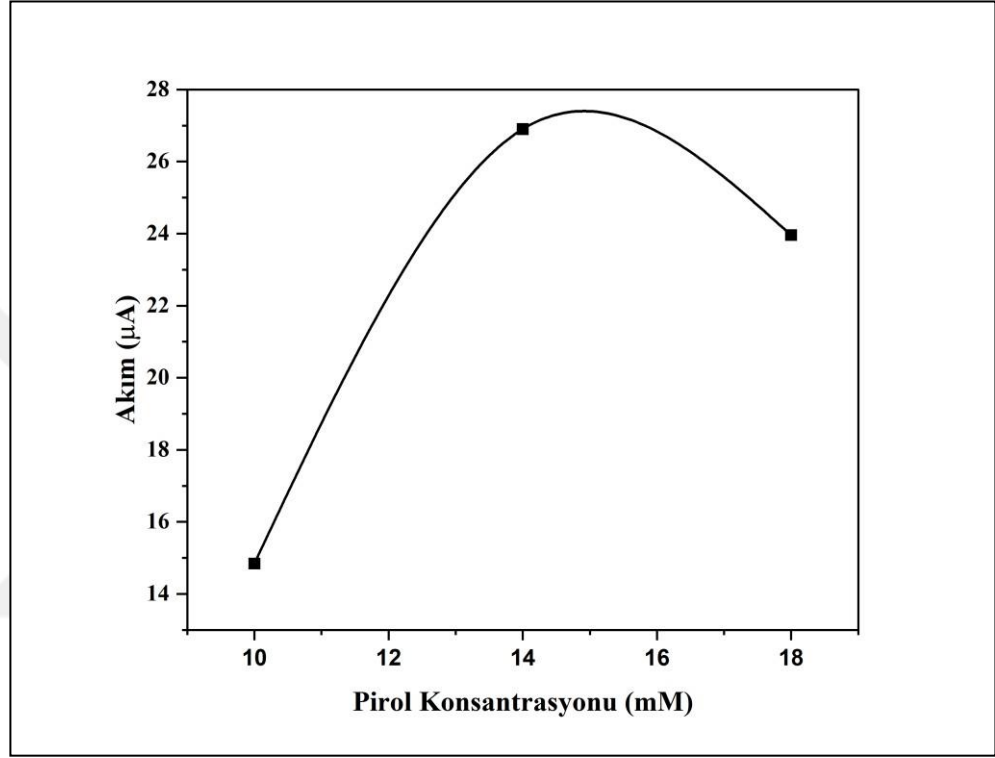


Şekil 5.3: Pirolün elektropolimerizasyon süresinin etkisi.

Döngü sayısının optimizasyonunda; 10, 15 ve 20 döngü ile kaplanmış elektrotların nitrite verdikleri yanıtlar dikkate alındığında en yüksek akım değerini 15 döngü ile kaplanmış çalışma elektrotu vermiştir. Bundan sonraki deneylerde de 15 döngü ile elektrot yüzeyine PPy/PGA film tabakası kaplanmıştır. Deneyde 5 döngü ile kaplanmış elektrotta hazırlanmıştır fakat elektrot nitrite yanıt vermemiştir.

5.2.2. Pirol Konsantrasyonunun Akıma Etkisi

Dört farklı pirol konsantrasyonunda elektrotlar hazırlanmıştır ve çalışma ortamına 3 mM MV ve 2 mM NO_2^- eklemesi yapılarak akım değerlerindeki değişim grafiğe geçirilmiştir. Şekil 5.4; farklı pirol konsantrasyonlarında hazırlanmış elektrotların nitrite verdiği yanıtı göstermektedir.

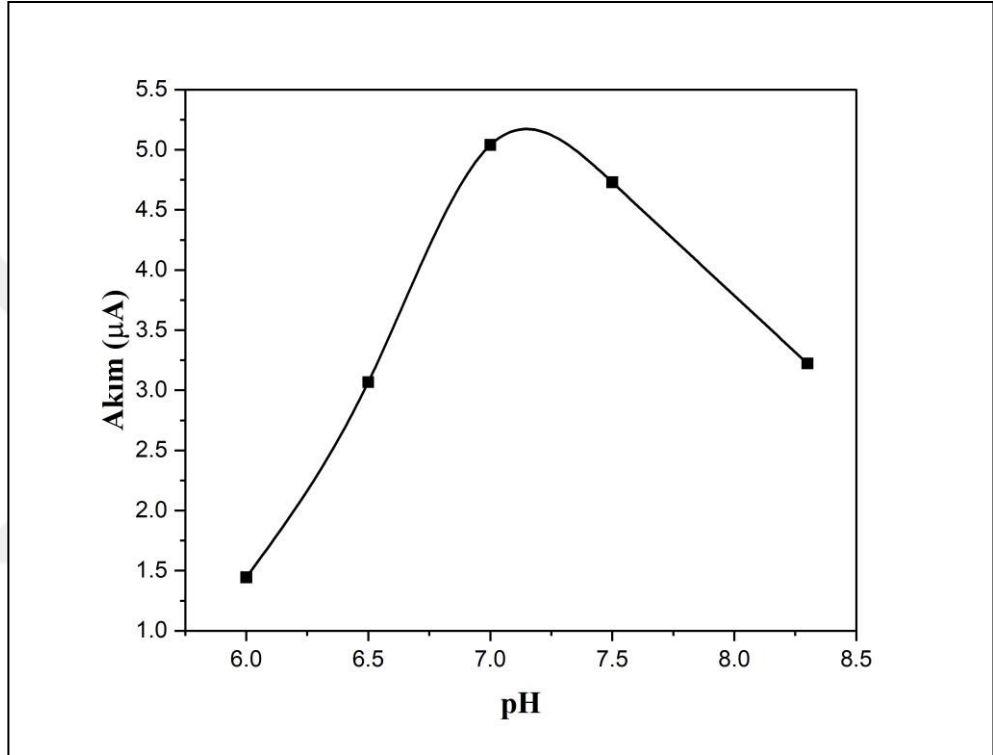


Şekil 5.4: Pirol konsantrasyonunun etkisi.

6 mM pirol ile kaplanan elektrot, ilk deneyde 14 mM pirol ile kaplanmış elektrottan daha yüksek akım değerleri vermiştir. Fakat ilk kullanımdan sonra elektrot yüzeyindeki kaplama reaksiyon hücresi içerisine akmıştır ve elektrot daha sonra kullanılamamıştır. 10, 14 ve 18 mM pirol ile kaplanmış elektrotlar incelendiğinde nitrite en iyi cevabı 14 mM pirol ile kaplanmış elektrotun verdiği ve daha uzun süreli kullanımının olduğu gözlenmiştir. 18 mM ile kaplanmış elektrotun sinyalleri daha sonraki ölçümlerde değişkenlik göstermiştir. Bu nedenle 14 mM pirolün en uygun pirol konsantrasyonu olduğuna karar verilmiştir. Bundan sonraki deneylerde bu konsantrasyon kullanılmıştır.

5.2.3. pH Değerinin Akıma Etkisi

Aynı koşullar ile kaplanmış elektrotlar; enzim immobilizasyonundan sonra distile su ile yıkanmış ve farklı pH'larla hazırlanmış PBS içerisinde 4°C'de tutulmuşlardır. Ölçümler 6, 6.5, 7, 7.5 ve 8.3 olmak üzere beş farklı pH değerinde fosfat tamponu ile yürütülmüştür. Çalışma ortamına 3 mM MV ve 2 mM NO₂⁻ eklemesi yapılarak akım değerlerindeki değişim grafiğe geçirilmiştir.

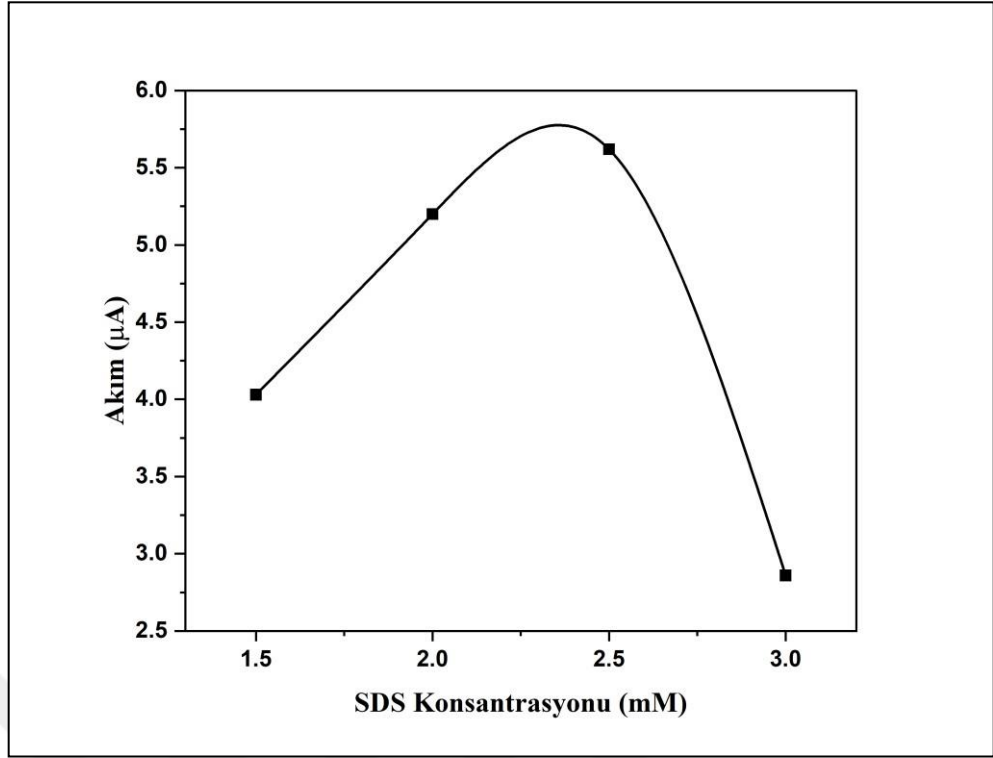


Şekil 5.5: pH'ın etkisi.

Şekil 5.5'de gösterilen pH-Akım grafiğine göre en yüksek akım pH'sı 7.1 olan elde edilmiştir. Bundan sonraki deneylerde fosfat tamponunun pH değeri 7.1 olarak ayarlanmıştır.

5.2.4. SDS Konsantrasyonunun Etkisi

Dört farklı SDS konsantrasyonunda elektrotlar hazırlanmıştır ve çalışma ortamına 3 mM MV ve 2 mM NO₂⁻ eklemesi yapılarak akım değerlerindeki değişim grafiğe geçirilmiştir. Deneyler fosfat tamponu (pH=7.1) içerisinde yürütülmüştür.



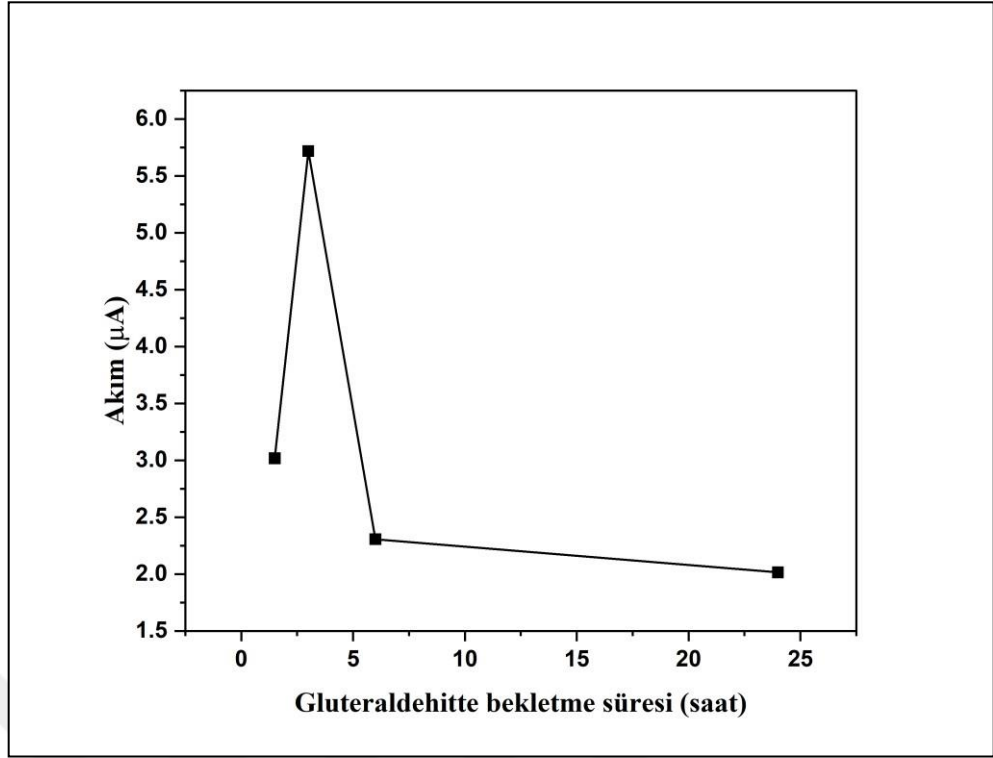
Şekil 5.6: SDS konsantrasyonunun etkisi.

1.5, 2, 2.5 ve 3 mM SDS ile kaplanmış elektrotların ölçümü sonucunda çizilen SDS-Akım grafiğinde (Şekil 5.6), 2.35 mM SDS konsantrasyonunun nitrite en iyi yanıt verdiği görülmüştür. Bundan sonraki deneylerde SDS konsantrasyonu 2.35 mM olarak ayarlanmıştır.

5.2.5. Glutaraldehitte Bekletme Süresinin Etkisi

PPy/PGA film ile kaplanmış 4 elektrot, 1.5, 3, 6 ve 24 saat glutaraldehit çözeltisinde 100 rpm'de karıştırılarak tutulmuştur ve elektrot yüzeyine enzim damlatılarak çalışma elektrotları hazırlanmıştır. Çalışma ortamına 3 mM MV ve 2 mM NO_2^- eklemesi yapılarak akım değerlerindeki değişim grafiğe geçirilmiştir.

Nitrite verilen yanıt incelendiğinde, 3 saat glutaraldehit çözeltisinde bekletilerek hazırlanan elektrotun Şekil 5.7'de gösterildiği gibi en iyi sonucu verdiği görülmektedir.

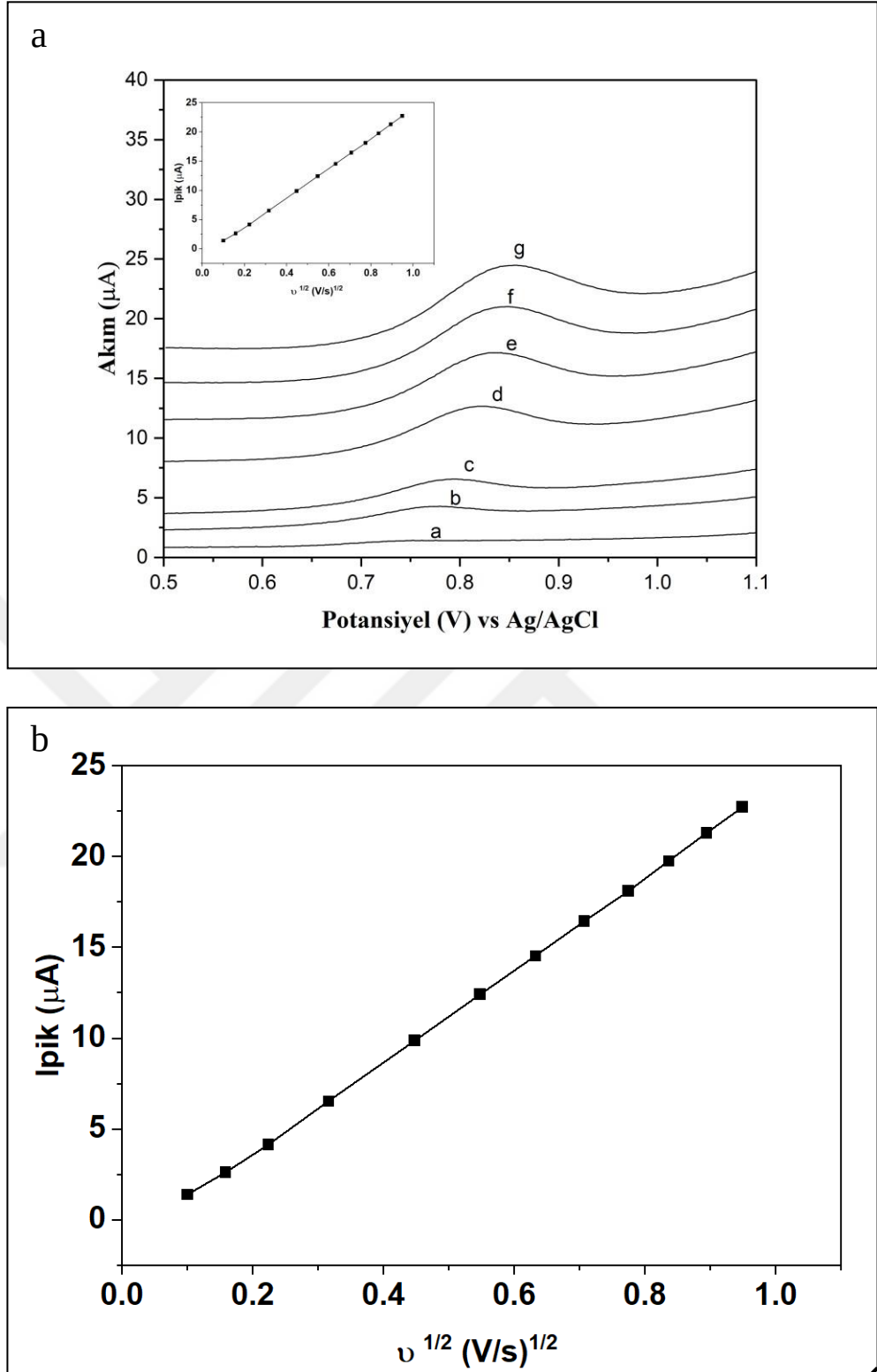


Şekil 5.7: Gluteraldehitte bekletme süresinin etkisi.

5.3. Tarama Hızının Etkisi

Şekil 5.8 a)'da, farklı tarama hızında, 2 mM NO_2^- varlığındaki 0.05 M PBS (0.05 M KCl içermekte, pH=7.1) içerisinde, GCE/PPy/PGA/NirB için dönüşümlü voltametri grafikleri gösterilmiştir. Sırasıyla; 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 ve 0.9 V/s tarama hızlarında dönüşümlü voltametri grafikleri alınmıştır.

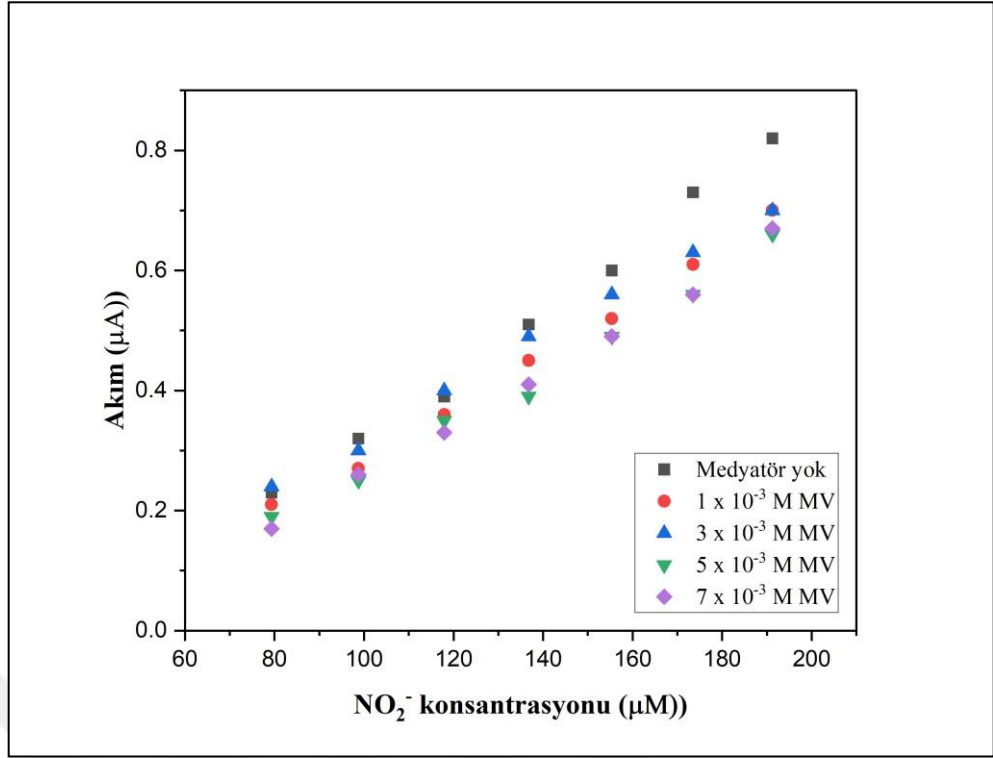
Şekil 5.8a)'daki farklı tarama hızlarındaki grafiklerin pik noktaları dikkate alınarak oluşturulan I_{pik}/v grafiğinin daha büyütülmüş hali Şekil 5.8 b)'de verilmiştir. Anodik pikler ($R^2 = 0.9982$), tarama hızının karekökü ile doğrusal olarak artış göstermiştir. Bu durum elektrot yüzeyine immobilize edilmiş NirB'nin elektrot reaksiyonunun büyük ölçüde difüzyon kontrol prosesi ile kontrol edildiğini gösterir.



Şekil 5.8: a) GCE/PPy/PGA/NirB elektrodunun çeşitli tarama hızlarında nitrite verdiği yanıtlar (a'dan g'ye sırasıyla 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 V/s) b) Tarama hızının kareköküne karşı anodik tepe akımı grafiği.

5.4. Medyatörün Etkisi

Medyatör varlığında elektrodun nitrite tepkisi incelenmiştir. Deneylerin ilk aşamalarında, aracı olarak metil violojen (MV) kullanılmıştır. Şekil 5.9, MV yokluğu ve farklı konsantrasyonda MV varlığında farklı konsantrasyonlarda NaNO_2 'nin ortama art arda eklenmesi üzerine 0.8 V'de GCE/PPy/PGA/NirB'nin amperometrik tepkisini göstermektedir. Oluşturulan kalibrasyon eğrilerine bakılarak hassasiyetin metil violojen yokluğunda metil violojen varlığından daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Almeida ve arkadaşları da 2007 yılında yaptıkları çalışmada mediatör miktarı arttıkça hassasiyetin azaldığını ancak lineer yanıt aralığının genişlediğini belirtmişlerdir. Fakat çalışmada bu durumun neden kaynaklandığı belirtilmemiştir. Bu konu ile ilgili mekanizmanın daha detaylı incelenmesi gerekmektedir. NirB enzimini kısmen saflaştırarak karektrizasyonunun yapıldığı başka bir çalışmada ise NADH bağımlı nitrit redüktazın demir ve sülfür içerikli yapılar (FeS) taşıdığı belirlenmiştir [Jackson et al., 1981]. Çalışmalarda, enzim aktivitesini ölçmek üzere NADH veya MV kullanılmış olmakla beraber enzimin yapısındaki FeS sayesinde ortamda elektron verici olmadığı durumlarda da çalışabileceği belirtilmiştir. Sonraki deneylerde metil violojen kullanılmamıştır. Şekil 3.7'deki çalışma prensibinin geçerli olduğu görülmüştür.

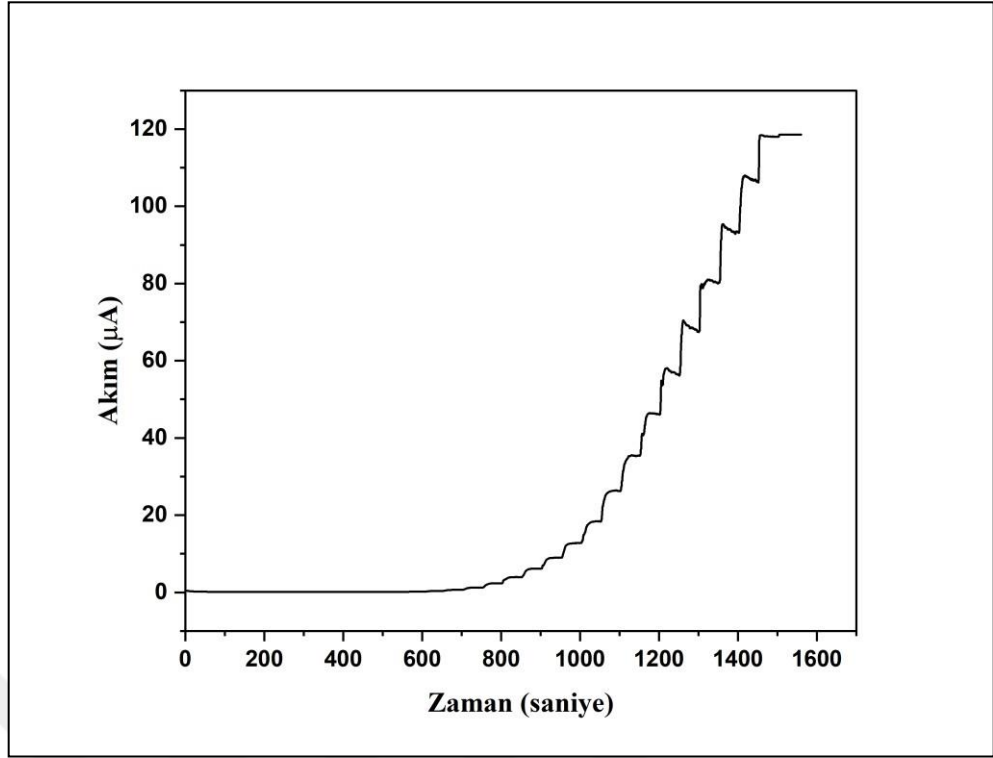


Şekil 5.9: Metil violejenin nitrit ölçümüne etkisi.

5.5. Biyosensörün Karakterizasyonu

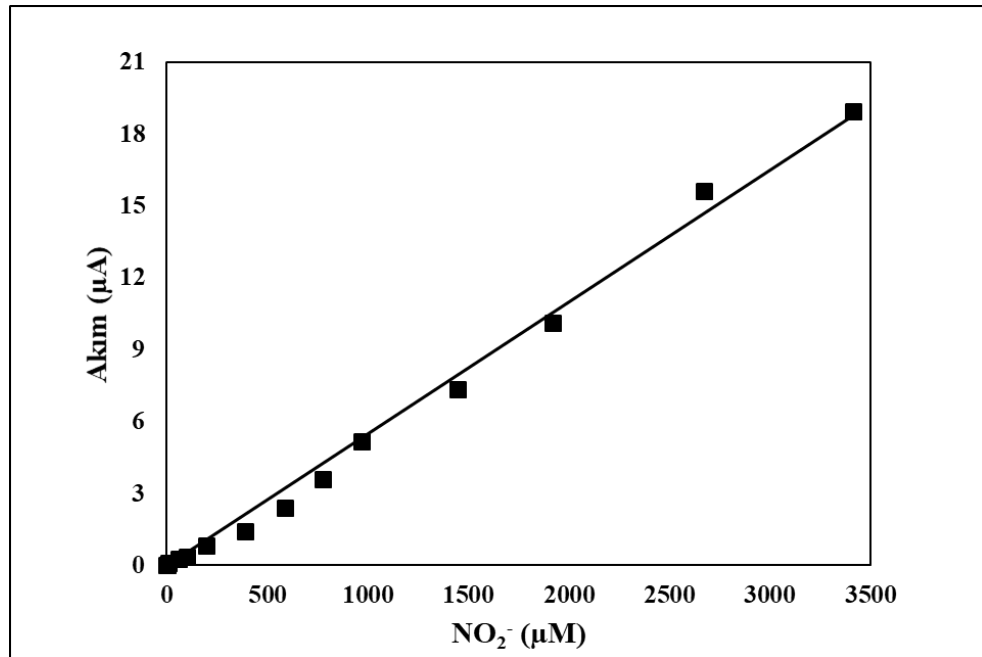
5.5.1. Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Bölüm 4.2.2.' de anlatıldığı gibi hazırlanan GCE/PPy/PGA/NirB elektrotunun amperometrik ölçümleri 0.8 V çalışma potansiyeli uygulanarak, 100 rpm karıştırma hızında ve N₂ akışı sistemde sürekli tutularak yapılmıştır. Deneyde aracı madde kullanılmamıştır. 0.05 M KCl içeren 0.05 M fosfat tamponunun (pH 7.1) 12 mL'sine 50 saniye aralıklarla, 1 μM – 10 mM aralığında artan konsantrasyonda NO₂⁻ eklemeleri yapılmıştır. NO₂⁻ eklemeleri ile gözlemlenen akım değerlerindeki değişim zamana bağlı olarak görüntülenmiştir. Nitrit eklemeleri 400. saniyede başlamıştır. Elektrot, 3.5 mM nitrit konsantrasyonuna kadar lineer cevap vermiş fakat sonraki eklemelerde kararsız davranmış ve amperometrik gürültüler gözlenmiştir. Elde edilen akım-zaman grafiği Şekil 5.10'da verilmiştir. Hazırlanan çalışma elektrotu 10 saniyeden kısa yanıt süresiyle (t_{95%}) oldukça kararlı ve hızlıydı.



Şekil 5.10: GCE/PPy/PGA/NirB elektrodundan nitrit eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği (çalışma potansiyeli: 0.8V)

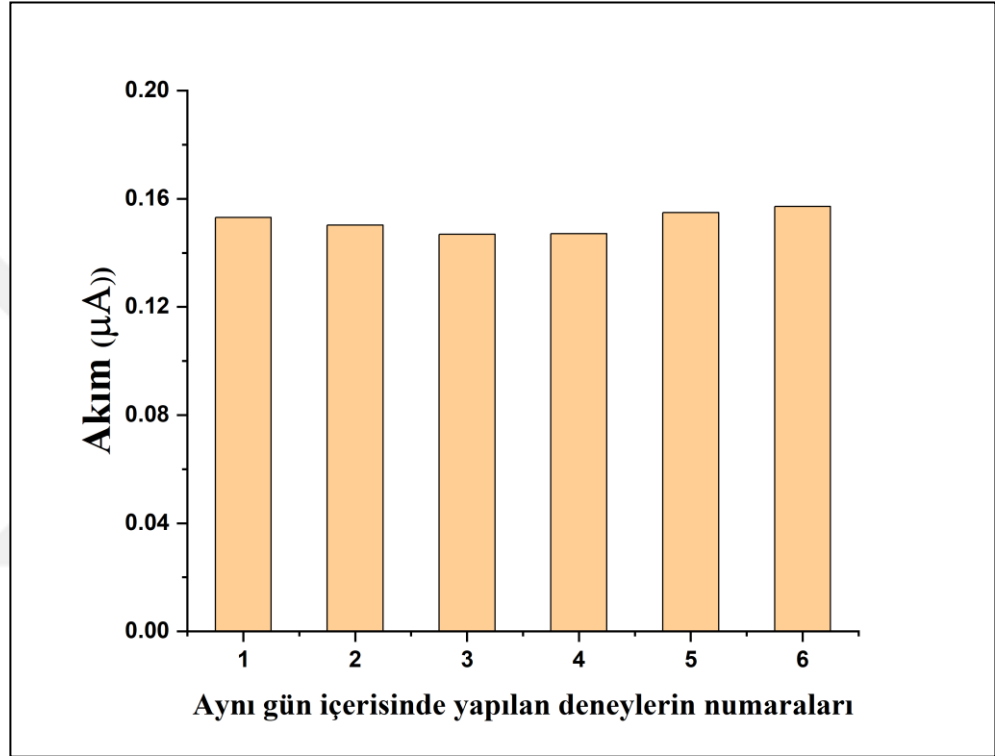
Elde edilen akım-zaman grafiğinden yola çıkılarak nitrit kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Eğri, elektrotun lineer yanıt verdiği 3500 μM nitrit konsantrasyonuna kadar oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisi Şekil 5.11’de verilmiştir.



Şekil 5.11: Nitrit kalibrasyon eğrisi.

Elektrot, $I (\mu A) = 0,0055 (\mu M)$ ($R^2=0,9935$) regresyon denklemiyle 1–3500 μM arasında nitrit konsantrasyonu ile doğrusal bir ilişki göstermiştir. Biyosensörün hassasiyeti ve belirleme limiti sırasıyla 77.81 mA/M.cm² ve 2.7 μM bulunmuştur.

Elektrodun kararlılığını gözlemlemek için aynı gün ve farklı günlerde elektrotun nitrite tepkisi incelenmiştir. Şekil 5.12'de görüldüğü gibi sisteme 200 μM nitrit ilavesi yapılmış ve mevcut değişimler kaydedilmiştir. Aynı gün yapılan deneylerde sadece %4'lük bir değişimle iyi kararlılık görülmüştür.



Şekil 5.12: Elektrotun aynı gün içerisinde farklı setlerde 200 μM nitrite verdiği yanıtlar.

Elektrot yüzeyinde tutuklanan enzimin ne kadar olduğunu belirlemek üzere protein miktarı ölçümleri yapılmıştır. Hazırlanan elektrotun bağlanmamış enzimlerin uzaklaşması için yıkanması, ve dolapta bekletilmesine süreci ile ölçüm öncesi yıkama ve ölçüm esnasında kullanılan tamponlardaki protein miktarı belirlenmiştir. Kullanılan toplam tampon hacmi 16.5 ml'dir. Ne kadar enzimin sızdığını anlamak için 16.5 ml tampon içerisine tutuklama işlemi sırasında eklenen enzim miktarı kadar (7.5 μl) enzim damlatılmıştır ve karşılaştırma yapılmıştır. Sonuçlara göre elektrot yüzeyine eklenen enzimden sadece %18'i elektrot yüzeyinde kalmıştır. Tablo 5.1'de süreçlere göre hesaplanan protein miktarları verilmiştir.

Tablo 5.1: Protein miktarları.

Elektrot üzerine damlatılan protein miktarı (ug/ml)	81.06
İlk yıkamada elektrot yüzeyinden akan protein miktarı (ug/ml)	6.24
Tampon içerisinde beklerken akan protein miktarı (ug/ml)	2.1
Ölçüm öncesi elektrot yıkanırken akan protein miktarı (ug/ml)	6.12
Ölçüm esnasında tampona karışan protein miktarı (ug/ml)	51.65
Ölçüm sonrası elektrot yüzeyindeki protein miktarı (ug/ml)	15.26

Elde edilen bulguların diğer çalışmalarla kıyaslanması Tablo 5.2’de yapılmıştır.

Tablo 5.2: Enzim tabanlı amperometrik nitrit biyosensörleri literatür bulguları.

Enzim	Elektrot	Doğrusal Aralık	Belirleme Limiti	Hassasiyet	Referans
Mb	GC/ZrPNS/Mb	3-800 mM	700 μ M	-	Zhang,2008
Hb	Au nano partikül/Hb	0.4-14.8 μ M	0.065 μ M	-	Hong,2009
HRP	Co ₃ O ₄ nano tabaka/grafen oksit/GCE/HRP	1-5400 μ M	0.21 μ M	-	Liu,2017
SOD1	Pt elektrot/ CNT/PPy/NaR/SOD1	100 nM- 1mM	50 nM	-	Madasamy, 2014
Cyt C	GCE/MWCNT/PAMAM/ Chit/Cyt C	1-29 μ M ve 29-254 μ M	0.01 μ M	-	Chen,2009
Cyt C	GCE/MWCNT/TiN/Cyt C	1-2000 μ M	0.0014 μ M	121.5 μ A/ μ M.cm ²	Haldorai, 2016
NiR	Au elektrot/1 Metoksi PMS/NiR	0-1 mg/L	0.01 mg/L	-	Sasaki,1998
ccNiR	GCE/Poli(Pirol- Violojen)/ccNiR	5,4-43,4 μ M	5,4 μ M	1721 mA/M.cm ²	Silva, 2004
NiR	GCE/PVA/MV/NiR/PAH/ HPU	1.5-260 μ M	1.5 μ M	11.8 nA/ μ M	Quan,2006
ccNiR	Nafion iyonomerik matris/MV/ccNiR	75-800 μ M	60 μ M	445 mA/M.cm ²	Almeida, 2007
ccNiR	GCE/[ZnCr-AQS]/ccNiR	0.015-2.35 μ M	4 nM	1.8 A/M.cm ²	Chen,2007
ccNiR	Pirolitik Grafit/ccNiR	0.25-50 μ M	120 nM	430 mA/M.cm ²	Silveira, 2010
Cyt-cd1	PVA/CPSPE/Cyt-cd1	10-200 μ M	7 μ M	2.49 A/ μ M.cm ²	Serra,2011
ccNiR	CPSPE/ccNiR	0.7-370 μ M	-	0.55 A/M.cm ²	Monteiro, 2015
ccNiR	PPy/SPCE/Au nanopartikül/ccNiR	0.1-1600 μ M	60 nM	0.172 μ A/ μ M.cm ²	Santharaman, 2017
NirB	GCE/PPy/PGA/NirB	1-3500 μM	2.7 μM	77.81 mA/M.cm²	Bu çalışma

6. SONUÇ

Nitrit, çeşitli azotlu atık sularda yaygın olarak bulunan, oldukça toksik ve patojenik bir kirleticidir. Bu nedenle, su kirliliğini önlemek ve insan sağlığını korumak için hızlı ve kararlı nitrit tespiti acil ihtiyaç vardır. Elektrokimyasal biyosensörler, hızlı yanıt verme süreleri, yüksek hassasiyetleri, kullanım kolaylığı, taşınabilirlikleri ve gerçek zamanlı algılama gibi çeşitli yetenekleriyle ilgi çekmiş ve gerçek zamanlı nitrit izleme için en umut verici araç olarak zaman içerisinde çalışma sayısı artarak geliştirilmiştir. Nitrit biyosensörlerinde, nitrit redüktaz enzimleri en sık kullanılan biyoreseptörlerdir. Literatürde rapor edilen nitrit biyosensörleri çeşitli polimerler ve aracı maddeler ile birlikte farklı immobilizasyon teknikleri ile geliştirilmiştir. Aracı madde kullanılmadan yapılan nitrit biyosensörleride bildirilmiştir.

Bu çalışmada, ekibimiz tarafından daha önce pET28 vektöründe klonlanmış olan *E. coli* NADH bağımlı nitrit redüktaz B (NirB) enzimi biyoreseptör olarak kullanılmıştır. Polipirol (PPy), camı karbon elektrot yüzeyinde poliglutaraldehit (PGA) ile kopolimerize edilmiştir. Glutaraldehit çözeltisi kullanılarak enzimin PPy/PGA film yüzeyine immobilize edilmesi sağlanmıştır. Geliştirilen bu biyosensör ile nitritin amperometrik tayini N₂ gazı altında yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlar maddeler halinde verilmiştir.

- i) Döngüsel voltametri çalışmalarında biyosensörün nitrite 0.8V'da tepki verdiği görülmüş ve amperometrik yanıt 0.8V'luk çalışma potansiyelinde gerçekleştirilmiştir.
- ii) Deneylerin ilk aşamalarında aracı madde olarak metil violojen kullanılmış ve biyosensör hassasiyetinin metil violojen yokluğunda metil violojen varlığından daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Sonrasında yapılan deneylerde metil violojen kullanılmamıştır. Geliştirilen bu biyosensör üçüncü nesil amperometrik biyosensördür.
- iii) Pirol filminin kalınlığı için yapılan optimizasyon çalışmalarında en iyi akım değeri 15 döngü ile kaplanan elektrotta görülmüştür. -1V ile 1.5V aralığında 15 döngü şeklinde gerçekleştirilen elektropolimerizasyon 25 dakika sürmektedir.
- iv) Pirol konsantrasyonunun optimizasyonunda 14 mM pirol varlığında hazırlanan elektrotun en iyi akım değerlerini sağladığı görülmüştür.

- v) Biyosensörün en uygun çalışma ortamının bulunması için farklı pH değerlerinde fosfat tamponu ile deneyler yapılmış ve yapılan deneyde biyosensör için en uygun pH değeri 7.1 olarak belirlenmiştir.
- vi) Elektropolimerizasyon işleminin daha sağlıklı yürütülebilmesi için kullanılan SDS'in optimizasyonu yapılmıştır. 2.35 mM SDS varlığında hazırlanan elektrotun en iyi akım değerlerini sağladığı görülmüştür.
- vii) Glutaraldehit içerisinde bekleme süresi optimize edilmiştir ve en iyi sonuçlar 3 saatlik bekleme süresinde alınmıştır.
- viii) Tarama hızı etkisi incelenmiştir ve elektrot yüzeyine immobilize edilmiş NirB'nin elektrot reaksiyonunun büyük ölçüde difüzyon kontrol prosesi ile kontrol edildiği görülmüştür.
- ix) Biyosensör yanıt süresi 10 saniye ve hassasiyeti 77.81 mA/M.cm²'dir.
- x) Biyosensörün belirleme limiti ve doğrusal aralığı sırasıyla; 2.7 µM ve 1–3500 µM olarak bulunmuştur.

Elde edilen sonuçlara bakıldığında geliştirmiş olduğumuz biyosensörün literatürdeki diğer nitrit biyosensörleri ile karşılaştırıldığında hassasiyet değerinin daha düşük olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra yanıt süresi, belirleme limiti ve doğrusal aralığı diğer çalışmalar ile benzer veya daha iyidir.

Öneriler ve gelecek çalışmalar: Poli(allilamin hidroklorür) gibi farklı polimerler kullanılarak ve tutuklama metodları optimize edilerek uzun süre kararlılığını koruyan veya karbon nanotüp gibi maddelerin kaplamaya eklenmesi ile elektriksel iletkenlik arttırıldığından daha hassas biosensörler geliştirilebilir.. Gelecek çalışmalarda sıcaklık gibi çevresel parametreler ve elektrot yüzeyine tutuklanan enzim miktarı optimize edilerek daha iyi sonuçlar alınabilir.

Tez çalışmasının sonucunda ilk kez saflaştırılmış olan orijinal NirB enziminin, nitrit biyosensörlerinin geliştirilmesi için umut verici bir biyoreseptör olduğu görülmektedir. Elektron vericiye ihtiyaç duymadan nitrit indirgenmesinin gerçekleşiyor olması, diğer bir deyişle enzimi medyatör veya NADH bağımlı olmadan çalışabilmesi geliştirilen biosensörün üçüncü nesil olarak tanımlanan biosensör grubuna sokmaktadır. Bir avantaj olan bu çalışma prensibinin çalışılması ve enzim reaksiyon mekanizmasında enzimin sahip olduğu FeS yapılarının nasıl bir rol oynadığının araştırılması önemlidir. Enzimin daha detaylı karakterizasyonu ile

enzimatik nitrit indirgeme mekanizması daha iyi anlaşılarak yüksek hassasiyetli nitrit biosensörlerinin geliştirilmesi mümkün olabilir.



KAYNAKLAR

Almeida M. G., Silveira C. M., Moura J. J. G., (2010), "Biosensing nitrite using the system nitrite reductase/Nafion/methyl viologen-A voltammetric study", *Sensors*,10, 11530-11555.

Almeida M. G., Silveira C. M., Moura J. J. G., (2007), "Biosensing nitrite using the system nitrite reductase/Nafion/methyl viologen-A voltammetric study", *Biosensors and Bioelectronics*, 22(11), 2485–2492.

Asal M., Özen Ö., Şahinler M., Polatoğlu İ., (2018), "Recent Developments in Enzyme, DNA and Immuno-Based Biosensors", *Sensors* 2018, 18(6), 1924.

Bellavia L., Kim-Shapiro D., Bruce King S., (2015), "Detecting and monitoring NO, SNO and nitrite in vivo", *Future Science*, 1(1).

Bergveld P., (1970), "Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements", *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering*, 17(1), 70–71.

Bhaiyya M., Pattnaik P. K., Goel S., (2021), "A brief review on miniaturized electrochemiluminescence devices: From fabrication to applications", *Current Opinion in Electrochemistry*, 30. 100800.

Cass A. E. G., Davis G., Francis G. D., Allen H., Hill O., Aston W. J., Higgins I. J., Plotkin E. V., Scott L. D. L., Turner A. P. F., (1984), "Ferrocene-Mediated Enzyme Electrode for Amperometric Determination of Glucose", *Analytical Chemistry*, 56(4), 667–671.

Chadha U., Bhardwaj P., Agarwal R., Rawat P., Agarwal R., Gupta I., Panjwani M., Singh S., Ahuja C., Selvaraj S. K., Banavoth M., Sonar P., Badoni B., Chakravorty A., (2022), "Recent progress and growth in biosensors technology: A critical review", *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 109, 21–51

Chen H., Mousty C., Cosnier S., Silveira C., Moura J. J. G., Almeida M. G., (2007), "Highly sensitive nitrite biosensor based on the electrical wiring of nitrite reductase by [ZnCr-AQS] LDH", *Electrochemistry Communications*, 9(9), 2240–2245.

Chen Q., Ai S., Zhu X., Yin H., Ma Q., Qiu Y., (2009), "A nitrite biosensor based on the immobilization of Cytochrome c on multi-walled carbon nanotubes-PAMAM-chitosan nanocomposite modified glass carbon electrode", *Biosensors and Bioelectronics*, 24(10), 2991–2996.

Chukwuka Nnachi R., Sui N., Ke B., Luo Z., Bhalla N., He D., Yang Z., (2022), "Recent progress on biosensors for rapid detection of bacterial pathogens in water, food and environment", *Environment International*, 107357.

Clark L. C., Lyons C., (1962), "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102(1), 29–45.

Coskun O., (2016), "Separation techniques: Chromatography", North Clin Istanbul, 3(2), 156–160.

Da Silva S., Cosnier S., Almeida M. G., Moura J. J. G., (2004), "An efficient poly(pyrrole-viologen)-nitrite reductase biosensor for the mediated detection of nitrite", *Electrochemistry Communications*, 6(4), 404–408.

Danielsson B., (1991), "Calorimetric biosensors", *Biochemical Society Transactions*, 19(1), 26–28.

Erdem E., Karakışla M., Sacak M., (2004), "The chemical synthesis of conductive polyaniline doped with dicarboxylic acids", *European Polymer Journal* 40, 785–791.

Gabriela Almeida M., Serra A., Silveira C. M. Moura J. J. G., (2010), "Nitrite biosensing via selective enzymes-a long but promising route", In *Sensors (Switzerland)* 10(12), 11530–11555.

Gahlaut A., Hooda V., Gothwal A., Hooda V., (2019), "Enzyme-Based Ultrasensitive Electrochemical Biosensors for Rapid Assessment of Nitrite Toxicity: Recent Advances and Perspectives", In *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 49(1), 32–43.

Gerard M., Chaubey A., Malhotra B. D., (2002), "Application of conducting polymers to biosensors", *Biosensors and Bioelectronics*, 17(5), 345–359.

Ghorbani Zamani F., Moulahoum H., Ak M., Odaci Demirkol D., Timur S., (2019), "Current trends in the development of conducting polymers-based biosensors", *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 118, 264–276.

Guilbault G. G., Lubrano G. J., (1973), "An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose", *Analytica Chimica Acta*, 64(3), 439–455.

Guilbault G. G., Montalvo J. G., (1969), "A urea-specific enzyme electrode", *Journal of the American Chemical Society*, 91(8), 2164–2165.

Guo Y., Wang Y., Yang G., Xu J. J., Chen H. Y., (2016), "MicroRNA-mediated signal amplification coupled with GNP/dendrimers on a mass-sensitive biosensor and its applications in intracellular microRNA quantification", *Biosensors and Bioelectronics*, 85, 897–902.

Haldorai Y., Hwang S. K., Gopalan A. I., Huh Y. S., Han Y. K., Voit W., Sai-Anand G., Lee K. P., (2016), "Direct electrochemistry of cytochrome c immobilized on titanium nitride/multi-walled carbon nanotube composite for amperometric nitrite biosensor", *Biosensors and Bioelectronics*, 79, 543–552.

He L., Yang Y., Kim J., Yao L., Dong X., Li T., Piao Y., (2020), "Multi-layered enzyme coating on highly conductive magnetic biochar nanoparticles for bisphenol A sensing in water", *Chemical Engineering Journal*, 384, 123276.

Heineman W. R., Jensen W. B., (2006), "Leland C. Clark Jr. (1918–2005)", *Biosensors and Bioelectronics*, 21(8), 1403–1404.

Hong J., Dai Z., (2009), "Amperometric biosensor for hydrogen peroxide and nitrite based on hemoglobin immobilized on one-dimensional gold nanoparticle", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 140(1), 222–226.

Jackson R. H., Cornish-Bowden A., Cole J. A., (1981), 'Prosthetic groups of the NADH-dependent nitrite reductase from *Escherichia coli* K12', *Biochemical Journal*, 193 (3), 861-867.

Kumar H., Kumari N., Sharma R., (2020), "Nanocomposites (conducting polymer and nanoparticles) based electrochemical biosensor for the detection of environment pollutant: Its issues and challenges", *Environmental Impact Assessment Review*, 85, 106438.

Li M., Wu J., Su H., Tu Y., Shang Y., He Y., Liu H., (2019), "Ionic Liquid-Polypyrrole-Gold Composites as Enhanced Enzyme Immobilization Platforms for Hydrogen Peroxide Sensing", *Sensors* 2019, Vol. 19, Page 640, 19(3), 640.

Liedberg B., Nylander C., Lunström I., (1983), "Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing", *Sensors and Actuators*, 4(C), 299–304.

Liu H., Guo K., Lv J., Gao Y., Duan C., Deng L., Zhu Z., (2017), "A novel nitrite biosensor based on the direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on porous Co₃ nanosheets and reduced graphene oxide composite modified electrode", *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 238, 249–256.

Liu M., Wang Z. Y., Zhang C. Y., (2016), "Recent Advance in Chemiluminescence Assay and Its Biochemical Applications", *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 44(12), 1934–1941.

Madasamy T., Pandiaraj M., Balamurugan M., Bhargava K., Sethy N. K., Karunakaran C., (2014), "Copper, zinc superoxide dismutase and nitrate reductase coimmobilized bienzymatic biosensor for the simultaneous determination of nitrite and nitrate", *Biosensors and Bioelectronics*, 52, 209–215.

Matos-Peralta Y., Antuch M., Abradelo D. G., Bazán-Bravo L., Hernández K. R. de la L., (2019), "Glutamate Dehydrogenase-Based Electrochemical Biosensors: The Immobilization Method Defines Sensor Selectivity", *Journal of The Electrochemical Society*, 166(13), B1146–B1150.

Monnig C. A., Kennedy R. T., (1994), "Capillary Electrophoresis", *Analytical Chemistry*, 66(12), 280–314.

Monteiro T., Rodrigues P. R., Gonçalves A. L., Moura J. J. G., Jubete E., Añorga L., Píknova B., Schechter A. N., Silveira C. M., Almeida M. G., (2015), "Construction of effective disposable biosensors for point of care testing of nitrite", *Talanta*, 142, 246–251.

Moorcroft M. J., Davis J., Compton R. G., (2001), "Detection and determination of nitrate and nitrite: a review", *Talanta*, 54(5), 785–803.

Mosbach K., Danielsson B., (1974), "An enzyme thermistor", *Biochimica et Biophysica Acta*, 364(1), 140–145.

Naresh V., Lee N., (2021), "A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors", *Sensors*, 21(4), 1109.

Nemiwal M., Zhang T. C., Kumar D., (2022), "Enzyme immobilized nanomaterials as electrochemical biosensors for detection of biomolecules", In *Enzyme and Microbial Technology*, 156 (2022) 110006.

Nguyen H. H., Lee S. H., Lee U. J., Fermin C. D., Kim M., (2019), "Materials Immobilized Enzymes in Biosensor Applications", *Materials*, 12, 121.

Ozoner S. K., Can M. Y., Keskinler B., Erhan E., (2009), "A novel Poly(glutaraldehyde-co-pyrrole)/horseradish peroxidase composite film electrode", *Analytical Letters*, 42(18), 3058–3072.

Park J. K., Chang H. N., (2000), "Microencapsulation of microbial cells", *Biotechnology Advances*, 18(4), 303–319.

Quan D., Min D. G., Cha G. S., Nam H., (2006), "Electrochemical characterization of biosensor based on nitrite reductase and methyl viologen co-immobilized glassy carbon electrode", *Bioelectrochemistry*, 69(2), 267–275.

Ramanathan K., Danielsson B., (2001), "Principles and applications of thermal biosensors", *Biosensors and Bioelectronics*, 16(6), 417–423.

Ramanavičius A., Kaušaitė A., Ramanavičiene A., (2005), "Polypyrrole-coated glucose oxidase nanoparticles for biosensor design", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 111–112(SUPPL.), 532–539.

Roederer J. E., Bastiaans G. J., (1983), "Microgravimetric Immunoassay with Piezoelectric Crystals", *Analytical Chemistry*, 55(14), 2333–2336.

Romero O., Filice M., de las Rivas B., Carrasco-Lopez C., Klett J., Morreale A., Hermoso J. A., Guisan J. M., Abian O., Palomo J. M., (2012), "Semisynthetic peptide-lipase conjugates for improved biotransformations", *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 48(72), 9053–9055.

Santharaman P., Venkatesh K. A., Vairamani K., Benjamin A. R., Sethy N. K., Bhargava K., Karunakaran C., (2017), "ARM-microcontroller based portable nitrite electrochemical analyzer using cytochrome c reductase biofunctionalized onto screen printed carbon electrode", *Biosensors and Bioelectronics*, 90, 410–417.

Sasaki S., Karube I., Hirota N., Arikawa Y., Nishiyama M., Kukimoto M., Horinouchi S., Beppu T., (1998), "Application of nitrite reductase from *Alcaligenes faecalis* S-6 for nitrite measurement", *Biosensors Bioelectronics*, 13(1), 1-5.

Sassolas A., Blum L. J., Leca-Bouvier B. D., (2012), "Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors", *Biotechnology Advances*, 30(3), 489–511.

Lakard B., (2020), "Electrochemical biosensors based on conducting polymers: A review", *Applied Sciences*, 10, 6614.

Sepahvand M., Ghasemi F., Seyed Hosseini H. M., (2021), "Plasmonic nanoparticles for colorimetric detection of nitrite and nitrate", *Food and Chemical Toxicology*, 149, 112025.

Serra A. S., Jorge S. R., Silveira C. M., Moura J. J. G., Jubete E., Ochoteco E., Cabañero G., Grande H., Almeida M. G., (2011), "Cooperative use of cytochrome cd1 nitrite reductase and its redox partner cytochrome c552 to improve the selectivity of nitrite biosensing", *Analytica Chimica Acta*, 693(1–2), 41–46.

Sharma S., Hatware K., Bhadane P., Sindhikar S., Mishra D. K., (2019), "Recent advances in microneedle composites for biomedical applications: Advanced drug delivery technologies", *Materials Science and Engineering, C* 103, 10971.

Silveira C. M., Gomes S. P., Araújo A. N., Montenegro M. C. B. S. M., Todorovic S., Viana A. S., Silva R. J. C., Moura J. J. G., Almeida M. G., (2010), "An efficient non-mediated amperometric biosensor for nitrite determination", *Biosensors and Bioelectronics*, 25(9), 2026–2032.

Singh A., Sharma A., Ahmed A., Sundramoorthy A. K., Furukawa H., Arya S., Khosla A., (2021), "Recent Advances in Electrochemical Biosensors: Applications, Challenges, and Future Scope", *Biosensors* 2021, 11(9), 336.

Singh P., Singh M. K., Beg Y. R., Nishad G. R., (2019), "A review on spectroscopic methods for determination of nitrite and nitrate in environmental samples", *Talanta*, 191, 364–381.

Sun J., Zhang X., Broderick M., Fein H., (2003), "Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay", *Sensors*, 3, 276–284.

Suzuki S., Takahashi F., Satoh I., Sonobe N., (1975), "Ethanol and Lactic Acid Sensors Using Electrodes Coated with Dehydrogenase—Collagen Membranes", *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 48(11), 3246–3249.

Tan J. F., Anastasi A., Chandra S., (2022), "Electrochemical detection of nitrate, nitrite and ammonium for on-site water quality monitoring", *In Current Opinion in Electrochemistry*, 125, 737–742.

Titov V. Y., Petrenko Y. M., (2005), "Proposed mechanism of nitrite-induced methemoglobinemia", *Biochemistry (Moscow)*, 70(4), 473–483.

Vishnuvardhan V., Kala R., Prasada Rao T., (2008), "Chemical switch based reusable dual optoelectronic sensor for nitrite", *Analytica Chimica Acta*, 623(1), 53–58.

Wang Q., Yu L., Liu Y., Lin L., Lu R., Zhu J., He L., (2017), "Methods for the detection and determination of nitrite and nitrate: A review", *Talanta*, 165, 709–720.

Wang X., Lu X., Chen J., (2014), "Development of biosensor technologies for analysis of environmental contaminants", *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 2, 25–32.

Yilong Z., Dean Z., Daoliang L., (2015), "Electrochemical and Other Methods for Detection and Determination of Dissolved Nitrite: A Review", In *Int. J. Electrochem. Sci*, 10, 1144 – 1168.

Yılmaz H., İbici H. N., Erdoğan E. M., Türedi Z., Ergenekon P., Özkan M., (2022), "Nitrite is reduced by nitrite reductase NirB without small subunit NirD in *Escherichia coli*", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 134, 393-398.

Yoo E. H., Lee S. Y., (2010), "Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice", In *Sensors*, 10(5), 4558–4576.

Web 1,(2022), <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations> (Erişim Tarihi: 06/12/2022)

Zhang X., Wang Y., Wang Y., Guo Y., Xie X., Yu Y., Zhang B., (2022), "Recent advances in electrocatalytic nitrite reduction", *Chemical Communications*, 58(17), 2777–2787.

Zhang Y., Chen X., Yang W., (2008), "Direct electrochemistry and electrocatalysis of myoglobin immobilized in zirconium phosphate nanosheets film", *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 130(2), 682–688.

Zhu Y., Mei L., Ruan Y., Zhang N., Zhao W., Xu J., Chen H., (2019), "Enzyme-based biosensors and their applications", *Advances in Enzyme Technology*, 201-223.

ÖZGEÇMİŞ

Zeynep TÜREDİ; ilk, orta, lise ve lisans eğitimini İstanbul'da tamamladı. 2016 yılında Selimpaşa Atatürk Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. 2016-2020 yılları arasında lisans eğitimini İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa'da Çevre Mühendisliği Bölümü'nde tamamladı ve mezun olduktan hemen sonra Gebze Teknik Üniversitesi'nde Çevre Mühendisliği Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başladı.

2018-2020 yılları arasında Anadolu Üniversitesi'nde Coğrafi Bilgi Sistemleri önlisans programını ve 2020-2021 yılları arasında Balıkesir Üniversitesi'nde İş Sağlığı ve Güvenliği yüksek lisans programını tamamladı.

