

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NİTRİT BİYOSENSÖRÜ GELİŞTİRİLMESİ İÇİN REKOMBİNANT
NİTRİT REDÜKTAZ ENZİMİ ÜRETİMİ**



HİLAL NİSANUR İBİCİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

GEBZE
2023

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NİTRİT BİYOSENSÖRÜ GELİŞTİRİLMESİ
İÇİN REKOMBİNANT NİTRİT REDÜKTAZ
ENZİMİ ÜRETİMİ

HİLAL NİSANUR İBİCİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. MELEK ÖZKAN

GEBZE

2023

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

**PRODUCTION OF RECOMBINANT NITRITE
REDUCTASE ENZYME FOR NITRITE
BIOSENSOR DEVELOPMENT**

HİLAL NİSANUR İBİCİ
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL ENGINEERING

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. MELEK ÖZKAN

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 Hilal Nisanur İBİCİ'nin tez çalışması Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Melek ÖZKAN

ÜYE

: Doç. Dr. Pınar ERGENEKON

ÜYE

: Prof. Dr. Elif ERHAN

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Bu tez çalışmasında, nitrit ölçümünde kullanılacak bir biyosensör geliştirmek amacıyla biyoajan olarak görev yapacak olan nitrit redüktaz enzimine (NirB) ait gen klonlanmış, saflaştırılmış ve amperometrik biyosensör elektrodunda test edilmiştir. *Escherichia coli* (*E. coli*) NirB geni bir saflaştırma vektörü olan pET28a vektörüne polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılarak yerleştirilmiştir. Rekombinant vektör *E. coli* BL21 hücrelerine aktarıldıktan sonra elde edilen transformant kolonilerden nitrit redüktaz B enzimi saflaştırılmıştır. Enzimin oksijen varlığında agrede olduğu ve betamerkaptoetanol varlığında indirgendiği ve aktif formuna kavuştuğu belirlenmiştir. Enzimin üretim şartları ve aktivitesi optimize edilmiş ve K_M ve V_{MAX} değerleri hesaplanmıştır. K_M değeri 1.056 mM ve V_{MAX} değeri 0.293 $\mu\text{mol/mg}\cdot\text{dk}$ 'dır. Enzim aktivitesi nitritteki azalmanın Griess metodu kullanılarak ölçülmesi suretiyle belirlenmiştir. Enzimin spesifik aktivitesi 8.518 $\mu\text{mol/mg}\cdot\text{protein}\cdot\text{dk}$ olarak hesaplanmıştır. Deney sonuçlarına göre enzim; pH 7.5 ve 37°C'de 5 dakikalık reaksiyon süresi ile en yüksek aktiviteyi göstermektedir ve 4°C'de saflaştırıldığı gün tetramere dönüşmesine izin vermeden βME eklenip saklandığında aktivitesini daha uzun süre koruduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda enzim 25mM kadminyum varlığında saklandığında, kadminyum iyonunun enzimi koruyarak aktivite kaybını engellediği gözlenmiştir. Sodyum nitrat ve sodyum format gibi iyonların yüksek konsantrasyonları ise enzimin aktivitesini düşürmektedir. Enzim poligluteralehit ve pirol varlığında altın elektrot yüzeyine tutuklanarak amperometrik ortamda çalışan bir elektrot üretilmiştir. Biyosensörün artan nitrit konsantrasyonlarında (0.5mM ve 3.5mM) dönüşümlü voltametri (CV) grafiği kaydedilmiş ve enzimin amperometrik bir nitrit biyosensörü için uygun bir ajan olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Nitrit Redüktaz, Klonlama, Enzim Saflaştırma, Biyosensör.

SUMMARY

In this study, gene for nitrite reductase enzyme (NirB) which will serve as a bioagent to develop a biosensor to be used in nitrite measurement, was cloned, purified and tested in amperometric biosensor electrode. *Escherichia coli* (*E. coli*) *nirB* gene was cloned in the pET28a vector by amplifying with polymerase chain reaction (PCR). Nitrite reductase B enzyme was purified from the transformant colonies obtained after the constructed vector was transferred to the *E. coli* BL21 cells. It has been determined that the enzyme was aggregated in the presence of oxygen and it was reduced in the presence of Beta mercaptoethanol and gains its active form. The production conditions and activity of the enzyme has been optimized and K_M and V_{MAX} values were calculated to be 1.056 Mm and 0.293 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$, respectively. The enzyme activity was determined by measurement of the decrease in nitrite concentration using the Griess Method. The specific activity of the enzyme was calculated as 8.518 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{protein}\cdot\text{min}$. Experiments related to the optimization showed that highest activity occurred at 7.5 and 37°C with a 5 minute reaction time, and it was found that when the β ME was added just after purification and enzyme stored at 4°C, it protected its activity for a longer period of time. At the same time, when the enzyme was stored in the presence of 25mM cadmium, it has been observed that the cadmium ion prevented loss of activity by preserving the enzyme. High concentrations of some ions such as sodium nitrate and sodium formate reduced the activity of the enzyme. For biosensor preparation the enzyme Nirb was immobilized with polygluteraldehyde and pyrrole on gold electrode, and measurements were performed in an amperometric environment. The cyclic voltammetry (CV) was recorded with increasing nitrite concentrations (0.5mM and 3.5mM). The enzyme was shown to be a suitable agent for an amperometric nitrite biosensor fabrication.

Key Words: Nitrite Reductase Enzyme, Cloning, Enzyme Purification, Biosensor.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini esirgemeyen ve bu çalışmanın oluşmasına öncelik eden danışmanım Prof. Dr. Melek ÖZKAN’a,

Çalışma boyunca bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan araştırma görevlisi Esra MEŞE ERDOĞAN ve projede doktora sonrası araştırmacı olarak çalışan Dr. Hilal YILMAZ’a,

Lisans ve lisansüstü eğitim sürecimde her an yanımda olan ve her alanda bana yardımcı olan meslektaşım Zeynep TÜREDİ’ye,

Yoğun çalışma dönemimde yanımda olan ve hiçbir yardımını benden esirgemeyen nişanlım Ali Galip ÇINAR’a,

120Z412 numaralı projede, çalıştığım süre boyunca beni finansal olarak destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, TÜBİTAK’a,

ve tüm eğitim öğretim hayatım boyunca yanımda olan, bana maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. NİTRİT	3
2.1. Doğal Nitrit Kaynakları	3
2.2. Nitritin Çevre ve İnsan Sağlığı İçin Zararları	4
2.3. Radyo Dalga Yayılımı	5
2.4. Denitrifikasyon	8
3. BİYOSENSÖRLER	11
3.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması	12
3.2. Nitrit Biyosensörleri	12
4. SAYISAL ÖRNEK ve SONUÇLAR	15
4.1 Nitrit Redüktaz Enzimi ve Çeşitleri	15
4.2. Escherichia coli’de Nitrit Redüktaz Enzimi	16
4.3. Enzim İmmobilizasyonu	17
5. MATERYAL VE METOT	19
5.1. Enzim İmmobilizasyonu	19
5.2. Klonlama	21
5.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	21
5.2.2. Ligasyon	23
5.2.3. Kompetan Hücre Hazırlama	24
5.2.4. Transformasyon	25
5.2.5. Plazmit İzolasyonu	25

5.2.6. Klonlamanın Restriksiyon Enzimleri ile Doğrulanması	26
5.3. Enzim İmmobilizasyonu	27
5.3.1. SDS-PAGE Analizi	28
5.3.2. BSA (Bovine Serum Albumin) Analizi	28
5.4. NADH Varlığında Enzim Aktivitesi	29
5.5. Enzimin Aktivitesi ve Karakterizasyonu	30
5.6. Enzim İmmobilizasyonu	31
6. BULGULAR	33
6.1. Enzim İmmobilizasyonu	33
6.1.1. NirB Geninin pGEM-T Vektörüne Klonlanması	33
6.1.2. NirB Geninin pET28a Vektörüne Klonlanması	34
6.2. Protein Üretimi ve Saflaştırma	37
6.2.1. Farklı Besiyerlerinin Protein İfadesine Etkisi	38
6.2.2. Saklama Koşullarının Protein İfadesine Etkisi	38
6.3. NADH Varlığında Enzim Aktivitesi	39
6.3.1. NADH Varlığında pH'ın Aktiviteye Etkisi	40
6.4. Enzimin Aktivitesi ve Karakterizasyonu	41
6.4.1. Enzim Miktarı ve Reaksiyon Süresinin Aktiviteye Etkisi	43
6.4.2. Sıcaklık, pH ve Reaksiyon Süresinin Aktiviteye Etkisi	44
6.4.3. İyonların Enzim Aktivitesine Etkisi	45
6.4.4. Saklama Koşullarının Aktiviteye Etkisi	46
6.5. PGA/PPy/NirB Altın Elektrot ile Nitrit Ölçümü	47
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	51
KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	61

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
A	: Amper
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
g	: Gram
L	: Litre
M	: Molar
mA	: Miliamper
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
nM	: Nanomolar
μ A	: Mikroamper
μ g	: Mikrogram
μ L	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar
μ S	: Mikrosiemens
X-Gal	: 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -D-Galactopyranoside
β ME	: β -mercaptoethanol
aNiR	: Asimilatör Nitrit Redüktaz
APS	: Amonyum Persülfat
BÇ	: Baz Çifti
BSA	: Bovine Serum Albumin
ccNiR	: Sitokrom C Nitrit Redüktaz
cd ₁ NiR	: Sitokrom cd ₁ Nitrit Redüktaz
CuNiR	: Bakır İçeren Nitrit Redüktaz

DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
E. coli	: Escherichia coli
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic Acid
FAD	: Flavin Adenin Dinükleotit
FNT	: Format/Nitrit Taşıyıcı
GA	: Glutaraldehit
IPTG	: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LA	: Luria Agar
LB	: Luria Broth
MOPS	: 3-morfolinopropan-1-sülfonik asit
MV	: Metil Violojen
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NiR	: Nitrit Redüktaz
NiR _{SIRO}	: Ferredoksin Nitrit Redüktaz
NOR	: Nitrik Oksit Redüktaz
NOS	: Nitröz Oksit Redüktaz
NR	: Nitrat Redüktaz
OD	: Optical Density
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PGA	: Poligluteralehit
PMSF	: Phenylmethanesulfonyl Fluoride
PPy	: Polipirol
RCF	: Relative Centrifugal Force
RPM	: Dakikada devir sayısı revolutions per minute
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS- Page	: Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid jel elektroforez
SOC	: Super Optimal broth with Catabolite repression
TB	: Terrific Broth
TE Buffer	: Tris-EDTA Buffer

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
1.1: NADH'a bağlı nitrit redüktaz enziminin çalışma prensibi.	2
2.1: Nitrozamin oluşumu.	5
2.2: Griess testinin şematik görünümü.	6
3.1: Biyosensör bileşenleri.	10
5.1: pGEM-T vektör haritası.	20
5.2: pET28a vektör haritası.	21
5.3: BSA standart eğrisi.	27
6.1: PCR ile nirB geninin çoğaltılması. 1) Marker, 3, 4, 5) nirB.	31
6.2: Mavi beyaz koloni oluşumu.	32
6.3: pGEMT vektörüne klonlamanın enzim kesimi ile doğrulanması. 1) Marker, 2) pGEMT, 3) pGEMTnB, 4) NheI ve XhoI ile kesilmiş pGEMTnB.	32
6.4: nirB geninin klonlanması için vektörlerin kesilmesi. 1) Marker, 2) pET28 plazmid, 5) pET28 NheI ile kesilmiş lineer plazmid (boyut kontrolü amacıyla yüklenmiştir), 8) pGEMTnB NheI ve XhoI enzimle ile kesim 11) Marker, 12) Kesilmemiş pET28, 13) pET28a NheI ve XhoI enzimleri ile kesim.	33
6.5: pET28nB plazmid izolasyonu sonuçları. 1) Marker, 2) pGEMTnB plazmidi, 3) pGEMTnB NheI-XhoI ile kesim, 7-13) olası pET28nB içeren transformantlardan elde edilen plazmidler (TOP10).	34
6.6: pET28nB PCR ile doğrulanması. 1) Marker, 2) pET28a, 3-8) nirB geninin klonlanmasında elde edilen transformantlardan alınan plazmidlerden (olası pET28nB) elde edilen PCR ürünleri.	34
6.7: nirB geninin pET28a vektörüne klonlanmasının enzim kesimi ile doğrulanması. 1) Marker, 2) pET28nB plazmidi, 3) pET28nB NheI ile kesim, 4) pET28nB XhoI ile kesim, 5) pET28nB NheI-XhoI ile kesim.	34

6.8:	NirB proteininin saflaştırılması ve monomerleştirilmesi. 1-3) BME varlığında monomer NirB proteini 4) NirB tetrameri (BME yok) 5) Marker.	35
6.9:	Farklı besiyerlerinin saflaştırmaya etkisi. 1) Marker 2) 2YTA besiyerinde büyütülmüş pET28 proteini 3) 2YTA besiyerinde büyütülmüş NirB proteini 4) TB besiyerinde büyütülmüş pET28 proteini 5) TB besiyerinde büyütülmüş NirB proteini 6) LB besiyerinde büyütülmüş pET28 proteini 7) LB besiyerinde büyütülmüş NirB proteini 8) Boş 9) SOC besiyerinde büyütülmüş pET28 proteini 9) SOC besiyerinde büyütülmüş NirB proteini.	36
6.10:	NirB proteininin saflaştırma ve saklama koşullarının belirlenmesi. A) 1) Marker 2) NirB 1.elusyon 3) NirB 2. Elusyon 4) NirB 3.elusyon, B) 1) Marker 2) -18°C NirB 1.elusyon 3) -18°C NirB 2.elusyon 4) -18°C NirB 3.elusyon 6) 4°C NirB 1.elusyon 7) 4°C NirB 2.elusyon 8) 4°C NirB 3.elusyon.	37
6.11:	NADH varlığında aktivitenin absorbansa dayalı takibi.	38
6.12:	Farklı pH ortamlarında absorbans takibi.	38
6.13:	Griess metoduna göre Nitrit-Absorbans standardı.	39
6.14:	Nitrit konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisi.	40
6.15:	NirB'nin reaksiyon kinetik parametrelerinin belirlenmesi.	41
6.16:	Altın elektrotun; a) kaplama öncesi b) kaplama sonrası görüntüsü.	45
6.17:	Altın elektrotun kaplamasına ait CV.	46
6.18:	NO ₂ 'siz(kırmızı), 2mM NO ₂ ilaveli (mavi) (scan rate: 10mV/s).	46
6.19:	Altın elektrotun PGA ve pirol ile kaplanmasına ait CV.	47
6.20:	Nitrit ilave edilmeden önce CV (scan rate = 10mV/s).	47
6.21:	1 mM NO ₂ eklendikten 15 dk sonra(kırmızı), 30 dk sonra(mavi), 1 saat sonra (kahverengi) CV görüntüleri (scan rate = 10mV/s).	48
6.22:	Artan nitrit konsantrasyonları (Kırmızı: 0.5mM → Yeşil: 3.5mM).	48

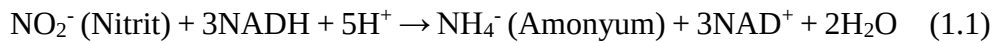
TABLÖLAR DİZİNİ

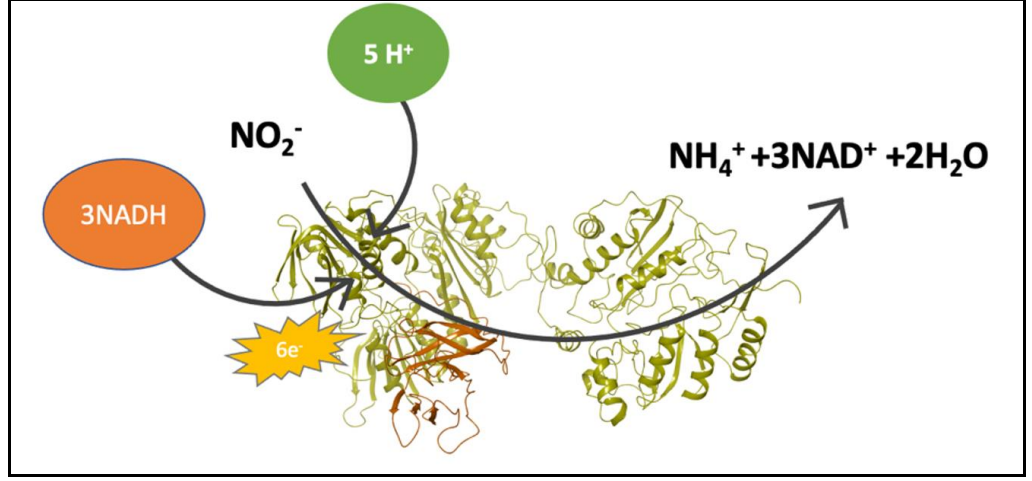
<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Nitrit ölçüm yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları.	8
4.1: Enzim immobilizasyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları.	16
5.1: Kullanılan kimyasallar ve tedarikçileri.	17
5.2: Primerler ve baz dizileri.	22
5.3: Bakteri suşları.	24
5.4: Vektörler.	25
5.5: BSA standart çözeltileri.	27
6.1: Nitrit konsantrasyonunun etkisi.	40
6.2: Enzim miktarının aktivite üzerine etkisi.	42
6.3: Zamana bağlı enzim aktivitesi.	43
6.4: pH'ın enzim aktivitesi üzerine etkisi.	43
6.5: Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi.	43
6.6: İyon ve metallerin enzim aktivitesi üzerine etkileri.	44

1. GİRİŞ

Nitrit kararsız özelliğinden dolayı kolay okside olmakta ve birçok madde ile reaksiyona girebilmektedir. Ayrıca çevre ve insan sağlığı için tehlike oluşturabilmektedir. Bu nedenle nitrit doğal ortamlarda ve içme suyunda takip edilmesi gereken inorganik bir kirleticidir. Nitritin farklı metodlar ile ölçümü yapılabilmektedir ancak nitritin daha spesifik bir şekilde ölçümü için daha hassas ve çevre dostu yeni metod arayışları devam etmektedir. Bunlardan biri de nitrite spesifik enzimlerin kullanımı ile geliştirilen biyosensörlerdir. Bu tez çalışması kapsamında biyosensörde biyoajan olarak görev yapacak olan ve nitriti amonyuma indirgeyen bir enzim olan nitrit redüktaz enzimi *E. coli* bakterisinden klonlanmış, üretimi gerçekleştirilmiş, karakterize edilmiş ve amperometrik bir biyosensörde test edilmiştir. Biyosensörde biyoajan olarak kullanılacak olan nitrit redüktaz enzimi ile yapılan eski çalışmalarda bu enzim hücrelerden saflaştırılarak kullanılmıştır. Literatürde NirB enzimleri bakteri veya bitki hücrelerinden kimyasal ve kromatografik yöntemler ile saflaştırılması suretiyle çalışılmıştır. NirB nitrit redüktaz enziminin klonlanıp saf halde elde edilmesi ve karakterizasyonuna ilişkin çalışma sayısı yok denecek kadar azdır. Bu tez kapsamında nitrit redüktaz enzimi ilk kez *E. coli*'den klonlanıp üretilmiş ve aktivitesi belirlenmiştir. *E. coli* farklı nitrit redüktaz enzimlerine sahiptir. Tez kapsamında üretilecek olan nitrit redüktaz enzimi Nikotinamid Adenin Dinükleotide (NADH) bağımlı asimilatör bir nitrit redüktaz enzimdir ve nitritin amonyığa çevriminde görev alır (Şekil 1.1). Tez kapsamında geliştirilecek olan biyosensör çalışma elektrodları tez kapsamında klonlanıp üretilen enzim kullanılarak geliştirilmiştir. Biyosensör denemelerinde ölçümler; 3'lü elektrot sisteminde ve toplam 16 mL hacimde 0.05M PBS içerisine sırasıyla; 16 mM Na₂S₂O₄, 3 mM MV ve 1 mM NO₂ eklenerek yapılmıştır.

NADH bağımlı nitrit redüktaz enzimi aşağıdaki reaksiyonu katalizlemektedir:





Şekil 1.1: NADH'a bağlı nitrit redüktaz enziminin çalışma prensibi.

2. NİTRİT

Nitrit; gübrelerde, endüstriyel atık sularda, boyalarda, deterjanlarda ve korozyon önleyicilerde yaygın olarak bulunan inorganik azot formudur ve oldukça kararsız bir özellik gösterir [1], [2]. Toksik bir kirletici olan nitrit evsel ve endüstriyel atık suların deşarjından kaynaklanan çeşitli su kütlelerinde yaygın olarak bulunur [3]. Aynı zamanda kürlenmiş etlerde; ürünlerin rengini korumak ve lezzet gelişimi, patojenik mikroorganizmaların (*Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Yersinia enterocolitica*) büyümesinin baskılanması ve raf ömrünün uzatılması amaçlarıyla kullanılan bir katkı maddesidir [4], [5]. Nitritin kullanıldığı alanlar bunlar ile sınırlı olmayıp nitrit; tekstil, ilaç endüstrisi, metal ve petrol gibi endüstrilerde de kullanıldığı bilinmektedir [2]. Nitrit; alım dozu, sıklığı ve şekline bağlı olarak akut ve kronik zehirlenmelere yol açabilmekte, insan ve çevre sağlığı için risk oluşturabilmektedir [6].

2.1. Doğal Nitrit Kaynakları

Kereviz, pancar ve marulun yüksek nitrat içeriğine sahip olduğu bilinmektedir. Sebzelerdeki nitrat, nitrat indirgeyen bakteriler tarafından nitrite indirgenebilir. *Micrococcus varians*, *Staphylococcus carnosus* ve *Staphylococcus xylosus* gibi koklar nitrat indirgeyen bakteriler olarak kullanılabilir. Kereviz tozu, et ürünleri endüstrisinde doğal nitrit kaynağı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Kereviz yüksek nitrat içeriğine sahiptir ve birçok çalışma kereviz suyu veya tozunun et ürünlerindeki sentetik nitritin yerini alabileceğini bildirmiştir. Genel olarak, doğal nitrit kaynaklarıyla kürlen en et ürünleri, sodyum nitrit kullanılarak kürlen en et ürünlerine kıyasla daha düşük kalıntı nitrit içeriğine sahiptir. Bunun nedeni, sebzelerin genellikle nitritin nitrik okside ayrışmasını destekleyen antioksidanlar içermesidir. Et ürünlerinin kalıntı nitritleri, ikincil aminlerle reaksiyona girebilir ve et ürünlerinin yenmesinden sonra nitrozamin üretebilir. Bu nedenle, et ürünlerinde doğal nitrit kaynağı kullanılması ve kalıntı nitrit içeriğinin azaltılması, nitrit alımını azaltarak potansiyel nitrozamin oluşumu riskini azaltabilir ve tüketicilerin tercihini artırabilir. Bununla birlikte, et ürünlerinde önceden dönüştürülmüş doğal nitritin kullanılmasının bazı

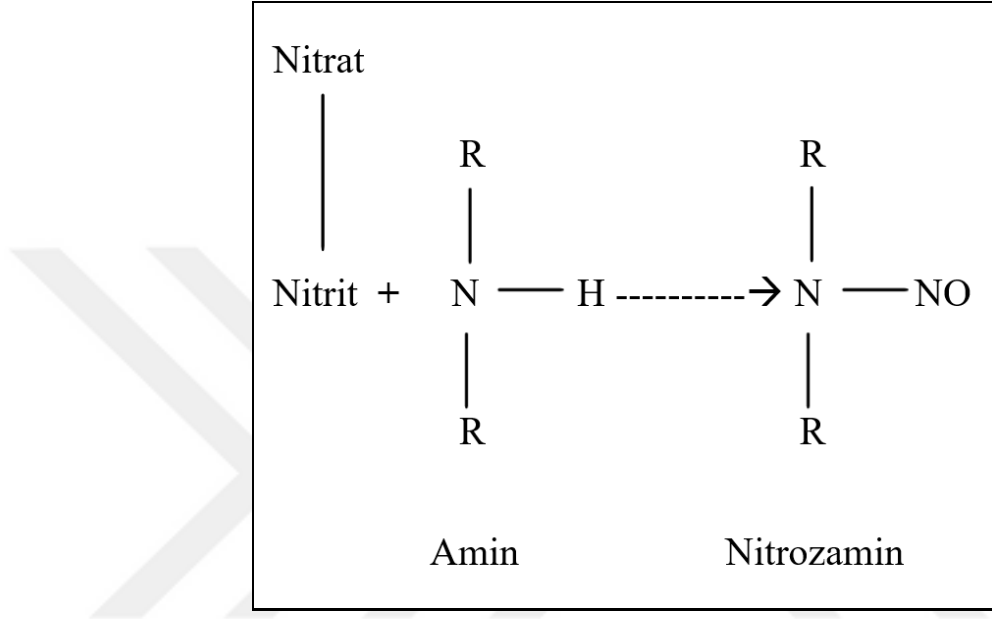
eksiklikleri vardır. Sebzeleri doğal nitrit kaynağı olarak kullanmak için yeterli nitrat içeriğine sahip olmaları gerekir. Sebzeler, ürünlerin duyusal kalitesini etkileyebilecek karakteristik tat ve renge sahiptir. Sonuç olarak, et ürünlerine sadece sınırlı miktarlarda eklenebilir çünkü et ürünlerine çok miktarda eklendiğinde kötü tat oluşturabilir [4].

2.2. Nitritin Çevre ve İnsan Sağlığı İçin Zararları

Nitrit, gıda, endüstriyel ve fizyolojik sistemlerde yaygın olarak bulunan kimyasal bir kirleticidir [7]. Nitrojen bakımından zengin gübrelerin aşırı kullanımı, fosil yakıtların yakılması ve diğer antropojenik nitrojen kaynakları, doğal nitrojen döngüsünü bozar ve azotlu maddelerin (NO_3^- ve NO_2^-) çevrede birikmesine yol açar [8]. Nitrit aynı zamanda su ortamlarında bulunan azotlu bir bileşiktir ve genellikle su ortamlarında düşük seviyelerde bulunur. Nitrit, su ortamında hem nitrit iyonunda hem de iyonize olmayan nitröz asitte bulunmaktadır. Nitritin her iki formu da suda yaşayan hayvanlarda toplam nitrit zehirlenmesine katkıda bulunabilir [9]. Suda yaşayan canlılarda yüksek nitrit; plazma, solungaç, beyin, karaciğer ve kas dokusunda birikebilir. Doku sıvılarındaki yüksek nitrit seviyeleri suda yaşayan hayvanların sağlığını ciddi şekilde etkileyebilir ve toplu ölümlere yol açabilir [10]. Bununla birlikte, sucul ekosistemlerdeki nitrit konsantrasyonu genellikle nitröz asit konsantrasyonundan çok daha yüksek olduğundan, su hayvanlarında nitrit toksisitesinin birincil nedeni nitrittir. Kültür balıkçılığı sistemlerinde de nitrit seviyelerindeki aşırı bir artış, büyüme inhibisyonuna, fizyolojik tepkilerin bozulmasına oksidatif hasar ve suda yaşayan organizmalarda hastalığa karşı artan duyarlılığa sebep olur [9]. Ayrıca su kütlelerinde fosfatla birlikte yüksek düzeyde nitrit bulunması kıyı su yollarında ve göllerde ötrofikasyona sebebiyet verir [2].

İnsanların nitrite maruz kalması ise nitrit tuzları kullanılarak korunan peynir ve et gibi konserve gıdaların tüketimi, kimyasal azotlu gübrelerin ve azot bazlı pestisitlerin düzensiz kullanımı nedeniyle, tarımsal gıdalardaki yüksek nitrit kalıntıları ve evsel kuyulardan gelen suyun kullanılması yoluyla gerçekleşir [2, 11]. Nitritin insan sağlığı üzerindeki olumsuz bir etkisi, vücuttaki sekonder aminlerle reaksiyona girerek nitrozaminlerin oluşumuna neden olmasıdır. Bu reaksiyon şekil 2.1’de gösterildiği biçimde gerçekleşmektedir. Nitrozaminler, potansiyel olarak kanserojen, mutajen ve teratojendir [12], [13]. Nitrit aynı zamanda kandaki hemoglobine bağlanarak methemoglobin oluşturur. Kandaki Fe(II) iyonu içeren hemoglobin, oksijeni dokulara

taşımak için oksihemoglobin kompleksi oluşturur. Fe(II), Fe(III)'e oksitlendiğinde ise hemoglobin oksijen taşıma yeteneğini kaybeder ve methemoglobin oluşur. Kanda nitrit bulunması methemoglobin oluşumuna neden olur. Bu durum özellikle çocuklar için tehlikelidir ve “mavi bebek sendromu” olarak bilinmektedir [12]. Methemoglobin oluşumu düşük konsantrasyonlarda tersinirdir ancak konsantrasyonun %70'in üzerine çıkması geri döndürülemez hasarlara neden olur [14].

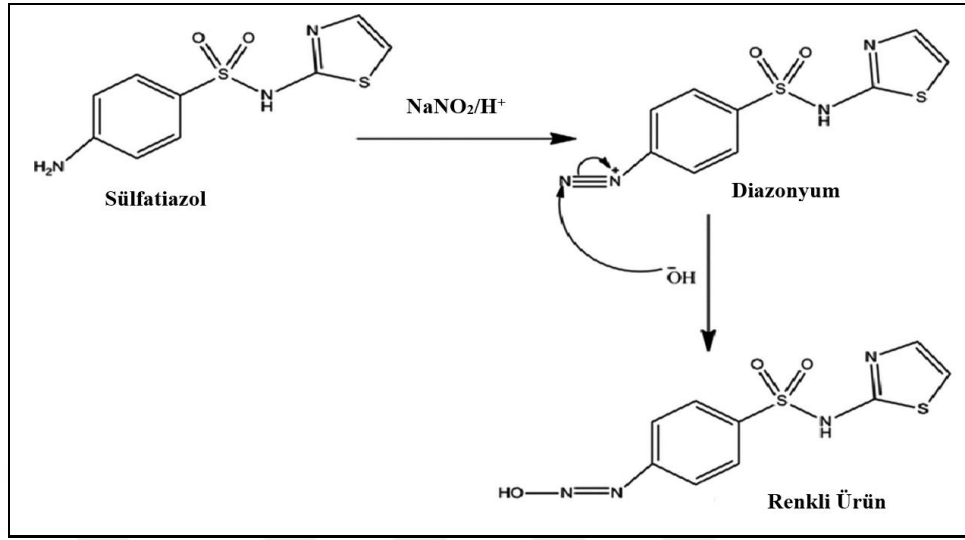


Şekil 2.1: Nitrozamin oluşumu.

2.3. Nitrit Ölçüm Yöntemleri

Nitrit tayini farklı yöntemler ile yapılabilmektedir. Bu yöntemlerin çeşitli avantaj ve dezavantajları sayılabilir. Nitrit tespitinde en çok tercih edilen yöntemlerden biri spektrofotometrik yöntemlerdir. Spektrofotometrik yöntemler; basitliği, kullanılabilirliği, yüksek duyarlılığı, seçiciliği, düşük saptama limiti ve düşük maliyeti nedeniyle tercih edilmektedir. Nitrit tespiti için kullanılan en ünlü spektrofotometrik yaklaşım Griess yöntemidir [15], yöntemin şematik görünümü şekil 2.2’de verilmiştir [16]. Griess metodu nitritin sülfanilamid ile diazolanması sonucu oluşan diazonyum tuzunun, N-1-naftiletilendiamin ile oluşturduğu renkli ürünün absorbansının ölçümüne dayanır [14]. Griess yöntemi, nitrit tayininde uzun süredir kullanılmaktadır. Ancak, bu yöntemin hassasiyeti düşüktür ve diğer iyonlardan kaynaklanan girişimlerden

muzdarip olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda bu yöntem genellikle zaman alıcıdır [1].



Şekil 2.2: Griess testinin şematik görünümü.

Nitritin tespitinde kullanılan başka bir yöntem ise kemilüminesans yöntemidir ve bu yöntem kimyasal reaksiyon sonucu açığa çıkan ışık saçılımının ölçümüdür [17], [18]. Kemilüminesans yöntemi, geniş lineer aralığa sahip, oldukça hassas ve seçici bir nitrit tespit yöntemidir [19], [20]. Ancak bu yöntem özel ve pahalı enstrümanlar gerektirir [21]. Aynı zamanda yöntemin stabilitesi ve tekrarlanabilirliği düşüktür [18].

Kemilüminesans yönteminin altında bahsedilebilen ve hala gelişmekte olan diğer bir nitrit tayin yöntemi ise elektrokemilüminesanstır. Elektrokemilüminesans yöntemi yüksek hassasiyet, kullanım kolaylığı, iyi algılama sınırı, seçicilik ve geniş doğrusal aralık gibi birçok avantaja sahiptir [22-24]. Bu avantajların yanı sıra bu yöntem henüz olgunlaşmamıştır ve geliştirilmeye ihtiyacı vardır [1].

Kapiler elektroforez, yüklü taneciklerin bir elektrik alanda farklı hızlar ile hareket etmelerinden yararlanılarak ayrılmasına yarayan güçlü bir ayırma tekniğidir [1]. Bu tekniğin ana avantajları, çok çeşitli anyonların hızlı ve eş zamanlı tespiti, yüksek hassasiyet, yüksek seçicilik, kısa çalışma süresi ve küçük hacimli numune gereksinimleridir. Kapiler elektroforez, bir dizi matrise doğrudan uygulanabilir ancak bazı proteinli malzemeler, analitik sinyale müdahale edebilecek veya gerçek ekipmana zarar verebilecek olan kılcal damar duvarında kolayca emilir. Bu nedenle, bu malzemeleri çıkarmak için genellikle bir dizi hazırlama/ayırma aşaması gerekir [16],

[18]. Bu yöntemin ana dezavantajı yoğun bir ön hazırlık prosedürünün bulunması ve kılcal kolonların sınırlı kapasiteleridir [1].

Spektroflorimetrik yöntemler; yüksek hassasiyet ve seçicilik, iyi algılama limiti ve kolay test tipi protokolleri nedeniyle nitrit tespiti kullanılan yöntemlerden biridir [1]. Spektroflorimetrik yöntemler içme suyunda yaygın olarak bulunan katyon ve anyonların varlığında dahi oldukça seçicidir [25]. Ancak spektroflorimetrik yöntemlerin, stabilitesi zayıftır ve ön işlem süresi uzundur [18]. Spektroflorometri, tespit edilecek bileşiklerin moleküllerindeki elektronları uyarmak için genellikle ultraviyole ışık olan bir ışık demeti kullanarak numuneden açığa çıkan floresanı analiz eder ve bu durum tipik olarak görünür ışık olan ancak zorunlu olmayan ışık yaymaya yönlendirir [17]. Yayılan bu ışık demeti uygun dalga boylarında ölçülür.

Kromatografi, bir karışımdaki iki ya da daha fazla bileşenin, hareketli bir faz yardımıyla, sabit bir faz arasından değişik hızlarda hareket etmeleri esasına dayanır. Kromatografik yöntemlerle, kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok yakın bileşenlerden oluşan karışımları, tümüyle, kolayca ve kısa sürede ayırmak mümkün olmaktadır [26]. Kromatografik yöntemler; hızlı, hassas ve oldukça seçicidir [1]. Ancak kromatografik yöntemler, karmaşık bir numune hazırlama prosedürü gerektirir [16]. Ayrıca bu yöntemlerde bir koruma sütunu da gereklidir. Ek olarak bu yöntemlerin en önemli dezavantajları maliyet ve yöntemin karmaşıklığı ile ilgilidir [1].

Elektrokimyasal yöntemlerin uygulama alanları başta; çevresel, askeri ve sağlık olmak üzere çok çeşitlidir. Elektrokimyasal yöntemler ucuz, güvenilir, hassas, hızlı, seçici ve basitlerdir. Özellikle elektrokimyasal sensör ve dedektörler numunelerin yerinde izlenmesi açısından tercih edilebilmektedir. Bu avantajlar kullanım alanlarını arttırmakta ve diğer yöntemlere göre üstünlüklerini artırmaktadır, elektrokimyasal yöntemlerin diğer nitrit ölçüm yöntemlerine göre avantaj ve dezavantajları Tablo 2.1’de verilmiştir. Elektrokimyasal yöntemlerde kullanılabilir çok çeşitli elektrot türleri mevcuttur. Bunlara nikel, bakır-nikel alaşımları, kadmiyum, platin, camı karbon, altın, kurşun, gümüş ve henüz yeni olan bor katkılı elmas elektrotlar örnek olarak gösterilebilir. Enzimlerin immobilizasyonu ve yüzey modifikasyonları gibi prosedürler elektrokimyasal yöntemlerin teknik karmaşıklığını artırmaktadır ancak bu durum elektrokimyasal yöntemleri daha seçici kılmaktadır [16], [27], [28].

Tablo 2.1: Nitrit ölçüm yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları.

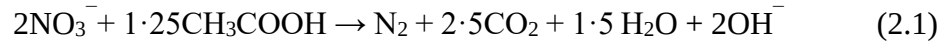
Yöntem	Avantaj	Dezavantaj
Spektrofotometri	Uygulaması basit, yüksek duyarlılık ve düşük maliyet	Düşük hassasiyet ve farklı iyon girişimleri
Kemilüminesans	Düşük maliyet ve kolay uygulanabilirlik	Zayıf stabilite ve düşük tekrarlanabilirlik
Elektrokemilüminesans	Kullanım kolaylığı, iyi algılama sınırı ve geniş doğrusal aralık	Gelişimi tamamlanmamış, geliştirilmeye ihtiyacı var
Kapiler Elektroforez	Yüksek hassasiyet ve hızlı yanıt süresi	Sınırlı kapasite ve düşük tekrarlanabilirlik
Spektroflorimetri	Yüksek seçicilik ve kolay uygulanabilirlik	Zaman alıcı hazırlık süreci
Kromatografi	Yüksek hassasiyet ve yüksek seçicilik	Karmaşık numune hazırlama prosedürü ve yüksek maliyet
Elektrokimyasal	Yüksek hassasiyet ve seçicilik, hızlı yanıt süresi, yüksek seçicilik	Yüzey modifikasyonu ve immobilizasyon gibi karmaşık süreçler

2.4. Denitrifikasyon

Bitkiler, azotu genellikle nitrat şeklinde alırlar. Topraktaki nitrat birikimi ise proteinlerin parçalanma ürünü olan amonyağın mikrobiyal oksidasyonu ile oluşur. Bu olay, iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta amonyak nitrite çevrilir bu olayda başlıca *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus* ve *Nitrosolobus* cinslerine ait bakteri türleri etkin rol oynarlar. İkinci basamakta ise nitrit, *Nitrobacter* cinsine ait bakteri türleri tarafından nitratlara çevrilir bu olay nitrifikasyon olarak adlandırılır. Bu mikrobiyal faaliyetler sonucunda meydana gelen nitratlar, eğer bitkiler tarafından alınmazsa yine topraktaki bazı bakteriler tarafından redüksiyona uğratılır ve bu şekilde

nitritler, amonyak ve elementer azota dönüşür bu sürece denitrifikasyon prosesi denir ve bu proses sonunda toprak nitrat bakımından fakirleşir [29]. Nitrat indirgenmesi asimilatör ve dissimilatör olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

Dissimilatör olarak nitrat indirgenmesi yollarından biri denitrifikasyondur, işleminin kimyasal reaksiyonu aşağıdaki şekilde ifade edilebilir [30]:



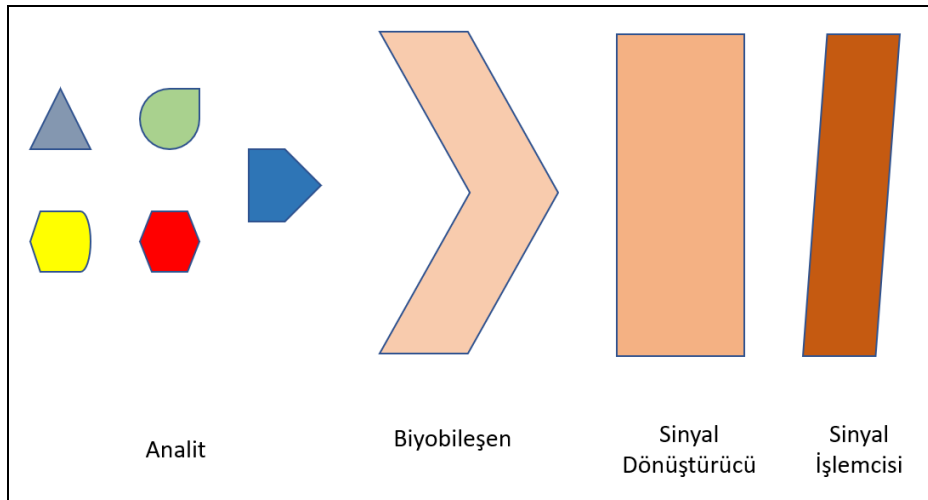
Denitrifikasyon işlemi aşağıdaki dört reaksiyondan oluşmaktadır:

$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$, her adımı sırasıyla nitrat redüktaz (NR), nitrit redüktaz (NİR), nitrik oksit redüktaz (NOR) ve nitröz oksit redüktaz (NOS) tarafından katalize edilir (Şekil 3.1). Nitritten NO'ya indirgeme reaksiyonu, denitrifikasyonu diğer nitrat metabolizmasından ayıran ayırt edici reaksiyondur ve nitrit redüktaz tarafından katalize edilir. NO'nun N_2O 'ya dönüşümünü katalize eden nitrik oksit redüktaz, sitoplazmik membran üzerinde yer alır. N_2O 'dan N_2 'ye dönüşümün son adımı, nitröz oksit redüktaz sitoplazmik enzimi ile tamamlanır [29], [30], [31]. Bu enzimler oksijene karşı duyarlıdır, oksijenden en fazla etkilenen enzim ise son adımı katalize eden nitröz oksit redüktazdır [32].

Nitrat veya nitriti azaltabilen ve nitritten N_2O veya N_2 üretebilen bakteriler, denitrifikasyon bakterileri olarak adlandırılır. Nitrifikasyon bakterilerinin aksine, denitrifikasyon bakterileri belirli bir taksonomik gruba ait değildir, ancak çoğu bakteri ve çok azı ise arke olarak tanımlanabilen birçok prokaryot cinsine dağılmışlardır [31]. Denitrifikasyon yapan bakterilerin çoğu heterotroftir ancak ototrofik fermentatif olanları da vardır [32]. Denitrifikasyon yapma yeteneğine sahip mikroorganizmalar, nitratlardan üç şekilde yararlanmaktadır; azot kaynağı olarak, nitratı nitrite, nitriti de amonyağa indirgemek suretiyle ve nitratı, oksijen yerine son elektron alıcısı olarak [29]. Denitrifikasyon yapan bakteriler; *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Aquaspirillum*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Blastobacter*, *Beggiatoa*, *Bradyrhizobium*, *Branhamella*, *Chromobacterium*, *Clostridium*, *Cytophaga*, *Desulfovibrio*, *Erythrobacter*, *Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Gallionella*, *Halobacterium*, *Halomonas*, *Hyphomicrobium*, *Kingella*, *Neisseria*, *Paracoccus*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, *Vibrio*, *Wolinella* ve *Xanthomonas* cinslerine ait çok sayıda bakterinin denitrifikasyon aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır [29], [32].

3. BİYOSENSÖRLER

Biyosensör kelime olarak biyolojik ve sensör kelimelerinin birleştirilmesiyle oluşturulmuştur [33]. Biyosensörler, tespiti yapılacak madde ile seçici tanıma mekanizmasına sahip biyoaktif bir bileşenin etkileşimi sonucu ortaya çıkan sinyali ileten bir iletici sistem ile birleştirilmesi ve bunların bir ölçüm sistemiyle kombinasyonu sonucu oluşturulmuş cihazlardır [34]. Temel olarak biyosensörler; şekil 3.1’de gösterildiği gibi; biyobileşen (biyoreseptör), sinyal dönüştürücü ve sonuçları aktaran ve görüntüleyen bir sinyal işlemcisiyle oluşur [35]. Biyoreseptörler analiti fark edebilen biyomoleküllerdir. Biyoreseptörler; spesifik, kararlı, sadece analite duyarlı olmalı ve diğer moleküllerden etkilenmemelidir. Biyoreseptör olarak enzimler, nükleik asitler, mikroorganizmalar, organeller, doku kesitleri, antikorlar gibi çeşitli biyolojik materyaller kullanılabilir. Sinyal dönüştürücüler, biyoreseptörün analiti fark ettiği esnada ürettiği fiziksel veya kimyasal sinyali elektrik sinyaline dönüştüren yapılardır [34]. Biyosensörün sinyal işlemcisi ise sinyallerin, anlaşılmasını ve okunmasını sağlayan elektronik yapıdır [35]. Nitelikli biyosensörlerde aranan özellikler; duyarlılık (cihazın minimum analit miktarı değişimine cevap vermesi), seçicilik (cihazın analite spesifik olması), doğrusalılık (cihazın farklı ölçümlere sahip bir dizi ölçüm için ölçülen yanıtın doğruluğu), kararlılık (cihazın duyarlılığındaki değişimleri dikkate alan bir kalite ölçüm değeri) ve tekrarlanabilirliktir (cihazın, bir numune her ölçüldüğünde benzer sonuçları sağlaması) [36], [37].



Şekil 3.1: Biyosensör bileşenleri.

3.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler, biyobileşenlerine göre (enzimler, nükleik asitler, mikroorganizmalar, organeller, doku kesitleri, antikorlar vb.) ve dönüştürücü araçlarına göre (elektrokimyasal, optik, kütle tabanlı ve kalorimetrik) sınıflandırılmaktadırlar. Elektrokimyasal biyosensörler kendi içinde potansiyometrik, amperometrik ve kondüktometrik olarak ve optik biyosensörler ise, fotometrik, flüorometrik ve biyoluminesans olarak alt sınıflara ayrılmaktadırlar [33], [35], [36], [37].

3.2. Nitrit Biyosensörleri

Dai ve arkadaşları (2004), hekzagonal mezogözenekli silika ile modifiye edilmiş camsı karbon elektrot üzerinde hareketsiz hale getirilmiş hemoglobini kullanarak amperometrik bir nitrit biyosensörü oluşturmuşlardır. Optimum koşullar altında bu sensör, 0.2 ile 3.8 mM aralığındaki nitritin belirlenmesi için kullanılabilir. Biyosensörün belirleme limiti, 0.61 μM ve hassasiyeti 1.79 $\mu\text{A}/\text{mM}$ olarak bulunmuştur [38].

Haldorai ve arkadaşları (2016), titanyum nitrit nanoparçacıkları üzerine çok duvarlı karbon nanotüp nanokompoziti immobilize etmişlerdir. Nitrit algılama için camsı bir karbon elektrot üzerinde modifiye edilmiş kompozit üzerine sitokrom c nitrit redüktaz enzimini immobilize edilmiş ve amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Optimum koşullar altında, hassasiyet 121.5 $\mu\text{A}/\mu\text{M}\times\text{cm}^2$ ve 0.0014 μM düşük tespit limiti belirlenmiş, biyosensörde 1 μM ile 2000 μM arasındaki konsantrasyonlarda doğrusal ölçüm alınabilmektedir. Hazırlanan biyosensör, musluk ve deniz suyu örneklerinde nitritin başarılı bir şekilde saptanmasını sağlamıştır [39].

Madasamy ve arkadaşları (2014), karbon nanotüp üzerine polipirol film tabakası ile süperoksit dismutaz kullanarak amperometrik bir nitrit biyosensörü oluşturmuşlardır. Oluşturulan biyosensör 50 nM'lık bir tespit limit değeri göstermiştir. Biyosensör 100 nM ile 1 mM aralığında doğrusaldır [40].

Zazoua ve arkadaşları (2009), su numunelerinde nitriti belirlemek için bir peroksidaz/katalaz kombinasyonu kullanan bir elektrot sistemi geliştirilmişlerdir. Katalaz, H_2O_2 'nin H_2O ve O_2 'ye parçalanmasını katalize ederek, HRP'nin substratı olan

H₂O₂'yi tamamen tüketmiştir. İkincisi H₂O₂'nin varlığında, H₂O₂'nin azalması nedeniyle bir kondüktometrik sinyal üretir. Katalaz inhibitörü olarak nitrit seçilmiştir. Nitritin HRP aktivitesi üzerinde hiçbir etkisi olmadığı için katalaz üzerindeki inhibe edici etkisi, kondüktometrik sinyalde bir artışa yol açmıştır. Oluşturulan biyosensörde tespit limiti 0.03 µM ve doğrusal aralık 0.3 µM ile 446 µM arasındadır [41].

Quan ve çalışma arkadaşları (2006), nitrit redüktaz ve metil viologeni (MV), nitritin amperometrik tayini için camsı karbon elektrot üzerine birlikte hareketsizleştirmişlerdir. Hareketsizleştirme, poli(vinil alkol), nitrit redüktaz ve MV'den oluşan homojen bir karışımın, ardından poli(allilamin hidroklorür) çözeltisinin ve son olarak kloroform içinde çözünen hidrofilik poliüretanın sıralı yüklenmesi ve kurutulmasıyla gerçekleştirilmiştir. Biyosensörün hassasiyeti 11.8 nA/µM, doğrusal tepki aralığı 1.5-260 µM ve tespit limiti 1.5 µM'dır. Biyosensör, 24 gün boyunca (oda sıcaklığında) ilk aktivitesinin %80'ini koruyarak dayanıklı depolama stabilitesi göstermiştir [42].

Chen ve arkadaşları (2007), nitritin amperometrik tayini için, antraknon-2-sülfonat içeren camsı bir karbon elektrot üzerinde sitokrom c nitrit redüktazı immobilize etmişlerdir. Biyosensör, nitrite 5 saniyede, 0.015 ile 2.35 µM doğrusal bir aralıkta, 1.8 A/M×cm² hassasiyette hızlı bir tepki gösterdi. Tespit limiti 4 nM'dır [43].

Serra ve arkadaşları (2011), biyosensörde biyolojik tanıma elemanı olarak sitokrom-cd(1) nitrit redüktazı kullanmışlardır. Protein, polivinil alkol türevi kullanılarak karbon macun ekran baskılı elektrotlar üzerine birlikte hareketsizleştirilmiştir. Amperometrik ölçümler sonucunda biyosensörün; ölçüm yapabildiği doğrusal aralık 10 ile 200 µM, hassasiyeti 2.49±0.08 mA/M×cm² ve tespit limiti 7 µM olarak belirlenmiştir [44].

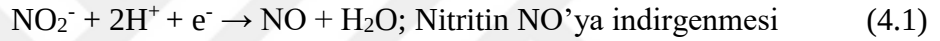
Zhang ve çalışma arkadaşları (2009), nitrit tespiti için sığır serum albümini, metil viologen nasyon ve gliserol varlığında doymuş glutaraldehit (GA) buharı ile çapraz bağlayarak düzlemsel bir iç içe elektrot üzerinde immobilize edilmiş sitokrom c nitrit redüktaz kullanarak bir kondüktometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Oda sıcaklığında optimum koşullar altında kondüktometrik biyosensör, nitrite 10 saniyede 0.2-120 µM doğrusal aralığında, 0.194 µS/µM hassasiyet ve 0.05 µM algılama limiti ile hızlı bir tepki gösterdi. Oluşturulan biyosensör 1 ay boyunca iyi bir stabilite göstermiştir [45].

4. ENZİMLER

4.1. Nitrit Redüktaz Enzimi ve Çeşitleri

Nitrit redüktaz enzimleri, nitritin nitrik okside indirgenmesini katalize eden ve denitrifikasyonda yer alan anahtar enzimlerdir [46], [47]. Nitrit indirgeyici enzimler, nitrik oksit oluşturan nitrit redüktazlar ve amonyak oluşturan nitrit redüktazlar olmak üzere iki kategoride sınıflandırılabilirler [2].

Nitrik oksit oluşturan nitrit redüktazlar; eşitlik 4.1’de verilen nitritin, nitrik okside bir elektron indirgeme reaksiyonunu iki farklı NiR türü katalize eder. Bunlara sitokrom cd_1 nitrit redüktazlar (cd_1NiR) ve bakır içeren nitrit redüktazlar ($CuNiR$) denir [2].



cd_1NiR ’ler iki elektron alıcı bölge ve iki substrat bağlama bölgesi içeren homodimerik enzimlerdir. İndirgenmiş substrat bağlanma bölgeleri nitriti bağlar ve nitrit okside dönüştürür. $CuNiR$ ’ler, her biri iki bakır iyonuna sahip üç özdeş alt birimden oluşan trimerik enzimlerdir. $CuNiR$ aynı zamanda iki farklı bakır merkezine sahiptir bunlar; tip-1 (CuI) ve tip-2 ($CuII$) bakır merkezi. CuI iki histidin, bir sistein ve bir metionin tarafından koordine edilirken, $CuII$, üç histidin ve bir solvent molekülü tarafından koordine edilir. Tip-1 Cu elektron transferinde yer alır, tip-2 Cu ise katalitik merkezi oluşturur [2], [48].

Amonyak oluşturan nitrit redüktazlar; iki farklı NiR türü, eşitlik 4.2’de gösterildiği gibi, nitritin amonyağa altı elektron indirgenmesini katalize eder [2].



Sülfat veya kükürt indirgeyen bakterilerden izole edilen dissimilatör sitokrom c nitrit redüktazlar ($ccNiR$) ve asimilatör nitrit redüktazlar ($aNiR$). $ccNiR$, solunum süreçlerinde önemli bir rol oynayan enzimlerdendir. $NrfA$ ve $NrfH$ alt birimlerinden oluşurlar ve yüksek moleküler kütleli multimerler olarak periplazmik zarıdan izole edilirler. $NrfH$, doğası gereği hidrofobik olan ve fizyolojik olarak dahil olan küçük

tetrahemik polipeptiddir. aNir, nitritin amonyuma altı elektronlu indirgenmesini katalize eden sitoplazmik enzimlerdir. Elektron donör özgülüğüne göre, aNir'ler iki şekilde sınıflandırılır; bunlardan birincisi fotosentetik organizmalarda yaygın olarak bulunan ferredoksine bağımlı enzim ve çoğu heterotrofik organizma da mevcut olan NADH'a bağımlı enzim. Ferredoksin-nitrit redüktazlar (Nir_{SIRO}), prostetik gruplar olarak bir sistein tortusundan köprü oluşturan bir kükürt atomu yoluyla bir demir-kükürt kümesi [4Fe-4S] ve bu kümenin bağladığı bir siroheme merkezinden oluşur, siroheme grubu nitrit için bağlanma yeridir, genellikle siyanobakteriler, bitkiler ve algler gibi fotosentetik organizmalardan izole edilirler. NADH'a bağımlı nitrit redüktaz, tek bir polipeptit üzerinde konumlandırılmış büyük bir proteindir ve aktif gruplar arasında bir NADH bağlama bölgesi, FAD, Fe-S proteini ve bir siroheme kofaktörü bulunur. NADH nitrit redüktazlar ayrıca uzatılmış bir N-ucuna bağlı olan FAD'yi içerir. Heterotrofik bakteriler genellikle nitrit indirgemesi için fizyolojik elektron donörü olarak NADH'ı kullanırken, siyanobakteriler dahil fotosentetik organizmalar indirgeyici olarak ferredoksini kullanır [2], [48], [49], [50].

4.2. *Escherichia coli*'de Nitrit Redüktaz Enzimi

Escherichia coli gibi amonyum üretebilen bakterilerde üretim, nitratın nitrat redüktaz ile nitrite indirgendiği ve daha sonra nitritin nitrit redüktaz ile amonyuma indirgendiği iki aşamalı bir işlemdir. Nitrat bol ise reaksiyon nitritte durur, ancak nitrat sınırlıysa veya sadece nitrit mevcutsa amonyum üretilir. Amonyum üretmek için iki farklı nitrat ve nitrit redüktaz kombinasyonu mevcuttur. Nap/Nrf sistemi periplazmada daha düşük nitrat konsantrasyonları altında (2 mM'nin altında) çalışır, Nar/Nir sistemi ise nitrat hazır olduğunda (2 mM'nin üzerinde) sitoplazmada amonyum üretir. *E. coli* her iki sisteme de sahiptir. *E. coli*'nin anaerobik büyümesi sırasında ana nitrit indirgeyen enzimler NrfA ve NirB nitrit redüktazlarıdır. Her bir operonun ekspresyonu, anaerobik hücre büyüme koşulları sırasında indüklenir ve ayrıca hücre ortamında nitrit veya nitratın varlığı ile modüle edilir. NirB nitrit redüktaz, sitoplazmada nitriti azaltmak için elektron donörü olarak NADH kullandığı belirtilen bir enzimdir. NADH'a bağlı nitrit redüktaz için üç potansiyel işlev bildirilmiştir bunlar; amonyum asimilasyonu, fermentatif amonyaklaştırma ve nitrit detoksifikasyonudur. NADH'a bağlı nitrit redüktaz hem aerobik hem de anaerobik koşullar altında sentezlenebilir. NrfA nitrit redüktaz, membran potansiyeli oluşturmak

için kinonlar aracılığıyla membranla ilişkili format oksitleyici enzimlere bağlanan membranla ilişkili bir solunum enzimidir. NrfA redüktaz hücre periplazmasında yer alır ve elektron alıcısı olarak nitriti kullanan bir solunum enzimidir. NirB redüktaz sitoplazma ile sınırlıdır ve hücre içindeki aşırı nitriti metabolize eder, bunun alımına taşıyıcı protein NirC aracılık eder. Bu üç sistemin, periplazmik, sitoplazmik ve taşımanın, hücrede nitrit alımını ve atılımını belirler. Nitritin yüksek toksisitesi nedeniyle hücre taşıma sistemi, hücredeki nitrit seviyesinin düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynar. Nitrit transmembran geçişinde yer alan üç taşıma proteini bilinmektedir: NarK, NarU ve NirC, ancak nitrit taşıma proteini NirC'nin üçü arasında en yüksek aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. NirC proteinini kodlayan nirC geninin, nirB geni ile aynı operonda konumlandığı bilinmektedir. *E. coli*'de NADH'a bağlı nitrit azalmasının, NirB ve NirD varlığında meydana geldiği bildirilmiştir. NirBD nitrit redüktaz aktivitesi, NirB ve NirD'nin stokiometrik miktarlarında çalışmaktadır. NirD'nin enzim saflaştırmasının erken aşamalarında NirB ile birleştiği bildirilmiştir, bu da NirD'nin nitrit redüktaz enziminin ikinci bir yapısal alt birimi olduğunu gösterir. NirBD ökaryotlarda, bakterilerde ve arkelerde bulunur ve yüklü substratının hücre zarından hücreye geçişinden sorumlu bir taşıma sistemine bağlıdır. Bu taşıma, format/nitrit taşıyıcı (FNT) ailesinin bir üyesi olan NirC proteini tarafından gerçekleştirilir [51-55].

4.3. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimlerin yüksek spesifikliği, enzim-substrat etkileşimi ile tepkimelerin meydana gelmesi, hızlı yanıt süresi ve yüksek verimlilik gibi avantajları bulunmaktadır [56]. Ancak enzimlerin pH, sıcaklık, iyonik kuvvet gibi özelliklerinin kararlılık göstermemesinden dolayı biyosensörlerde kullanımı sınırlandırılmaktadır. Bu nedenle enzim tabanlı biyosensörler tasarlanırken enzimlerin aktivitelerini sürdürebilmeleri için uygun ortam oluşturulmaya çalışılır. Bu ortam, bir destek tabakası ile sağlanabilmektedir. Enzim immobilizasyonu; enzimin, substrat ve ürünler için olandan farklı bir faza yani bir destek tabakasına bağlanmasıdır. Diğer bir ifadeyle enzim immobilizasyonu; enzimlerin fiziksel olarak sınırlandırılmasını ya da belirli bir alana yerleştirilmesini; tekrar ve sürekli olarak kullanılabilirliğini ifade etmektedir [57]. Enzim immobilizasyonu, aşırı pH, sıcaklık, tuzlar ve organik çözücüler gibi zorlu reaksiyon koşulları altında bile çeşitli enzimlerin stabilitesini, sağlamlığını ve yeniden

kullanılabilirliğini geliştirmek için kullanılan etkili bir stratejidir [58]. Enzim immobilizasyon yöntemleri genel olarak fiziksel yöntemler ve kimyasal yöntemler olarak ikiye ayrılır. Fiziksel yöntemler kendi içinde; adsorpsiyon metodu (bu yöntemde enzim hazırlanan bir çözelti içinde çözülür ve katı destek, enzim çözeltisi ile sabit bir süre temas edecek şekilde tutulur bu yöntemde enzimler, fiziksel adsorpsiyon, hidrojen bağı, van der Waals kuvvetleri veya diğer iyonik bağlar ile hareketsiz hale getirilir) [59], [60] ve tutuklama metodu (yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim molekülleri bağları arasında tutuklanmakta belli alanda durmaya zorlamaktır ve böylece ana çözeltiye geçmeleri engellenmektedir) [61] olarak ikiye ayrılırlar. Kimyasal immobilizasyon yöntemleri ise; kovalent bağlama metodu (bağ oluşumu enzim üzerinde bulunan kimyasal grup ile destekleyici materyal üzerinde bulunan bağlayıcı kimyasal grup arasında gerçekleşir) [59], ve çapraz bağlama metodu (bu yöntemde ise enzimler bir enzim polimeri gibi görünen bazı bağlayıcılarla kovalent olarak çapraz bağlanır) [59] olarak ikiye ayrılabilir. Tablo 4.1’de bu yöntemlerin avantaj ve dezavantajlarından bahsedilmektedir [60].

Tablo 4.1: Enzim immobilizasyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları.

Yöntem	Avantaj	Dezavantaj
Adsorpsiyon	Basit ve uygun maliyetli ve enzimin aktivite kaybı az	Zayıf depolama stabilitesi ve desorpsiyon
Tutuklama	Yüksek aktivite ve stabilitede enzim korunumu	Yüksek enzim konsantrasyonu ve enzim sızıntısı
Kovalent Bağlama	Tepki süresi kısa ve çok kararlı	Düşük stabilite
Çapraz Bağlama	Uygun maliyetli ve kullanım kolaylığı	Enzimin aktivite kaybı yüksek ve pH kontrolü sağlanmalı

5. MATERİYAL VE METOT

Bu tez çalışmasında, nitrit tespiti yapabilecek olan bir biyosensör geliştirilmesi için nitrit redüktaz enzimi üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda nitrit redüktaz enzimi pET28a vektörüne klonlanmıştır. Klonlanmış olan enzim *E. coli* BL21 hücrelerine aktarılmış ve sonra elde edilen transformant kolonilerden nitrit redüktaz B enzimi saflaştırılmıştır. Saflaştırma; His saflaştırma etiketi ile ifadesi sağlanan rekombinant proteinler Ni-afinite boncukları kullanılarak üreticinin tarif ettiği şekilde yapılmış ve enzimin aktivitesi belirlenmiştir. Nitrit konsantrasyonu Griess metodu kullanılarak ölçülmüştür. Daha sonra saflaştırılan bu enzim ile biyosensör için çalışma elektrodu hazırlanmış ve nitrit ölçümleri yapılmıştır.

5.1. Kullanılan Kimyasallar

Bu tez kapsamında kullanılan tüm kimyasallar tablo 5.1’de verilmiştir.

Tablo 5.1: Kullanılan kimyasallar ve tedarikçileri.

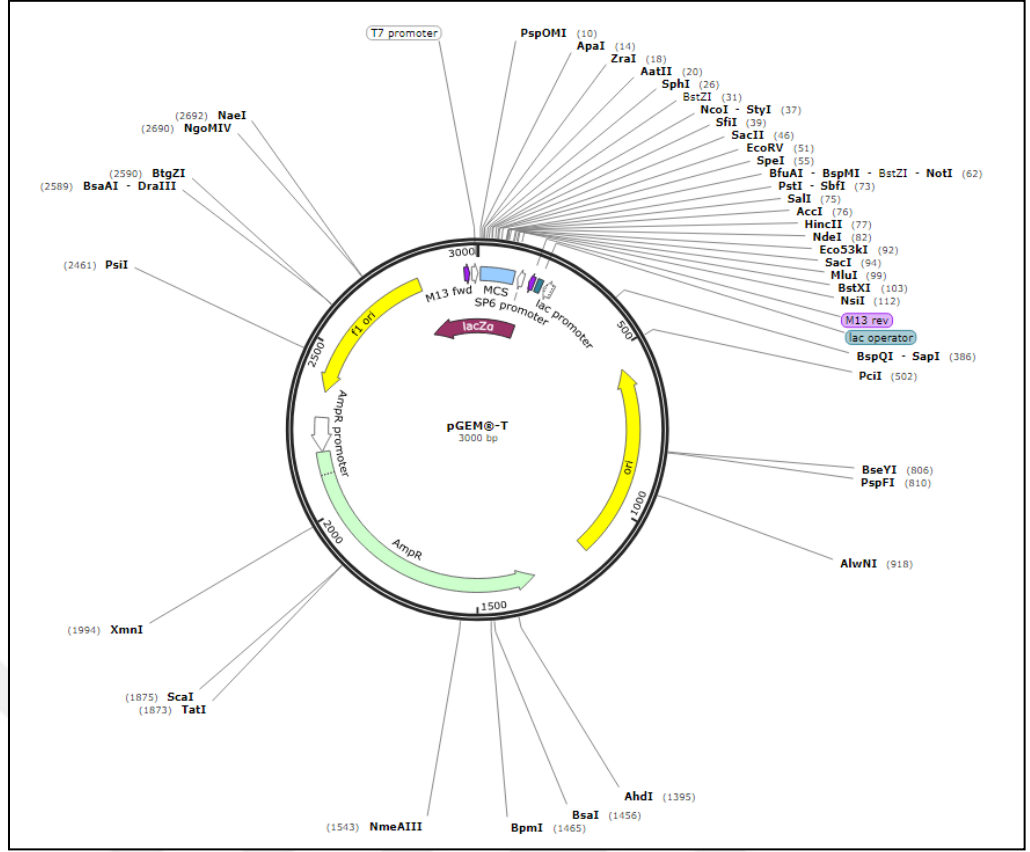
Kimyasal	Marka
Glutaraldehit	Sigma Aldrich
Etanol	Sigma Aldrich
Sodyum Dodesil Sülfat	Merck
Pirol	Acros Organics
Potasyum Klorür	Riedel-de Haën
Di-sodyum Hidrojen Fosfat	Merck
Potasyum Di Hidrojen Fosfat	Merck
Sodyum Klorür	Merck
N-(1-Naftil) Etilendiamin	Sigma Aldrich
Sülfanilik Asit	Sigma Aldrich
Akrilamid	Sigma Aldrich
N, N'-Metilenbisakrilamid	Fluka
İzopropil β -D-1-tiyogalaktopiranosid	BioFroxx
Nickel Affinitiy Gel	Sigma Aldrich
Kanamisin	BioFroxx

Tablo 5.2: Devam.

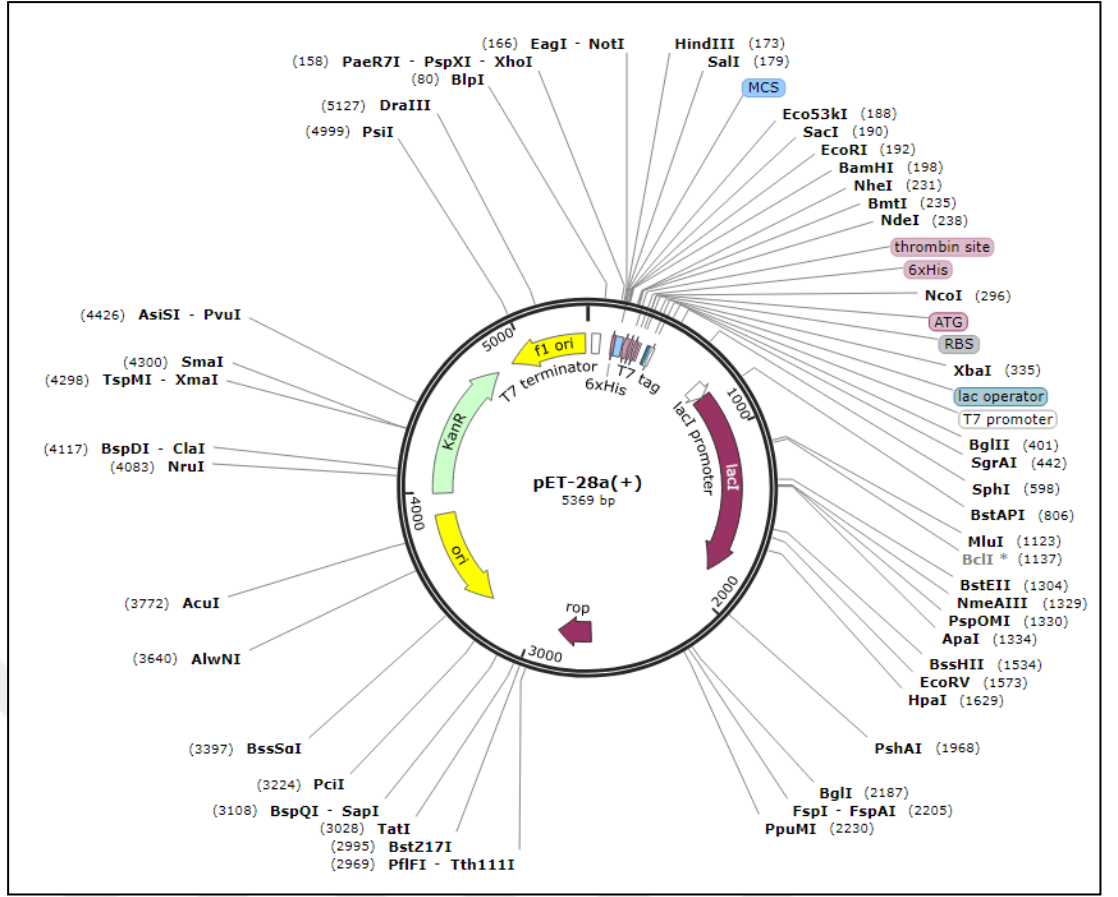
Metil Violojen Diklorür Hidrat	Sigma Aldrich
Tripton	Termo Fisher Scientific
Sodyum Ditionit	Sigma Aldrich
Maya Özü	Biolife
Tris(Hidroksimetil)amino Metan	Merck
Gliserol	Sigma Aldrich
Pepton	Biolife
Sodyum Nitrit	Merck
Agar	Sigma Aldrich
Di-potasyum Hidrojen Fosfat	Merck
Etilendiamintetraasetik Asit	Sigma Aldrich
Amonyum Persülfat	ERLAB
Hidroklorik Asit	Riedel-de Haën
İmmidazol	Sigma Aldrich
Tetrametiletilendiamin	Sigma Aldrich
Sodyum Hidrojen Karbonat	Merck
RNase	Roche Diagnostics
Lizozim	BioFroxx
Fenilmetilsülfonil Florür	Roche Diagnostics
Glikoz	Merck
β -mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Magnezyum Sülfat	Merck
Ampisilin	Sigma Aldrich
Magnezyum Klorür	Merck
3-Morfolinopropan-1-Sülfonik asit	Sigma Aldrich
Rubidyum Klorür	Sigma Aldrich
Potasyum Asetat	Merck

5.2. Klonlama

Bu tez çalışmasında *E. coli* K12 nirB, pET28a vektörüne Polihistidin tag (His-tag) afinite kuyruğu içerecek şekilde klonlanmıştır. nirB geni, uygun kesim bölgelerini içeren primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Elde edilen PCR ürünü ilk olarak şekil 5.1’de [62] vektör haritası verilen pGEM-T ara klonlama vektörüne aktarılmıştır. pGEM-T vektörüne aktarılan nirB geni 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -D-Galactopyranoside (X-Gal)/isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) içeren 6petrilerde büyütülmüştür. Bir günlük inkübasyon (WiseCube-İnkübatör) sonunda oluşan mavi ve beyaz kolonilerden beyaz olan koloniler seçilmiştir. Bu beyaz koloniler petrilere tekrar ekilerek inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra plazmid izolasyonu gerçekleştirilerek %0.8’lik agaroz jelinde yürütülerek klonlanması planlanan nirB geninin pGEM-T vektörünün içinde olduğu ispatlanmıştır. pGEMTnB plazmidi *NheI* ve *XhoI* (Thermo Scientific, Waltham) enzimleri ile kesilerek nirB gen inserti çıkarılmıştır. Bu gen parçası şekil 5.2’de [63] vektör haritası verilen pET28a vektörüne klonlamak amacıyla jelden alınmıştır. pGEMT vektöründen kesilen nirB geni aynı enzimlerle kesilip lineer hale getirilmiş pET28a vektörü ile ligasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra transformasyon *E. coli* TOP10 ve BL21 hücrelerinde yapılmıştır. Transformantlardan elde edilen plazmidlerle yapılan PCR sonucunda plazmid ile 2544 civarında beklenen PCR ürünü elde edilebilmiştir.



Şekil 5.1: pGEM-T vektör haritası.



Şekil 5.2: pET28a vektör haritası.

5.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Genlerin çoğaltılması amacıyla uçlarında *NheI* ve *XhoI* enzim kesim bölgeleri bulunan *nirB* genine ait primerler tasarlanmıştır. Kullanılan primerler tablo 5.2’de gösterilmiştir. *E. coli* K12 genomik DNA’sı (Deoksiribo Nükleik Asit) kalıp DNA olarak kullanılmıştır. PCR; 5 U Tag DNA Polymerase (Thermo Scientific, Waltham), 50 pmol ileri ve geri primerler, 1mM dNTP, kalıp DNA ve PCR tamponu karışımı kullanılarak 29 döngü (her döngü 95°C de 1 dk, 55°C de 1 dk ve 72 °C de 1 dk) olacak şekilde planlanmış ve reaksiyon bu şekilde gerçekleştirilmiştir. 100 µl lik karışıma 1 µl (100 ng civarında) genomik DNA kalıp olarak eklenmiştir. Genomik DNA izolasyonu için *E. coli* K12 hücreleri Luria Agar (LA; 10g/L NaCl, 10g/L Pepton, 5g/L Maya Özü, 14g/L Agar)) besiyerinde üretildikten sonra GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, Waltham) kullanılarak izole edilmiştir.

Tablo 5.3: Primerler ve baz dizileri.

Primer	Restriksiyon Enzimi	Baz Dizisi
NirB İleri Primer	<i>NheI</i>	5' <u>GCTAGC</u> CAGCAAAGTCAGACTCGCAATTAT3'
NirB Geri Primer	<i>XhoI</i>	5'CTCGAGT <u>CAT</u> TGCGTTGTCCTCCACCAGAGTT3'
pET28a İleri Primer		5'GCTAGTTATTGCTCAGCGG3'
pET28a Geri Primer		5'TAATACGACTCACTATAGGG3'

5.2.2. Ligasyon

NheI ve *XhoI* enzimi ile kesilmiş olan nirB geni ve aynı enzimlerle lineer hale getirilmiş pET28a vektörü ligasyonla birleştirilmiştir. Ligasyon işlemi için DNA parçalarının birleştirilmesinde kullanılan T4 DNA ligaz enzimi (Thermo Scientific, Waltham) kullanılmıştır. nirB geni, pET28a vektörü, ligasyon tampon çözeltisi ve ligaz enzimi içerecek şekilde hazırlanan ligasyon karışımı 16°C'de bir gün inkübasyona bırakılmıştır. Ligasyon işlemi vektör/insört oranı 1/2 olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

5.2.3. Kompetan Hücre Hazırlama

Kompetan hücre hazırlamak amacıyla Luria Broth (LB; 10g/L NaCl, 10g/L Pepton, 5g/L Maya Özütü) besiyerinde OD₆₀₀ değeri 0.5 absorbans seviyesine ulaşana kadar 37°C'de büyütülen *E. coli* hücreleri (Top10 ve BL21 suşları) kullanılmıştır. Büyüyen kültür buza alınarak 15 dakika buzda bekletildikten sonra 4°C, 4500 RCF hızda 5 dakika santrifüjlenerek (Sigma 3–18 K Santrifüj) çöktürülmüştür. Sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra, pelet üzerine solüsyon 1 (30 mM Potasyum Asetat, 10 mM CaCl₂, 100 mM RbCl ve %15 Gliserol, pH=6.5) eklenerek çözünmesi sağlanmış ve 5 dakika buzda bekletilmiştir. Daha sonra tekrardan 4°C, 4500 RCF hızda 5 dakika santrifüjlenerek çöktürülmüş ve pelet solüsyon 2'de (10 mM MOPS (3-

morfolinopropan-1-sülfonik asit), 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl ve %15 Gliserol, pH=6.5) çözdürölüp 100'er µL mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. 30 dk bekletildikten sonra sıvı nitrojende dondurularak -70°C kullanılıncaya kadar saklanmıştır. İşlemler sırasında solüsyonlar, hücreler ve kullanılan santrifüj tüpleri buzda bekletilmiştir. Bu süreçte kullanılan solüsyonlar, distile su ve santrifüj tüplerinin tamamı sterilidir.

5.2.4. Transformasyon

Ligasyonu gerçekleştirilen pET28nB geninin hücreye transformasyonu için *E. coli* Top10 kompetan hücreleri kullanılmıştır. -70°C'de saklanan kompetan hücreler, ligasyon ürünleri ile 30 dakika buzda bekletilmiştir. Ligasyon ürünü kompetan hücrenin içine eklenerek 5 dakika buzda tutulmuştur. Ligasyon ürününün kompetan hücre içine girebilmesi için buzda tutulan ürün 42°C'lik su banyosunda 1 dakika bekletilerek sıcaklık şokuna maruz bırakılmıştır. 1 dakika sonunda tekrar buza konularak 2 dakika buzda bekletilmiştir. Transformasyona uğramış hücrelerin üzerine SOC (2% Tripton, 0.5% Maya Özütü, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ ve 20 mM glikoz) besiyeri eklenmiş ve 37°C' de 1 saat 100 rpm hızda çalkalanmaya bırakılmıştır. Daha sonra hücreler 500 RCF'de santrifüjlenerek çöktürölmüştür. Üst sıvı faz uzaklaştırıldıktan sonra pelet üzerine 100 µL steril su eklenmiş ve çözünmesi sağlanmıştır. Kanamisin içeren antibiyotikli LA besiyeri üzerine solüsyon yayılarak 37°C' de bir gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu elde edilen kolonilerden plazmid izolasyonu yapıp restriksiyon enzimi ile kesim sonucu doğrulama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha verimli protein ifadesi için plazmitler *E. coli* BL21 kompetan hücrelerine aktarılmıştır.

5.2.5. Plazmit İzolasyonu

Tez kapsamında yapılan plazmid izolasyonları GeneJET Plasmid Miniprep Kit ile yapılmıştır. Plazmid izolasyonunda öncelikle plazmidi izole edilecek hücre uygun koşullar altında büyütölmüştür. Daha sonra hücreler 12000 rpm'de 5 dakika çöktürölmüştür. Pelet üzerine resüspansiyon çözeltisi eklenmiş ve peletlerin çözünmesi sağlanmıştır. Süspanse hale gelen hücrelerin üzerine liziz çözeltisi eklenerek parçalanması sağlanmıştır. Daha sonra nötralizasyon tamponu eklenmiş ve

12000 rpm’de 5 dakika çöktürülmüştür. Sıvı faz plazmid izolasyon kiti içerisinde bulunan kolona aktarılmıştır ve 12000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda kolona yıkama tamponu eklenerek 1 dakika 12000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Son olarak kolondaki plazmidleri toplamak amacıyla elüsyon tamponu kolona eklenmiş, 5 dakika bekletilmiş ve 12000 rpm’de 2 dakika çöktürülmüştür. Elde edilen plazmid %0.8’lik agaroz jelde yürütülerek plazmidin konsantrasyonu ve büyüklüğü belirlenmiştir.

5.2.6. Klonlamanın Restriksiyon Enzimleri ile Doğrulanması

Önceki bölümlerde anlatıldığı gibi nirB geni öncelikle PCR ile çoğaltılmış ve pGEM-T vektörüne klonlanmış ve daha sonra bu vektörden kesilerek pET28 vektörüne aktarılmıştır. Bu aşamalarda klonlamanın doğruluğu restriksiyon enzimleri ile kesim yapılarak belirlenmiştir. NirB ve pET28a vektörü ligasyon ile birleştirildikten sonra *E. coli* Top10 hücrelerine aktarılmıştır. Kanamisinli besiyerinde oluşan transformatlardan elde edilen plazmidler (NirB genini taşıyan pET28nB vektörü) klonlamanın doğrulanması amacıyla *NheI* ve *XhoI* enzimleri ile kesilmiştir. Agaroz jelinde kesilen DNA bantların boyutları belirlenmiş ve bu şekilde klonlama doğrulanmıştır. Bu çalışmada kullanılan bakteri suşları ve vektörler Tablo 5.3 ve 5.4’te listelenmiştir.

Tablo 5.4: Bakteri suşları.

Bakteri suşları	Kullanım amacı	Kaynak
<i>Escherichia coli</i> K12	nirB geninin kaynağı	ATCC, USA
<i>Escherichia coli</i> BL21	Yüksek protein ifadesi	Amersham Biosciences, UK
<i>Escherichia coli</i> Top10	<i>Escherichia coli</i> nirB geninin klonlandığı konakçı suş	Invitrogene Co

Tablo 5.5: Vektörler.

Vektörler	Kullanım amacı	Kaynak
pGEM-T	PCR ara klonlama vektörü	Promega Inc.
pET28a	His-tag içeren saflaştırma vektörü	Novagen, USA

5.3. Enzimin Üretimi ve Saflaştırılması

NirB içeren pET28a vektörünün (pET28nB) aktarıldığı *E. coli* BL21 transformant hücreleri, 50 µg/mL kanamisin içeren 30 mL Terrific Broth (TB; %1.2 Tryptone, %2.4 Maya Özütü, %0.5 Gliserol, 89 mM PBS) ortamında gece boyunca 37°C'de büyütülmüştür. Büyüyen kültür, 1 L'lik bir şişede bulunan 300 mL'lik antibiyotik eklenmiş bir TB ortamını aşılama için kullanılmıştır ve bu yeni ortam 37°C'de çalkalanarak büyütülmüştür. Kültür daha sonra 0.5 mM IPTG (İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit) ile 18 saat 25°C'de indüklenmiştir. Hücreler 20 dakika boyunca 4000 rpm'de 4°C'de santrifüjlenerek çöktürülmüş ve toplanan pelletler bir gün boyunca -32°C'de dondurulmuştur. Dondurulmuş olan hücrelere lizozim içeren bir tampon (100mM K₂HPO₄, 1mM MgSO₄, 1mM PMSF (fenilmetilsülfonil florür), 0.02mg/mL Rnase, 1mg/mL lizozim pH=7) solüsyonu eklenmiş ve hücrelerin çözünmesi sağlanmıştır. Hücreler sonikatörde (UP100H-Hielscher) 4°C'de 1 dakika boyunca 0.5 cycle olarak ve 30 tekrar ile parçalanmıştır. Hücre kalıntılarından kurtulmak amacıyla hücreler, 12000 RCF ve 4°C'de 20 dakika boyunca çöktürülmüştür. Santrifüj sonrası sıvı kısım toplanmıştır. Toplanan protein saflaştırma kolonuna yüklenmiş ve yıkama tamponu ile (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 50mM İmmidazol (pH=8)) yıkanmıştır. Yıkama sonunda kolona elusyon tamponu (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 500mM İmmidazol (pH=8)) eklenmiş ve 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda enzim His etiketli Ni⁺/Co⁺² NTA afinite dolgu materyalli kolondan toplanmıştır.

5.3.1. SDS-PAGE Analizi

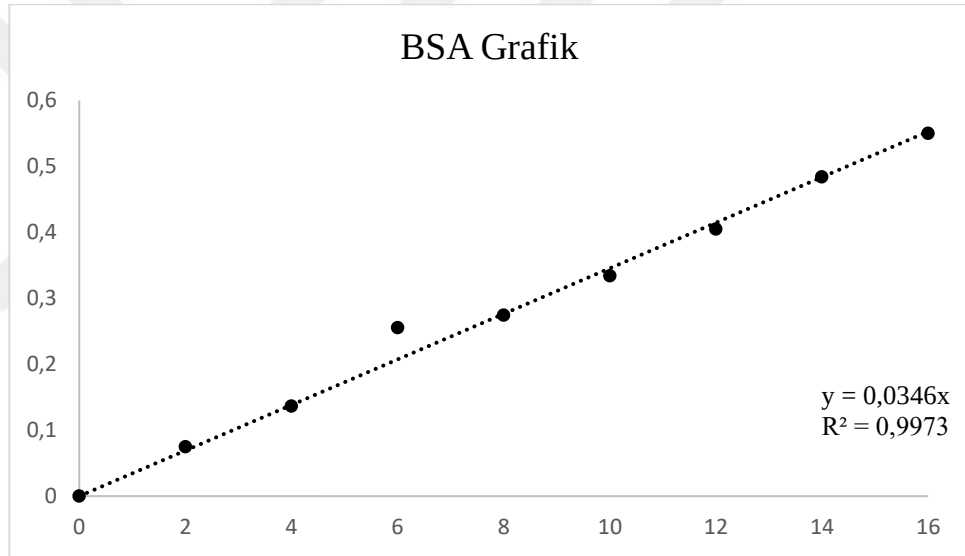
Saflaştırılmış olan proteinlerin gözlenmesi, büyüklüklerinin tespit edilmesi ve konsantrasyonlarının belirlenmesi için poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile analizi sağlanmıştır. %15 konsantrasyonda ayırma yani separating (Acrylamid-Bisacrylamide (30/0.8 w/w %), Tris 1,5 M (pH=6.8), SDS (%10), APS (%50)) jel ve %5 konsantrasyonda sıkıştırma yani stacking (Acrylamid-Bisacrylamide (30/0,8 w/w %), Tris 0,5 M (pH=6.8), SDS (%10), APS (%50)) protein jelleri kullanılmıştır. Saflaştırılan proteinler 4:1 (protein: boya) oranında boya (Coomassie blue strain; %10 asetik asit, %90 distile su ve %0.006 coommasie blue) ile karıştırılarak jellere yüklenmiştir. Proteinlerin büyüklüklerinin tespiti için saf proteinin yanına ekler kısmında verilmiş olan protein markerı (Thermoficher page ruler prestainedprotein ladder) yüklenmiştir. Güç kaynağı ilk önce 80 voltaj ile çalıştırılmış ve numunelerin separating jele geçişiyle birlikte voltaj 180'e çıkarılmıştır.

5.3.2. BSA (Bovine Serum Albumin) Analizi

1 mg/mL standart bovine serum albumin (BSA), % 0.9 NaCl çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Daha sonra 2.5 mg Coomassie brilliant blue G-250, 1.25 mL %95 ethanol'da çözdürülmüştür ve üzerine 2.5 mL %85 fosforik asit eklenmiştir. Hazırlanan bu boya çözeltisi 25 mL'ye tamamlanmıştır ve Bradford çözeltisi hazır hale getirilmiştir. Çözelti kullanılacağı zaman 5 kat su ile seyreltilmiş ve o şekilde kullanılmıştır. Tablo 5.5'te belirtilen standart konsantrasyonlar hazırlanmış ve hazırlanan standartların renklerinin sabitlenmesi için 5 dakika bekletilmiştir. 595 nm'de UV Spektrofotometresi ile 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 nolu tüplerin absorbans değerleri 1 numaralı tüpe karşı okunmuştur. Bu elde edilen veriler kullanılarak standart bir eğri oluşturulmuştur (Şekil 5.3). Bilinmeyen proteinlerin konsantrasyonlarının tayini için bu oluşturulan standart eğri kullanılmıştır.

Tablo 5.6: BSA standart çözeltileri.

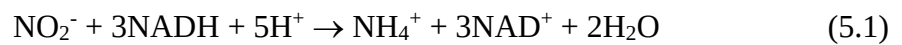
Bileşenler	Tüp No								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 mg/mL BSA (µL)	0	2	4	6	8	10	12	14	16
% 0.9 NaCl (µL)	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Bradford Çözeltisi (µL)	900	998	996	994	992	990	988	986	984
Toplam Hacim (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 5.3: BSA standart eğrisi.

5.4. NADH Varlığında Enzim Aktivitesi

Nitrit redüktaz enzim aktivitesini belirlemek amacıyla Coleman ve arkadaşları (1978) tarafından uygulanan nitritin amonyuma indirgenme reaksiyonu sırasında gerçekleşen NADH konsantrasyon değişimi 366 nm’de spektrofotometrik olarak takip edilmeye çalışılmıştır [64]. Reaksiyon aşağıdaki şekilde gerçekleşmektedir.



1 mM NAD⁺, 0.5 mM NADH, 2 mM NO₂⁻ varlığında enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır fakat NADH konsantrasyonunda enzim aktivitesinden bağımsız olarak düşüş gözlenmiştir. Bu nedenle aktivite hesabı doğru bir şekilde gerçekleştirilememiştir. Ortamda nitrit yokken NirB'nin NADH'ı okside etme nedeninin, enzimin oksijen varlığında okside olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Okside olan enzim, NADH ile indirgendikten sonra nitriti indirgeyebildiği rapor edilmiştir. Song ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan çalışmada enzimin NADH kofaktörüne doyurulması gerektiği ve bu nedenle yüksek konsantrasyonda NADH ile muamele edilmesi gerektiğinden bahsedilmiştir [49]. Ancak yüksek konsantrasyonlarda NADH varlığında yapılan aktivite ölçümlerinde, Griess metodu ile nitrit giderimine bakılmış ve kayda değer bir nitrit giderimi gözlemlenememiştir. NADH varlığında nitrit ölçümleri güvenli bir şekilde gerçekleştirilemediğinden Martinez-Espinosa (2001) tarafından geliştirilen metil viyolojene (MV) dayalı aktivite ölçüm metodu ile nitrit ölçümünün yapılmasına karar verilmiştir [49], [65].

5.5. Enzimin Aktivitesi ve Karakterizasyonu

Escherichia coli'de üretilip saflaştırılan NirB enziminin aktivitesi metil viyolojen varlığında nitrit giderimi üzerinden belirlenmiştir. Sodyum ditionit varlığında metil viyolojen MV⁺²'den nitrit redüktaz enzimini aktive eden MV^{•+} formuna indirgenir, bu reaksiyon aşağıdaki eşitlikte verilmiştir.



Elektron vericisi olarak görev yapan sodyum ditionit, nitritin amonyuma indirgenmesini tetikler. Nitritin sodyum ditionit varlığında amonyuma indirgenme reaksiyonu aşağıda verildiği gibidir.



Song ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan nitrit redüktaz aktivite ölçümlerinde metil viyolojen elektron donörü ve Na₂S₂O₄ indirgenme ajanı olarak kullanılmış ve reaksiyon sonucu azalan NO₂⁻ spektrofotometrik yöntem olan Griess

metodu kullanılarak takip edilmiştir [49]. Nitrit ölçümleri her aktivite ölçümü için üç kez tekrarlanmıştır. Aktivite ölçümleri; oda sıcaklığında, TE tamponu (Tris-EDTA: 50mM Tris, 5mM EDTA pH=7), 16 mM Na₂S₂O₄ (0.1 M NaHCO₃ içinde günlük hazırlanır), enzim, 3 mM metil violojen ve nitrit ile 250 µL hacimde başlatılır ve 5 dakika süre sonunda vortekslenerek metil violojenin okside edilerek ile reaksiyon sonlandırılır [65]. Enzim içermeyen kontrol deneylerinde enzim solüsyonu yerine enzimin tamponu (2 mM β-mercaptoethanol (βME) içeren saflaştırma elusyon tamponu) kullanılmıştır. Nitrit miktarı ölçülecek olan numunelere öncelikle sülfanilik asit eklenmiş ve 4 dakika karanlık ortamda bekletilmiştir süre sonunda numunelere N-(1-Naftil) etilendiamin solüsyonu eklenmiş ve 30 dakika karanlıkta bekletildikten sonra 543 nm’de nitrit miktarları absorbands cinsinden belirlenmiştir. Sonuçlar standard eğri ile kıyaslanarak nitrit konsantrasyonu hesaplanmıştır. NirB enziminin karakterizasyonunun belirlenmesi için de Griess yöntemi kullanılmıştır. Enzimin kinetik parametrelerinin belirlenmesi amacıyla 0-30 mM nitrit konsantrasyon aralığında aktivite ölçümleri yapılmıştır. Bu deneylerde 250 µL hacimde 160 ng enzim (toplam protein) kullanılmıştır. Reaksiyon kinetiği sonuçları Michaelis-Menten eşitliğine göre belirlenmiş, Lineweaver-Burk lineerleştirme metodu kullanılarak nitrit redüktaz aktivitesine ait Km ve Vmax değerleri hesaplanmıştır.

5.6. Amperometrik Biyosensör Çalışma Elektrodunun Hazırlanması

Ag/AgCl referans elektrot saf su ile yıkanmış ve sürekli olarak 3 M KCl çözeltisi içinde saklanmıştır. Karşıt elektrot olarak kullanılan platin elektrot ve çalışma elektrotu olarak kullanılan altın elektrotunun temizliği; temizleme pedi üzerine bir miktar alümina tozu alınmış ve elektrot zımparalanmıştır. Bu işlem 0.05 µm boyutundaki alümina tozu ile yapılmıştır. İşlem sonunda platin elektrot ve çalışma elektrodu 5 dakika süre boyunca su ve ethanol (50 v/v %) karışımında sonikasyona tabi tutulmuştur. Çalışma elektrotu olarak kullanılan altın elektrotunun kaplama işlemi için, poligluteralehit (PGA) çözeltisi içerisine 2 mM sodyum dodesil sülfat (SDS) ve 10 mM pirol ilave edilmiş ve çözelti karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Daha sonra çalışma elektrotu, karşıt elektrot ve referans elektrot hücre içerisinde daldırılarak gerekli elektriksel bağlantılar yapılmış 50 mV/s tarama hızında, (-1)-(+1.5) V aralığında voltaj uygulanarak ve 15 döngü halinde dönüşümlü voltametri yöntemi ile

elektropolimerizasyon sağlanmıştır. Elektropolimerizasyon işleminden sonra çalışma elektrotu desikatörde kurutulmuştur, %25'lik gluteraldehit içerisine daldırılmış ve 3 saat bekletilmiştir. 3 saat sonunda elektrot 225 μ L enzim içerisine daldırılmıştır ve bir gece 4°C'de bekletilmiştir. Elektrot yüzeyine tutunamamış enzimlerin yüzeyden uzaklaştırılması için gece sonunda elektrotlar distile su ile yıkanmıştır. Elektrot, aktivite ölçümlerine kadar 4°C'de saklanmıştır.

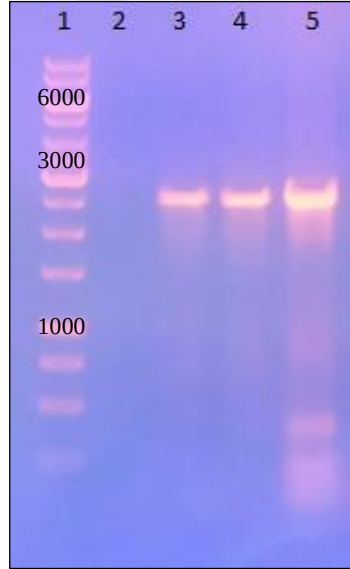


6. BULGULAR

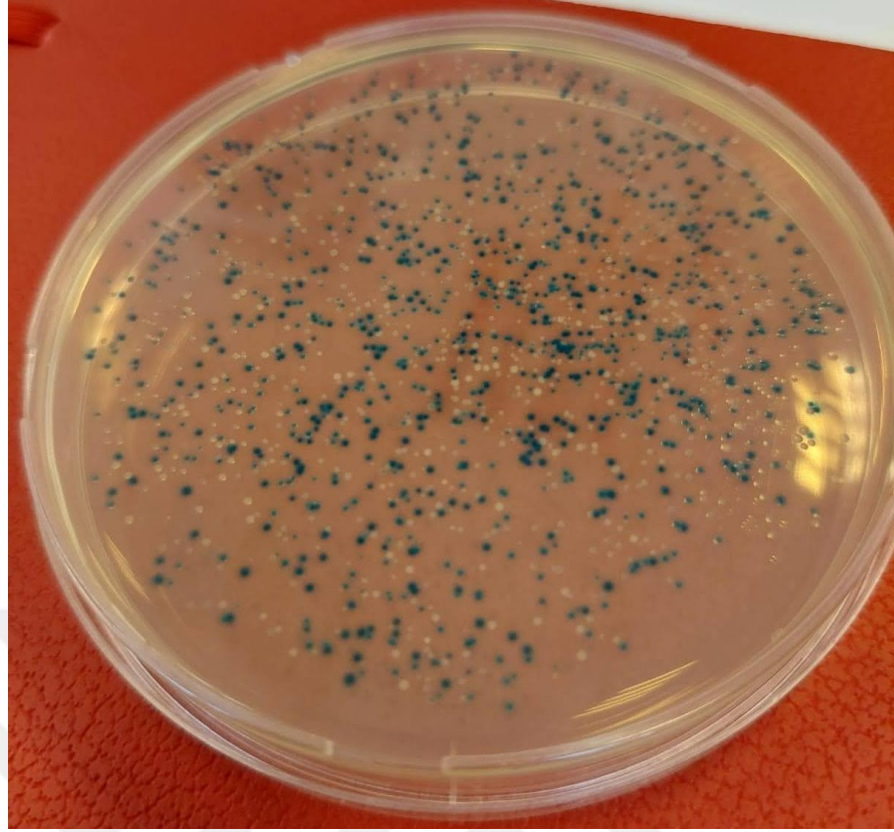
6.1. NirB Geninin Klonlanması

6.1.1. NirB Geninin pGEM-T Vektörüne Klonlanması

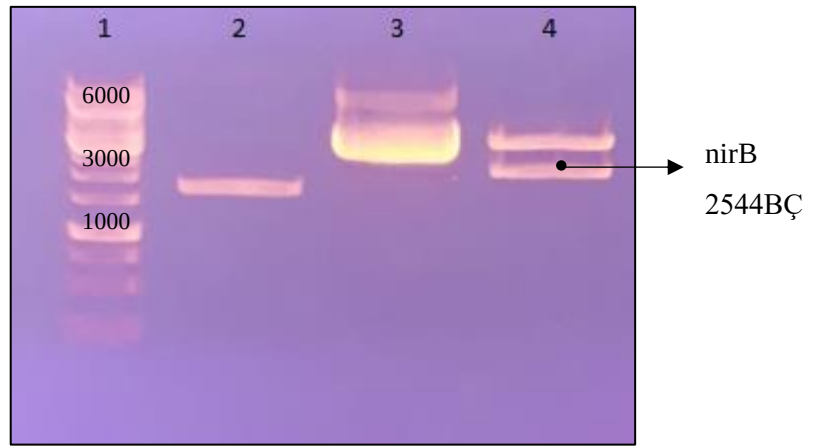
nirB geni *E.coli* K12 hücresinden izole edilen genomik DNA kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır (Şekil 6.1), PCR ürünleri jelden alınarak pGEM-T vektörüne klonlanılmış ve sonra *E. coli* kompetan hücrelerine aktarılmıştır. Bu hücreler X-Gal, IPTG ve amfisilin içeren LA besiyerleri üzerine yayılmıştır (Şekil 6.2). Mavi ve beyaz kolonilerin oluşumu gözlemlenmiş ve beyaz kolonilerden elde edilen plazmidler uygun enzimlerle kesilerek doğru genler içerdikleri ispatlanmıştır (Şekil 6.3). nirB geni 2544 baz çifti (BÇ) büyüklüğündedir. Şekil 6.3'te pGEMTnB plazmidinin *NheI* ve *XhoI* enzimleri ile kesimi sonucu nirB gen insertinin çıkarıldığını göstermektedir. Bu gen parçası pET28a vektörüne klonlamak amacıyla jelden kesilerek ligasyonda kullanılmıştır.



Şekil 6.1: PCR ile NirB geninin çoğaltılması.
1) Marker, 3, 4, 5) NirB.



Şekil 6.2: Mavi beyaz koloni oluşumu.

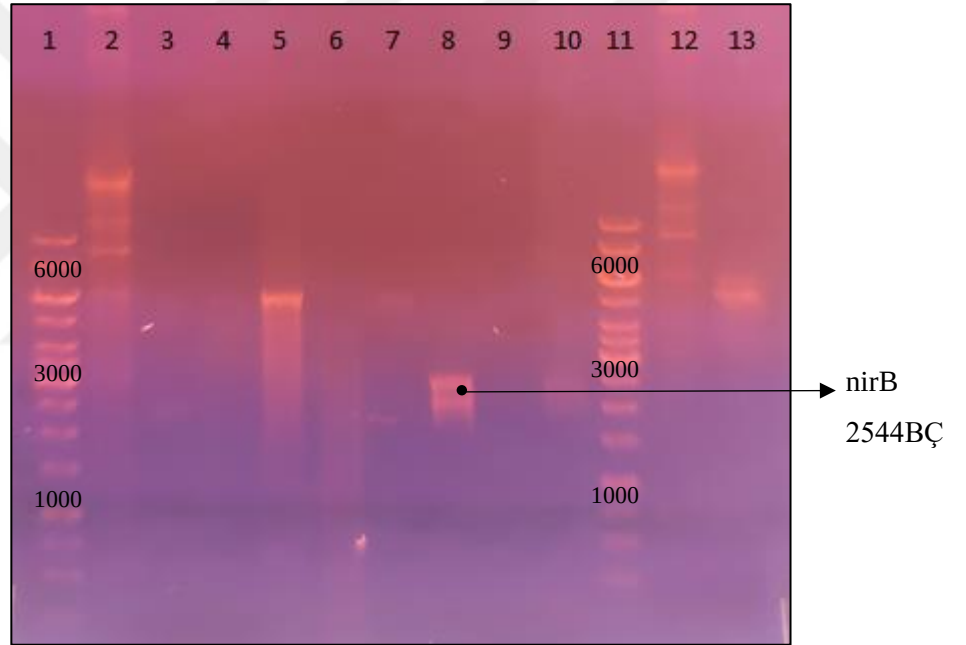


Şekil 6.3: pGEMT vektörüne klonlamanın enzim kesimi ile doğrulanması.
1) Marker, 2) pGEMT, 3) pGEMTnB, 4) *NheI* ve *XhoI* ile kesilmiş pGEMTnB.

6.1.2. NirB Geninin pET28a Vektörüne Klonlanması

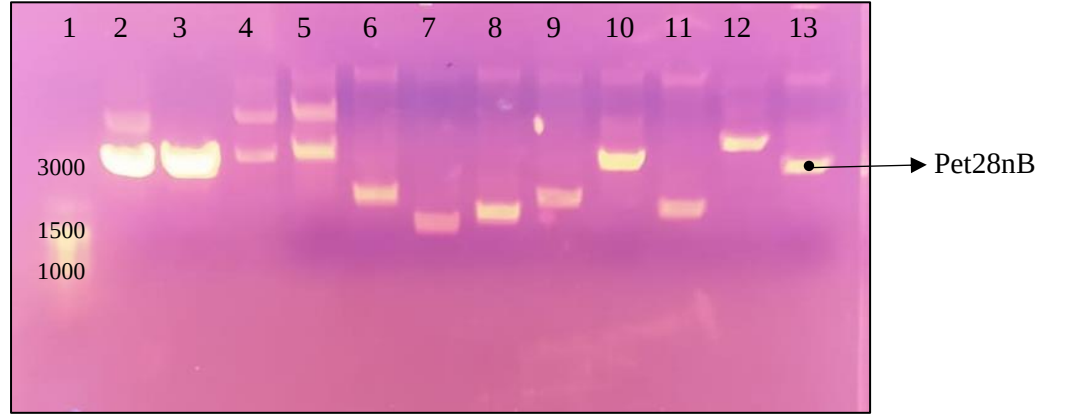
pGEMT vektöründen kesilen nirB geni aynı enzimlerle kesilip lineer hale getirilmiş pET28a vektörü ile ligasyona tabi tutulmuştur. nirB geni pET28a vektörüne

klonlanması amacıyla pGEMT'den *NheI* ve *XhoI* enzimleri ile kesilmiştir. pET28a vektörü de nirB geni ile aynı enzimlerle kesilip lineer hale gelmiştir (Şekil 6.4). 2544 BÇ nirB geni jelden saflaştırılmış ve lineer hale getirilmiş olan pET28a ile ligasyona tabi tutulmuştur. Ligasyonda plazmid:insert oranı 1:2 olacak şekilde kullanılmış ve transformasyon *E. coli* TOP10 ve BL21 hücrelerinde tekrarlanmıştır. Transformant hücrelerden elde edilen plazmidler Şekil 7.5'te verilmiştir. Birçok transformant elde edilebilmiştir ancak sadece 13 nolu kuyucuktaki plazmid beklenen boyuttur. Transformantlardan elde edilen plazmidlerle yapılan PCR sonucunda Şekil 6.5'te 13 nolu kuyucukta görülen plazmid ile 2544 BÇ civarında beklenen PCR ürünü elde edilebilmiştir (Şekil 6.6). NirB geninin pET28a vektörüne klonlandığı ayrıca *NheI* ve *XhoI* enzimleri ile kesilerek de ispatlanmıştır (Şekil 6.7).



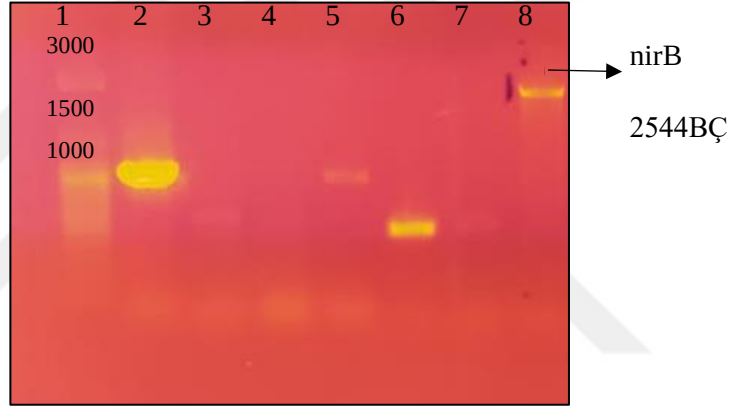
Şekil 6.4: nirB geninin klonlanması için vektörlerin kesilmesi.

1) Marker, 2) pET28 plazmid, 5) pET28 *NheI* ile kesilmiş lineer plazmid (boyut kontrolü amacıyla yüklenmiştir), 8) pGEMTnB *NheI* ve *XhoI* enzimle ile kesim 11) Marker, 12) Kesilmemiş pET28, 13) pET28a *NheI* ve *XhoI* enzimleri ile kesim.



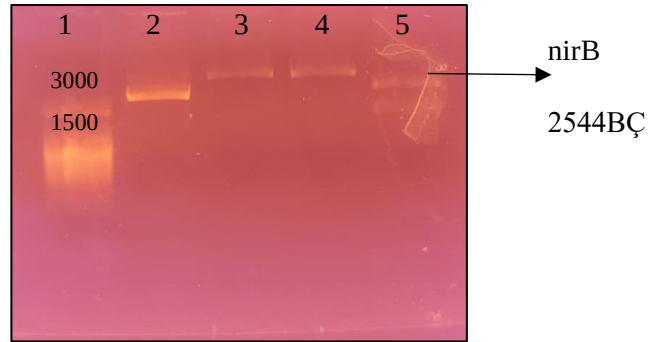
Şekil 6.5: pET28nB plazmid izolasyonu sonuçları.

1) Marker, 2) pGEMTnB plazmidi, 3) pGEMTnB *NheI-XhoI* ile kesim, 7-13) olası pET28nB içeren transformantlardan elde edilen plazmidler (TOP10).



Şekil 6.6: pET28nB PCR ile doğrulanması.

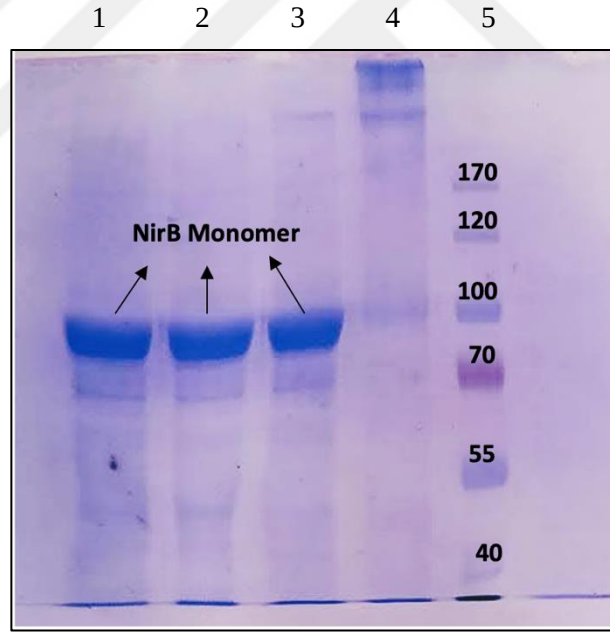
1) Marker, 2) pET28a, 3-8) nirB geninin klonlanmasında elde edilen transformantlardan alınan plazmidlerden (olası pET28nB) elde edilen PCR ürünleri.



Şekil 6.7: nirB geninin pET28a vektörüne klonlanmasının enzim kesimi ile doğrulanması. 1) Marker, 2) pET28nB plazmidi, 3) pET28nB *NheI* ile kesim, 4) pET28nB *XhoI* ile kesim, 5) pET28nB *NheI-XhoI* ile kesim.

6.2. Protein Üretimi ve Saflaştırma

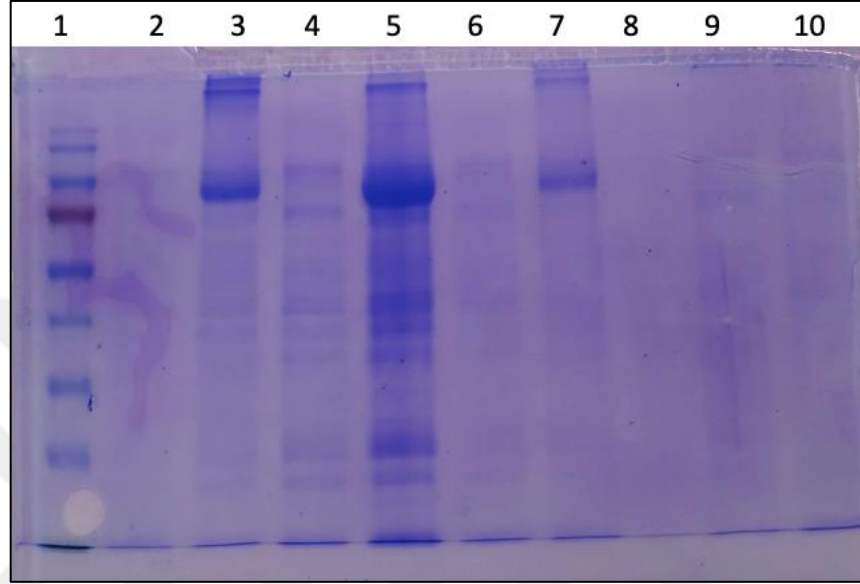
nirB genini taşıyan rekombinant vektör pET28nB, gen ifadesi için BL21 hücrelerine aktarılmıştır. Materyal ve metot bölümünde anlatıldığı gibi proteinler His-tag afinite kolonunda saflaştırılmıştır. Protein konsantrasyonları 160-190 µg/mL arasında ölçülmüştür. Sitoplazmadan saflaştırılan NirB proteini yoğun olarak tetramer şeklinde saflaştırılmıştır. βetamerkaptoetanol (βME) varlığında tetramer formları monomere dönüştürülebilmektedir. Tetramer ve dimer NirB proteininin 500 mM βME konsantrasyonunda tamamen monomer haline dönüşmesini sağlamıştır (Şekil 6.8). NirB genini taşıyan pET28 plazmidi pET28nB ve boş pET28 plazmidi içeren *E. coli* hücrelerinde protein ifadesi karşılaştırılmıştır. Beklendiği gibi boş pET28 içeren negatif kontrol hücrelerinde herhangi bir protein saflaştırılmamıştır. Bu sonuç genin sağlıklı bir şekilde ifade edilebildiğini göstermektedir.



Şekil 6.8: NirB proteininin saflaştırılması ve monomerleştirilmesi.
1-3) BME varlığında monomer NirB proteini 4) NirB tetrameri (BME yok)
5) Marker.

6.2.1. Farklı Besiyerlerinin Protein İfadesine Etkisi

Protein üretiminin artırılması amacıyla farklı besiyerleri denemiş (2xYTA, TB, SOC ve LB), en yüksek üretimin TB besiyerinde gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 6.9). Diğer tüm deneylerde hücreler bu besiyerinde üretilmişlerdir.



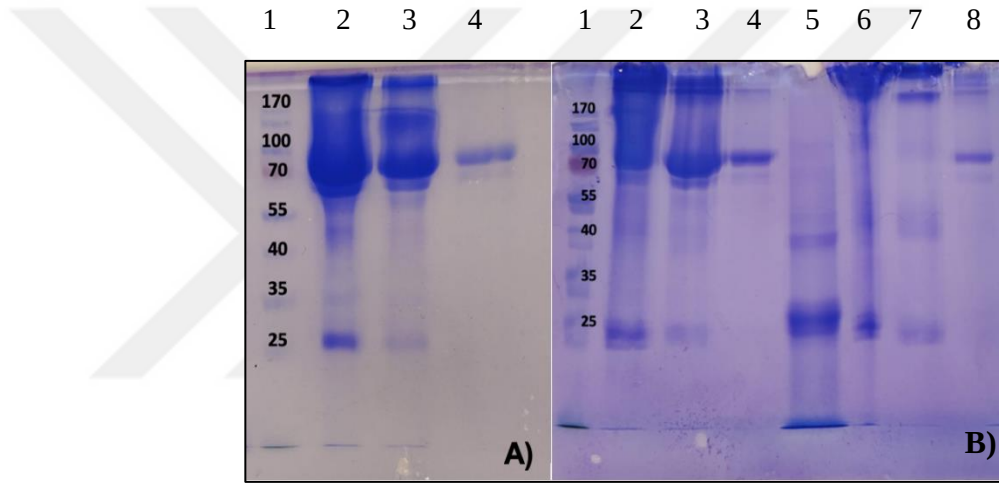
Şekil 6.9: Farklı besiyerlerinin saflaştırmaya etkisi.

1) Marker 2) 2YTA besiyerinde büyütülmüş pET28 proteini 3) 2YTA besiyerinde büyütülmüş NirB proteini 4) TB besiyerinde büyütülmüş pET28 proteini 5) TB besiyerinde büyütülmüş NirB proteini 6) LB besiyerinde büyütülmüş pET28 proteini 7) LB besiyerinde büyütülmüş NirB proteini 8) Boş 9) SOC besiyerinde büyütülmüş pET28 proteini 9) SOC besiyerinde büyütülmüş NirB proteini.

6.2.2. Saklama Koşullarının Protein İfadesine Etkisi

Şekil 6.10’da elusyon numaraları saflaştırma basamağında His kolonuna bağlanan proteinin elusyon tamponu ile kolondan indirilme sıralamasını göstermektedir. Örneğin birinci elusyondan sonra birinci elusyonla indirilmeyen proteinler ikinci kere elusyon tamponundan geçirildiğinde indirilebilmektedir. Bu şekilde üretilen NirB’nin saflaştırılmasında kayıp en aza indirilmektedir (Şekil 7.11 A). İlk saflaştırma ve aktivite takibi deneylerinde NirB proteininin bir hafta içinde aktivitesini kaybettiği, monomer bandın kısa bir süre sonra tekrar tetramerleştiği fark edilmiştir. Şekil 18 B’ye bakıldığında -18 ve +4°C’de bekletilen NirB proteinlerinde sıcaklığın etkisi görülebilir. -18°C’de bir hafta bekletildiğinde NirB konsantrasyonunda 2 ve 3. elusyonlarda önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir.

+4°C’de bekletilen NirB proteinlerinde ise 1 ve 2. elusyonların monomerlerindeki bantlarda ciddi azalmalar gözlemlenmiştir (Şekil 6.10 B). 3. elusyonda elde edilen NirB protein monomer miktarında azalma görülmemiştir. Bazı yayınlarda NirB proteininin okside olması, tetramer oluşumunun sebebi olarak gösterilmektedir [49]. Monomer ve tetramer formları ile yapılan aktivite deneylerinde NirB proteininin aktivitesinin monomerleşme ile bağlantılı olduğu gözlemlenmiştir, protein bekletildikçe monomer formu kaybolduğu ve buna bağlı olarak da aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Bu nedenle proteinin korunması ve monomer formda kalması amacıyla farklı koşullarda saklama ve çeşitli koruyucu ajanların etkisi incelenmiş en etkili ajanın β ME olduğu görülmüştür.

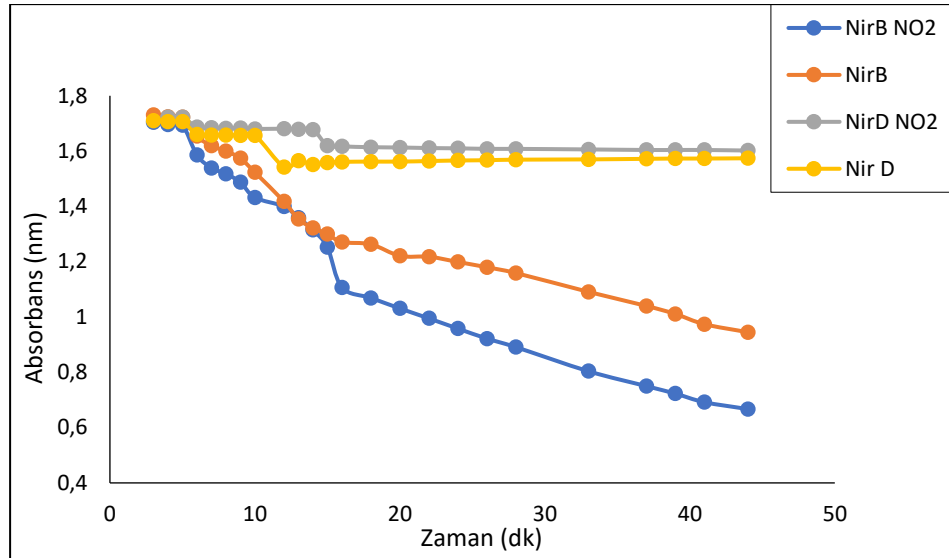


Şekil 6.10: NirB proteininin saflaştırma ve saklama koşullarının belirlenmesi.

A) 1) Marker 2) NirB 1.elusyon 3) NirB 2. Elusyon 4) NirB 3.elusyon, B) 1) Marker 2) -18°C NirB 1.elusyon 3) -18°C NirB 2.elusyon 4) -18°C NirB 3.elusyon 6) 4°C NirB 1.elusyon 7) 4°C NirB 2.elusyon 8) 4°C NirB 3.elusyon.

6.3. NADH Varlığında Enzim Aktivitesi

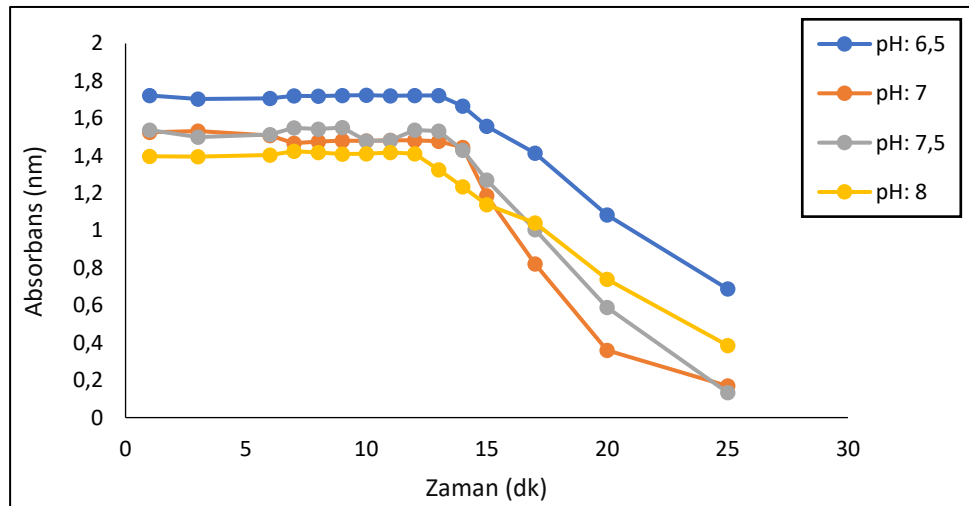
NADH’ın indirgenmesine bağlı olarak absorbans düşüşü nitrit eklenmemiş ortamda da görülmektedir (Şekil 6.11). Enzim ve nitrit varlığında NADH daha hızlı bir şekilde okside olurken nitrit olmadığı ortamda (kontrolde) NADH oksidasyonu daha yavaştır. Ancak kontrolde görülen bu düşüş her aktivite ölçümünde sabit bir değer vermediği için aktivite kıyaslamaları sağlıklı bir şekilde gerçekleştirilememiştir.



Şekil 6.11: NADH varlığında aktivitenin absorbansa dayalı takibi.

6.3.1. NADH Varlığında pH'ın Aktiviteye Etkisi

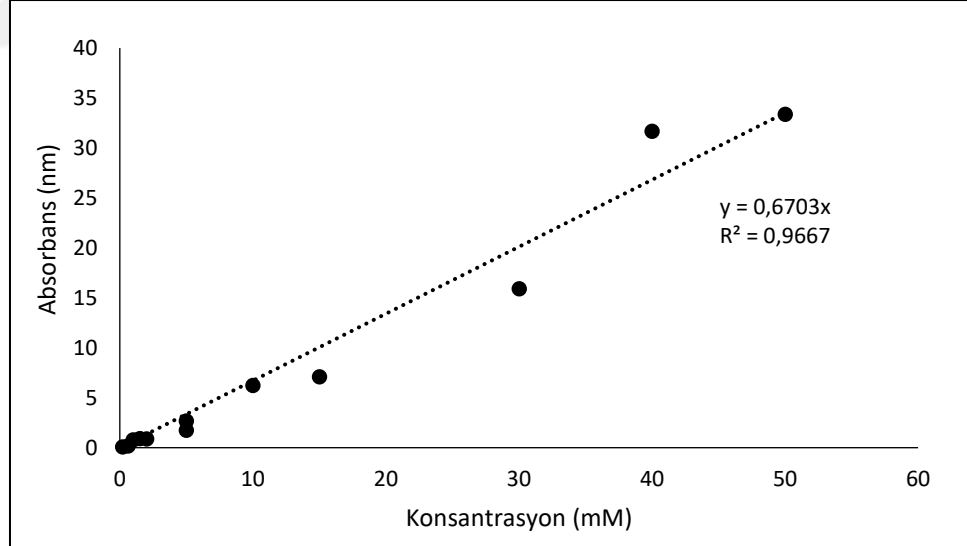
pH'ın NADH varlığında enzim aktivitesine olan etkisinin belirlenmesi amacıyla pH 6,5, 7, 7,5 ve 8'de TE tamponu ile deneyler yapılmıştır. Dört farklı pH ortamında yapılan aktivite ölçümü sonuçlarında en fazla NADH oksidasyonu pH 7-7,5 civarında gerçekleşmiştir. Şekil'de verildiği üzere aktivite kıyaslaması nitrit eklendikten sonra NADH miktarındaki düşüşe göre yapılmıştır. Buna göre en yüksek eğim pH 7 ve 7,5'te görülmüştür (Şekil 6.12).



Şekil 6.12: Farklı pH ortamlarında absorbans takibi.

6.4. Enzimin Aktivitesi ve Karakterizasyonu

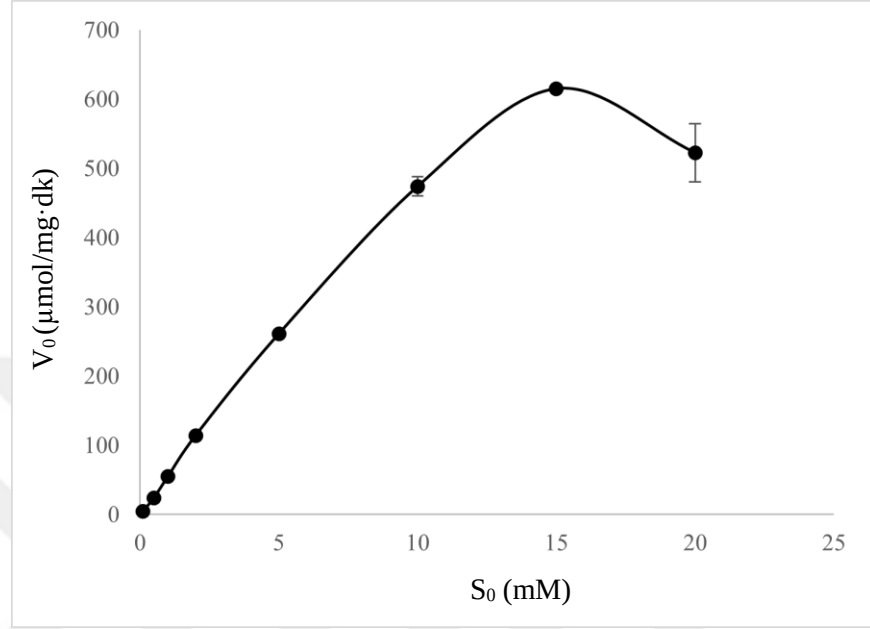
Enzimin kinetik parametrelerinin belirlenmesi ve standart eğrisinin oluşturulması amacıyla 0-30 mM nitrit konsantrasyon aralığındaki farklı konsantrasyonlarda aktivite ölçümleri yapılmıştır. NADH ile yapılan aktivite ölçümlerindeki kararsızlıklardan dolayı aktivite ölçümleri metil violojen ve $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ varlığında Griess metodu kullanılarak nitritin indirgenmesinin takibi ile gerçekleştirilmiştir. Aktivite ölçümleri 3 mM metil violojen, 16 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ve TE tamponu olmak üzere toplam 250 μL hacimde hazırlanmış ve reaksiyon (karışımın vorteklenmesi sonucu metil violojenin okside olması ile) durdurulmuştur. Bu deneylerde 250 μL hacimde 160 ng enzim (toplam protein) kullanılmıştır. Reaksiyon kinetiği sonuçları Michaelis-Menten eşitliğine göre belirlenmiş, Lineweaver-Burk lineerleştirme metodu (Şekil 6.14 ve 6.15) kullanılarak nitrit redüktaz aktivitesine ait K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 1.056 mM ve 0.293 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{dk}$ olduğu belirlenmiştir. Nitrit konsantrasyonlarını hesaplamak amacıyla oluşturulan nitrit-absorbans standart eğrisi Şekil 6.13'te gösterilmektedir.



Şekil 6.13: Griess metoduna göre Nitrit-Absorbans standardı.

Şekil 6.14'te substrat konsantrasyonunun hıza olan etkisi görülmektedir. Nitrit konsantrasyonu 30 mM'a kadar yükseltildiğinde reaksiyon hızının substrat konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak arttığı görülmüştür. Bu değerlere göre başlangıç nitrit miktarına kıyasla nitrit konsantrasyonunda görülen yüzde azalma hesaplanmıştır ve % nitrit giderimi olarak Tablo 6.1'de verilmiştir. Yüzde nitrit

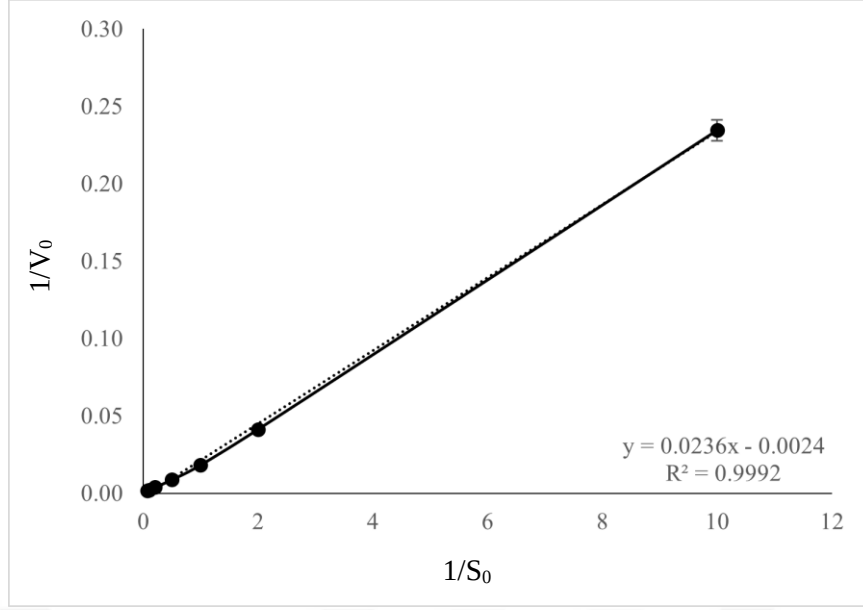
gideriminin başlangıç nitrit konsantrasyonları arttıkça azaldığı görülmüştür ve maksimum % nitrit giderimi 0.1-0.5 mM nitrit konsantrasyon aralığında elde edildiği görülmüştür. NirB'nin reaksiyon kinetik parametrelerinin belirlenmesine ait görsel ise Şekil 6.15'de verilmiştir.



Şekil 6.14: Nitrit konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisi.

Tablo 6.1: Nitrit konsantrasyonunun etkisi.

	NO ₂ ⁻ Konsantrasyonu					
	0,1	0,5	1	5	30	50
% NO ₂ ⁻ giderimi	85.5	83.4	52.2	50.3	50.3	37.6



Şekil 6.15: NirB'nin reaksiyon kinetik parametrelerinin belirlenmesi.

6.4.1. Enzim Miktarı ve Reaksiyon Süresinin Aktiviteye Etkisi

SDS PAGE jellerinde NirB Nitrit redüktaz proteininin tetramer oluşturmaya meyilli bir protein olduğu β ME ile muamele sonrasında monomer yapıya kavuştuğu görülmüştür. Enziminin aktivitesinin monomer oluşumuna bağlı olduğu, β ME varlığında enzimin monomerleştiği ve aktivitesinin daha yüksek çıktığı görülmüştür. β ME etkisi iki farklı şekilde eklenerek araştırılmıştır. İlk saflaştırmada enzimler saflaştırıldıktan bir hafta sonra son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde β ME eklenmiştir. İkinci olarak betamerkaptoetanol enzimler saflaştırıldığı gün (tetramere dönüşmelerine izin vermeden) eklenmiştir. Saflaştırma ve betamerkaptoetanolün etkisini gösteren SDS PAGE jellerinden de görüleceği gibi β ME'nin enzimin aktivitesi üzerinde önemli etkisi bulunmaktadır. Enzim saflaştırıldıktan sonra koruyucu bir ajan olmaksızın saklandığında aktivitesini kaybetmektedir. β ME varlığında ise enzim bir ay 4°C de kaldığında aktivitesi bir miktar azalmasına rağmen aktivite göstermektedir. Genel olarak enzim miktarının nitrit giderimine olan etkisine bakıldığında düşük konsantrasyonda enzim kullanıldığında bile yüksek oranda giderim sağlanabildiği görülmektedir. β ME'ün enzim saflaştırıldığı anda eklenmesinin enzimin aktivitesinin korunması açısından önemli olduğu söylenebilir. Optimum enzim miktarının tespit edilmesi amacıyla farklı miktarlarda NirB ile aktivite ölçüm deneyleri yapılmış ve düşük miktarda enzim ilave edildiğinde bile yüksek aktivite elde edilebildiği

görülmüştür. Saflaştırma sonucu elde edilen NirB enziminin protein içeriği Bradford metodu ile belirlenerek 160 µg/mL olarak bulunmuştur. Deneyde; 1, 5 ve 10 µL enzim ile nitrit giderimleri ölçülmüştür. Kontroller, enzim ile aynı miktarda 2 mM βME içeren tampon eklenerek yapılmıştır. Nitrit konsantrasyonu 0.5 mM ve bekletme süresi 20 dakikadır. Deney sonuçlarına göre; enzim miktarının artırılması ile nitrit gideriminde de artış meydana gelmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 640 ng enzim kullanılması durumunda nitritin %91.5 giderildiği gözlenmiş ve deneylere 640 ng enzim ile devam edilmesine karar verilmiştir (Tablo 6.2).

Tablo 6.2: Enzim miktarının aktivite üzerine etkisi.

Enzim Miktarı (ng/250 µL)	NO ₂ giderimi %	Spesifik aktivite (µmol/ mg protein.dk)
1 hafta sonra βME eklenmiştir.		
800 ng	64.0	4.214
3200 ng	78.6	1.293
8000 ng	84.1	0.553
Saflaştırılan gün βME eklenmiştir.		
640 ng	91.5	8.518
3200 ng	95.4	1.775
6400 ng	97.2	0.904

6.4.2. Sıcaklık, pH ve Reaksiyon Süresinin Aktiviteye Etkisi

Reaksiyon süresinin enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla reaksiyon 5, 20 ve 45 dakikada durdurularak nitrit konsantrasyonu ölçülmüştür. 5 dakikalık reaksiyon sonunda nitrit giderimi %67.2 iken reaksiyon süresi 45 dakikaya çıkarıldığında nitrit giderimi sadece %77.7'ye yükselmiştir. Bu sebeple reaksiyon süresi kısaltılarak çalışmalara devam edilmiş ve diğer tüm aktivite ölçümlerinde 5 dakikalık süre kullanılarak deneyler yapılmıştır. Nitrit gideriminin zamana bağlı değişimi Tablo 6.3'te görüldüğü gibidir.

Tablo 6.3: Zamana bağı enzim aktivitesi.

Süre (dk)	Aktivite ($\mu\text{mol/mg protein.dk}$)	% NO_2 giderimi
5	2.034	67.2
20	0.642	70.5
45	0.280	77.7

pH ve sıcaklığının enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla pH 6, 6.5, 7, 7.5 ve 8’de TE tamponu ile 5 dakika reaksiyon gerçekleştirilmiş ve elde edilen deneysel sonuçlar Tablo 6.4 verilmiştir. Enzimin aktivitesinin pH 7.5’te yüksek olduğu ve enzimin 37°C’de daha hızlı çalıştığı görülmüştür (Tablo 6.5).

Tablo 6.4: pH’ın enzim aktivitesi üzerine etkisi.

pH	İndirgenen NO_2^- %	Aktivite $\mu\text{mol NO}_2^-/\text{mg protein.dk}$
6	82.5	0.515
6.5	84.2	0.526
7	84.1	0.526
7.5	89.6	0.560
8	72.9	0.455

Tablo 6.5: Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi.

Sıcaklık (°C)	İndirgenen NO_2^- %	Aktivite $\mu\text{mol NO}_2^-/\text{mg protein.dk}$
16	74	0.461
25	80	0.501
37	92	0.574
45	81	0.507

6.4.3. İyonların Enzim Aktivitesine Etkisi

Tez kapsamında çeşitli anyon ve katyonların enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Farklı iyon konsantrasyonlarında gerçekleştirilen enzimatik reaksiyon sonucu tükenen nitrit miktarı kontrol (kontrol: iyonlar eklenmeden yapılan aktivite ölçümü %100 kabul edilerek) ile kıyaslanarak Tablo 6.6’da verilmiştir. Sodyum nitrat ve sodyum formatın konsantrasyonu arttıkça enzimin aktivitesinin düştüğü, yüksek

konsantrasyonda amonyum sülfat ve sodyum asetatın enzim aktivitesi üzerine önemli bir etkisi olmadığı görülmüştür. Bakır iyonunun 20 ve 100 mM konsantrasyonlarında (yüksek konsantrasyonda bakırın ölçüm yöntemini etkilemesi sebebiyle) ölçüm alınamamıştır.

Tablo 6.6: İyon ve metallerin enzim aktivitesi üzerine etkileri.

Kimyasal	Relatif Aktivite (%) *		
	5mM	20mM	100mM
Sodyum Nitrat	83.7	64.6	55.4
Sodyum Format	92.9	45.0	50.0
Amonyum Sülfat	93.4	97.8	98.4
Sodyum Asetat	107.4	99.8	95.9
Kadmiyum	76.0	81.7	91.8
Magnezyum	86.0	82.9	92.6
Nikel	93.2	84.8	83.0
Kalsiyum	91.9	80.5	90.7
Bakır	104.1	**	**

*Relatif aktivite değerleri kimyasal konsantrasyonu sıfır olduğu durumda enzimin %100 aktivite gösterdiği kabul edilerek hesaplanmıştır.

**Ölçülemedi.

6.4.4. Saklama Koşullarının Aktiviteye Etkisi

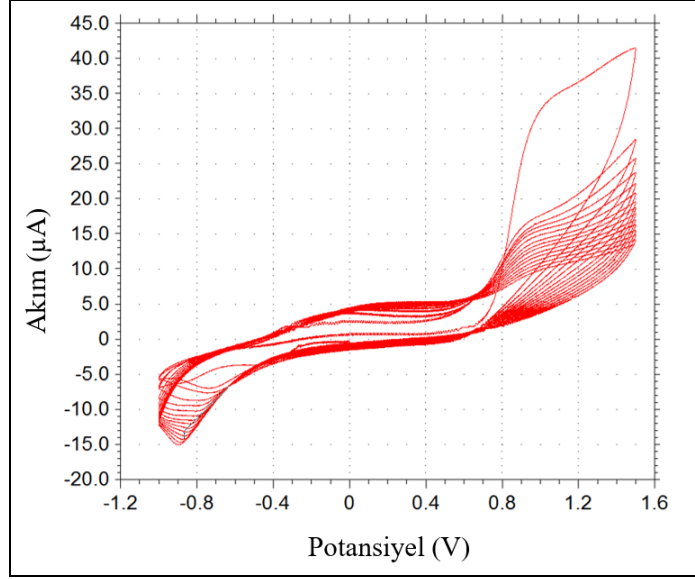
Saflaştırıldıktan sonra 2 mM β ME ile oda sıcaklığında saklanan nitrit redüktaz enziminin aktivitesi belirli zaman aralığında ölçülmüştür. 7 gün sonra enzim aktivitesinde %13, 14 gün sonra %27 ve 21 gün sonra ise %28 aktivite kaybı gerçekleşmiştir. Tez kapsamında enzim, 25 mM kadmiyum varlığında oda sıcaklığında bekletilmiş ve aktivitesi ölçülmüştür. Cd^{+2} iyonu içeren tamponda bekletilen enzimin aktivitesi aynı süre ve koşullarda bekletilen enzim (kontrol) ile kıyaslanmış ve Cd^{+2} iyonunun enzimi koruyarak aktivite kaybını engellediği görülmüştür. Cd^{+2} içeren ve içermeyen (kontrol) tamponlarda dört gün oda sıcaklığında bekletilen enzimlerin sırasıyla %87 ve %77 oranında nitrit giderimi sağladıkları belirlenmiştir.

6.5. PGA/PPy/NirB Altın Elektrot ile Nitrit Ölçümü

Çalışma elektrotu olarak kullanılan altın elektrotunun kaplama işlemi için, PGA çözeltisi içerisine 2 mM SDS ve 10 mM pirol ilave edilmiş ve çözelti karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Daha sonra platin elektrot ve çalışma elektrotu olarak kullanılan altın elektrot materyal ve metot kısmında belirtildiği gibi temizlenip sonike edildikten sonra Ag/AgCl referans elektrot ile hücre içerisinde daldırılarak gerekli elektriksel bağlantılar sağlanmıştır. 50 mV/s tarama hızında, (-1)-(+1.5) V aralığında voltaj ile 15 döngü halinde dönüşümlü voltametri yöntemi ile elektropolimerizasyon sağlanmıştır. Altın elektrotun PGA ve pirol ile kaplanmasına ait CV şekil 6.17’de gösterilmiştir. Elektropolimerizasyon işleminden sonra çalışma elektrotu desikatörde kurutulmuştur, %25’lik gluteraldehit içerisine daldırılmış ve 3 saat bekletilmiştir. 3 saat sonunda elektrot 225 µL enzim içerisine daldırılmıştır ve bir gece 4°C’de bekletilmiştir. Altın elektrodun kaplama öncesinde ve sonrasında çekilen görüntüsü şekil 6.16’de verilmiştir. Kaplama esnasında alınan altın elektroda ait CV ise şekil 6.17’de verilmiştir.

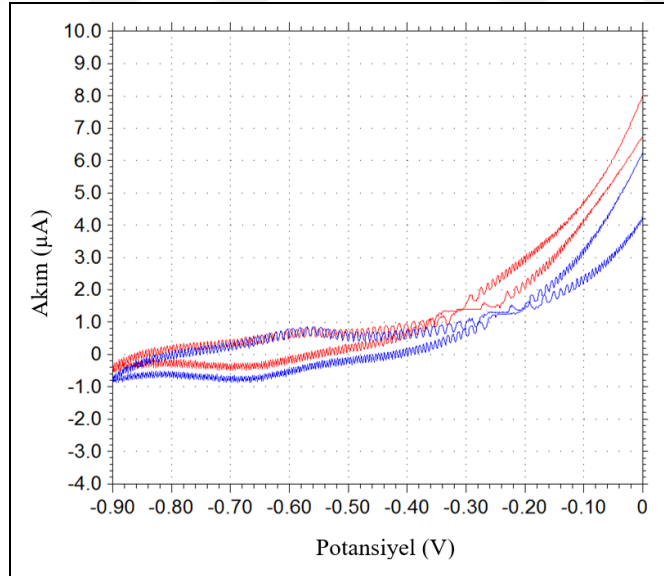


Şekil 6.16: Altın elektrotun; a) kaplama öncesi b) kaplama sonrası görüntüsü.



Şekil 6.17: Altın elektrotun kaplamasına ait CV.

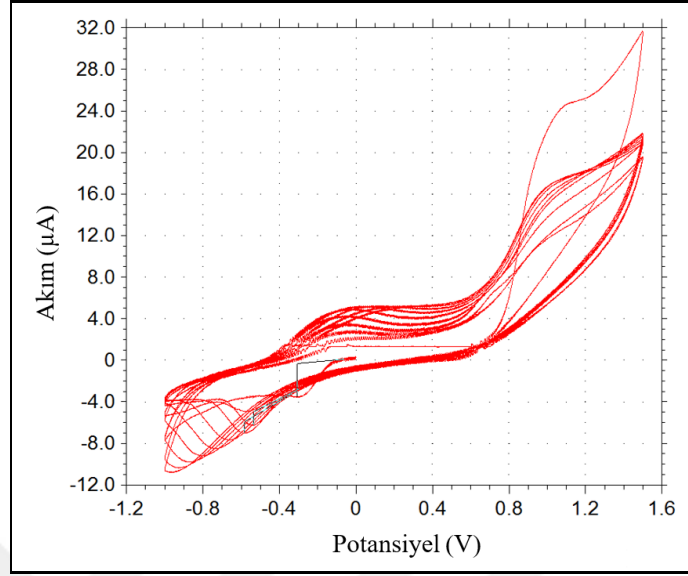
Kaplama işlemi tamamlandıktan sonra 3'lü elektrot sisteminde ölçümler gerçekleştirilmiştir. Toplam 16 mL hacimde TE içerisinde sırasıyla; 16 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 3 mM MV ve 2 mM nitrit eklenerek yapılmıştır. Şekil 6.18'da kaplanan elektrodun nitritli ve nitritsiz ortamlarda alınan CV örnekleri görülmektedir.



Şekil 6.18: NO_2 'siz(kırmızı), 2mM NO_2 ilaveli (mavi) (scan rate: 10mV/s).

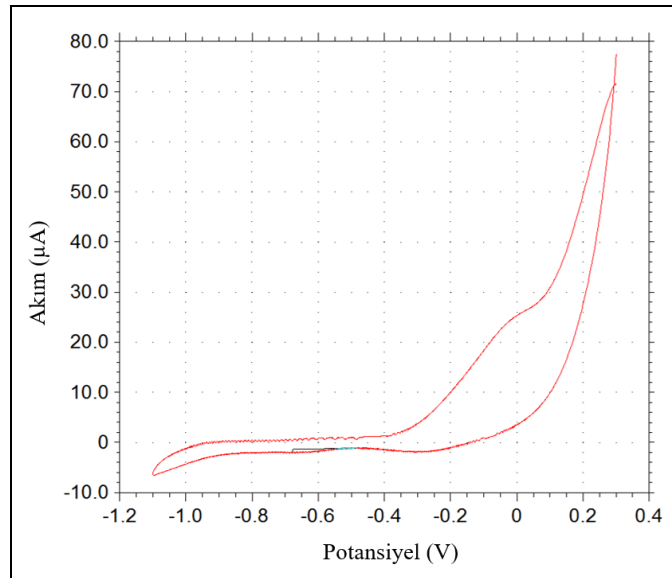
Diğer bir elektrot; 50 mV/s tarama hızında, (-1)-(+1.5) V aralığında voltaj ile 10 döngü halinde CV yöntemi ile kaplanmıştır. Altın elektrotun PGA ve pirol ile kaplanmasına ait CV şekil 6.19'de gösterilmiştir. Kaplama işleminden sonra çalışma

elektrotu %25'lik gluteraldehit içerisinde 3 saat bekletilmiştir. Sonrasında üzerine 20 μL enzim damlatılmıştır ve bir gece bekletilmiştir.

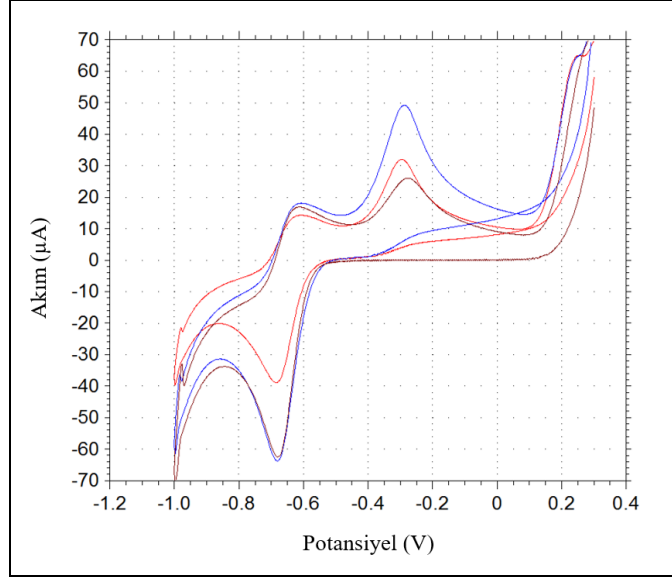


Şekil 6.19: Altın elektrotun PGA ve pirol ile kaplanmasına ait CV.

10 döngü halinde kaplanan elektrot ile ölçümler alınmıştır. Ölçümler; 3'lü elektrot sisteminde ve toplam 16 mL hacimde 0.05M PBS içerisine sırasıyla; 16 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 3 mM MV ve 1 mM NO_2 eklenerek yapılmıştır. Nitrit ilave edilmeden önceki CV şekil 6.20 ve nitrit ilavesinden sonra zamana bağlı olarak alınan CV örnekleri şekil 6.21'de verildiği gibidir.

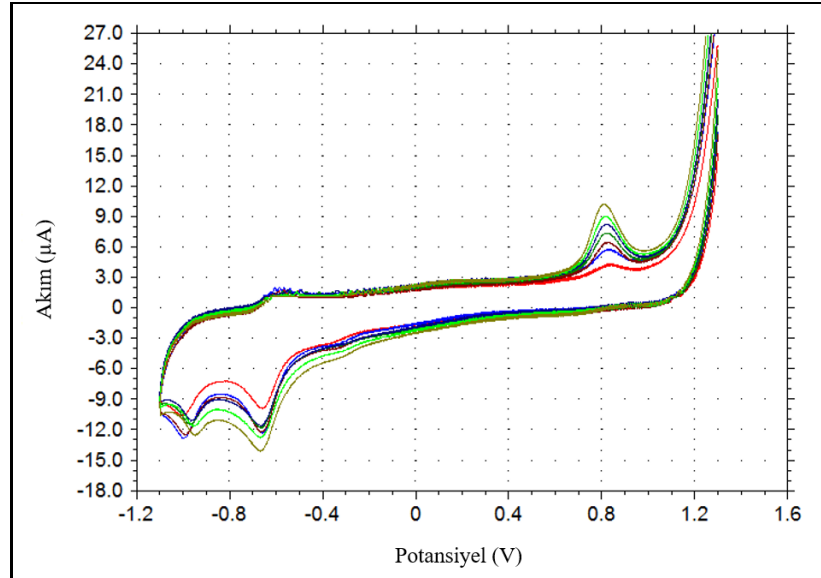


Şekil 6.20: Nitrit ilave edilmeden önce CV (scan rate = 10mV/s).



Şekil 6.21: 1 mM NO_2 eklendikten 15 dk sonra(kırmızı), 30 dk sonra(mavi), 1 saat sonra (kahverengi) CV görüntüleri (scan rate = 10mV/s).

Altın elektrodun farklı nitrit konsantrasyonları altında alınan CV görüntüleri şekil 6.22’te verilmiştir. Şekilde görüldüğü üzere nitrit konsantrasyonu arttıkça biyosensörden alınan sinyalde artmıştır. En yüksek sinyal 3.5mM nitrit varlığında $10\mu\text{A}$ olarak ölçülmüştür.



Şekil 6.22: Artan nitrit konsantrasyonları (Kırmızı: 0.5mM → Yeşil: 3.5mM).

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Nitrit; yaygın bir kullanım alanı olan, insan ve çevre sağlığı için risk oluşturan toksik bir bileşiktir. Bu nedenle içme suyu ve gıda maddelerinde miktarı sınırlandırılmıştır ve tespiti önem arz etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü içme suyunda nitriti bir litre için maksimum 3 mg olacak şekilde, Çevre Koruma Ajansı ise içme suyundaki sınır değeri 1 mg/L şeklinde belirlemiştir [66], [67]. Nitrit laboratuvar ortamında farklı analitik yöntemler ile ölçülebilmektedir ancak bu yöntemler karmaşık ölçüm prosedürlerine sahip olmaları, hassiyet ve seçiciliklerinin düşük olması ve ölçüm sürelerinin uzun olması gibi bazı yetersizliklere sahip olabilmektedirler [68]. Bu nedenle yeni ölçüm metodları geliştirilmeye çalışılmaktadır. Biyosensör teknolojisi, çeşitli alanlardaki gelişmeler doğrultusunda çok hızlı bir şekilde ilerlemektedir. Son yıllarda özellikle çevresel izleme teknikleri içerisinde sıkça tercih edilmektedir. Biyosensörler, diğer tayin yöntemlerinin eksikliklerini tamamlamakta aynı zamanda yüksek spesifik ve hassasiyet ile sonuçlar vermeleri, ölçüm alma süresinin çok kısa olması, tekrar kullanılabilirlikleri, nispeten uygun maliyeti ve kolay kullanımı biyosensörlerin tercih sebeplerini oluşturmakta aynı zamanda onları gelecek vaat eden sistemler haline getirmektedir. Biyosensörler enzimler, hücreler, mikroorganizmalar, kimyasal reseptörler ve immunolojik ajanlar gibi biyolojik sistemlerin fiziksel ölçüm cihazları ile bir araya getirilmesi sonucu ortaya çıkmışlardır. Biyosensörlerin ölçüm kapasitesi, güvenilirliği ve özellikleri çalışma elektrodu materyaline, ölçüm sistemine ve biyoajanın özelliklerine bağlıdır. Biyosensörün güvenilirliğini belirleyen en önemli parametreler tespit limiti, seçiciliği ve hassasiyetidir. Bu parametrelerin iyileştirilmesinde ölçüm için kullanılan fiziksel ekipmanların yanı sıra ölçümün dayandığı reaksiyonda görev alan biyolojik ajanlar da önemli rol oynar. Bu nedenle biyosensör üretiminde kullanılabilecek etkili bir biyoajanın keşfi büyük önem arz etmektedir. Nitrite spesifik olmayan proteinlerle geliştirilen biyosensörlerin seçicilik problemi olmasından dolayı gerçek sistemlerde doğru sonuçlar vermeme riski bulunmaktadır. Bu nedenle enzimler gibi analite spesifik biyoajanların kullanımı ön plana çıkmaktadır. Enzimler kimyasal dönüşümlerin modelini belirleyen moleküllerdir ve biyolojik sistemlerin katalizörleridir. Enzimler, biyosensörlerde en yaygın kullanılan biyoajanlardır. Tez kapsamında biyosensörde biyoajan olarak kullanılacak olan nitrit redüktaz enzimi *E. coli*'den ilk kez bu tez kapsamında

klonlanıp üretilmiş ve aktivitesi belirlenmiştir. Literatürde enzimi kodlayan genin herhangi bir vektöre klonlanarak saflaştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. NirB enzimi ile yapılan eski çalışmalarda bu enzim, hücrelerden saflaştırılarak kullanılmıştır. *E. coli* farklı nitrit redüktaz enzimlerine sahiptir. Tez kapsamında üretilecek olan nitrit redüktaz enzimi NADH bağımlı bir enzimdir. nirB geni tarafından kodlanan söz konusu nitrit redüktaz enzimi ayrıca nirD geni tarafından kodlanan bir alt ünite ile bir arada çalışmaktadır [69]. NirBD ökaryot, bakteri ve Arkea'larda bulunan ve yüklü substratının hücre zarından geçerek hücreye taşınımından sorumlu bir transport sistemine bağımlı bir enzimdir. Bu taşıma işlemi FNT ailesinin bir üyesi olan NirC proteini tarafından gerçekleştirilir [70].

E. coli'de ve bazı denitrifikasyon bakterilerinde yapılan araştırmalarla nitritin indirgenmesinde görevli operon bir miktar aydınlatılmıştır. Nitrit redüktaz enzimi aktif olabilmek için çeşitli altünitelerinin aktivitesine ihtiyaç duymaktadır. *E. coli*'de NADH bağımlı nitrit indirgeme aktivitesi NirB ve NirD ürünlerinin varlığında gerçekleşir. *E. coli* farklı koşullarda iki farklı nitrit redüktaza sahiptir. Bunlardan NADH bağımlı nitrit redüktaz sitoplazmada bulunur, Nrf ise periplazmada yer alır [71]. Ortamdaki nitrat konsantrasyonu enzimlere ait genlerin ifadelerini yani enzimlerin üretimlerini etkiler. Düşük nitrat ortamında beş adet demir içeren (pentaheme) NrfA nitrit redüktaz üretilir. Yüksek nitrat ortamında ise sadece NADH'ya bağımlı nitrit redüktaz (NirB) üretilir. Orta düzey nitrat varlığında ikisi birden üretilir. Her iki enzimin üretimini nitrit de tetikler ancak nitrat kadar etkili değildir. NirB tarafından kodlanan NADH bağımlı nitrit redüktaz sitoplazmada bulunur ve bir proton gradienti oluşturmaz. NirB'nin metabolik rolünün nitriti detoksifiye etmek olduğu düşünülmektedir. NirB altı elektron indirgenmesi ile nitritin amonyağa dönüşümünü katalizler. Nitrit redüktazın ek grubu olarak FAD, demir sülfür yığını ve siroheme gruplarını içerir [72], [73].

Bu tez çalışması kapsamında ilk olarak nirB geni *E.coli* K12 hücresinden izole edilen genomik DNA kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır, PCR ürünleri jelden ayrılarak pGEM-T ara klonlama vektörüne klonlanmıştır. nirB geni, pET28a vektörüne klonlanması amacıyla pGEMT vektöründen *NheI* ve *XhoI* enzimleri ile kesilmiştir. pGEMT vektöründen kesilen nirB geni aynı enzimlerle kesilip lineer hale getirilmiş pET28 vektörü ile birleştirilmiştir. pET28 çift enzimle kesilmesi sonucu elde edilen lineer pET28 ve nirB geni jelden saflaştırılmış ve ligasyona tabi tutulmuştur. Transformasyon *E. Coli* TOP10 hücresinde gerçekleştirilmiştir, daha sonra protein üretimi

için *E. Coli* BL21 kompetan hücrelerine alınmıştır. Gen ifadesi için BL21 hücrelerine aktarılan nirB genini taşıyan rekombinant vektör (pET28nB) proteinleri ekstrakt edilmiş ve NirB sitoplazma proteini olduğu için direk olarak hücre lizatından His-tag afinite kolonu ile saflaştırılabilmektedir. Saflaştırılan protein ile MV ve Na₂S₂O₄ varlığında nitrit giderimi üzerinden Griess metodu ile aktivite ölçümleri yapılmıştır. Enzimin en yüksek aktivite ile çalıştığı durumlar ve saklama koşulları belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre enzim pH 7.5 ve 37°C’de 5 dakikalık reaksiyon süresi ile en yüksek aktiviteyi göstermekte ve 4°C’de, saflaştırıldığı gün tetramere dönüşmesine izin vermeden βME eklenip saklandığında aktivitesini daha uzun süre koruduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda enzim 25 mM kadmiyum varlığında saklandığında, Cd⁺² iyonunun enzimi koruyarak aktivite kaybını engellediği görülmüştür. Sodyum nitrat ve sodyum format gibi iyonların artan konsantrasyonları ise enzimin aktivitesini düşürmektedir.

E. coli K12 NirB enzimi daha önce Jackson ve arkadaşları (1981) tarafından yapılan bir çalışmada kısmi olarak saflaştırılmış ve karakterizasyonu belirlenmiştir. Çalışmada NADH bağımlı nitrit redüktazın demir ve sülfür içerikli yapılar (FeS) taşıdığından bahsedilmiştir. Bu çalışmada ve diğer nitrit redüktaz aktivite ölçümlerine ilişkin çalışmalarda, enzim aktivitesi ölçümlerinde NADH veya MV gibi elektron alıcıları kullanılmıştır. Ancak enzimin FeS yapısı içermesinden dolayı herhangi bir elektron alıcısı olmadan da çalışma potansiyeli olduğu tespit edilmiştir [73].

Optimum koşullar altında elde edilen nitrit redüktaz enzimi, PGA ve pirol üzerine çapraz bağlanarak altın elektrot üzerine immobilize edilmiş ve amperometrik bir nitrit biyosensörü hazırlanmıştır. Amperometrik biyosensörler, konsantrasyona bağımlı akımı biyolojik olarak aktif materyalle kaplı elektrokimyasal elektrot aracılığıyla ölçerler. Tez kapsamında oluşturulan amperometrik biyosensörde üçlü elektrot sistemi kullanılmıştır. Bu üçlü elektrot sistemi; üzerine enzim immobilize edilen altın çalışma elektrodu, platin karşıt elektrot ve Ag/AgCl bir referans elektrottan oluşmaktadır. Farklı nitrit konsantrasyonlarında alınan ölçümlerde en yüksek sinyal 3.5mM nitrit varlığında 10μA olarak ölçülmüştür. Biyosensör optimizasyon çalışmaları Türedi (2023) tezi kapsamında yapılan deneyler ile belirlenmiştir [74].

KAYNAKLAR

- [1] Wang Q., Yu L., Liu Y., Lin L., Lu R., Zhu J., He L., Lu Z.L., (2017), “Methods for the detection and determination of nitrite and nitrate: A review”, *Talanta*, 165, 709-720.
- [2] Gahlaut A., Hooda V., Gothwal A., (2019), “Enzyme-Based Ultrasensitive Electrochemical Biosensors for Rapid Assessment of Nitrite Toxicity: Recent Advances and Perspectives”, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 49 (1), 32-43.
- [3] Lin Z., Cheng S., Li H., Li L., (2022), “A novel, rapidly preparable and easily maintainable biocathode electrochemical biosensor for the continuous and stable detection of nitrite in water”, *Science of The Total Environment*, 806 (4), 150945.
- [4] Jo K., Lee S., Yong H., Cho Y., Jung S., (2020), “Nitrite sources for cured meat products”, *LWT*, 129, 109583.
- [5] Shi J., Xia C., Tian Q., Zeng X., Wu Z., Guo Y., Pan D., (2022), “Untargeted metabolomics based on LC–MS to elucidate the mechanism underlying nitrite degradation by *Limosilactobacillus fermentum* RC4”, *LWT*, 163, 113414.
- [6] Turp G. Y., Sucu Ç., (2016), “Et Ürünlerinde Nitrat ve Nitrit Kullanımına Potansiyel Alternatif Yöntemler”, *Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 12 (2), 231-242.
- [7] Vishnuvardhan V., Kala R., Rao T.P., (2008), “Chemical switch based reusable dual optoelectronic sensor for nitrite”, *Analytica Chimica Acta*, 623, 53-58.
- [8] Zhang X., Wang Y., Guo Y., Xie X., Yu Y., Zhang B., (2022), “Recent advances in electrocatalytic nitrite reduction”, *ChemCommun*, 58, 2777–2787.
- [9] Molayemraftar T., Peyghan R., Jalali M. R., Shahriari A., (2022), “Single and combined effects of ammonia and nitrite on common carp, *Cyprinus carpio*: Toxicity, hematological parameters, antioxidant defenses, acetylcholinesterase, and acid phosphatase activities”, *Aquaculture*, 548 (2), 737676.
- [10] Cheng C. H., Su Y. L., Ma H. L., Deng Y. Q., Feng J., Chen X. L., Jie Y.K., Guo Z.X., (2020), “Effect of nitrite exposure on oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mud crab (*Scylla paramamosain*)”, *Chemosphere*, 239, 124668.
- [11] Li Y., Xiong D., Yuan L., Fan P., Xiao Y., Chen J., Feng W., (2022), “Transcriptome and protein networks to elucidate the mechanism underlying nitrite degradation by *Lactiplantibacillus plantarum*”, *Food Research International*, 156, 111319.

- [12] Özdeştan Ö., Üren A., (2010), “Gıdalarda Nitrat ve Nitrit”, Akademik Gıda, 8 (6), 35-43.
- [13] Deng S., Shi S., Xia X., (2022), “Effect of plant polyphenols on the physicochemical properties, residual nitrites, and N-nitrosamine formation in dry-fried bacon”, Meat Science, 191, 108872.
- [14] Canlıca M., (1994), “Çeşitli Besin Maddelerindeki Nitrat ve Nitrit İyonlarının Spektrofotometrik Yöntem ile İndirekt Tayini”, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi.
- [15] Elhani Q., Karrat A., Digua K., Amine A., (2022), “Development of a simplified spectrophotometric method for nitrite determination in water samples”, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 267 (2), 120574.
- [16] Moorcroft M. J., Davis J., Compton R. G., (2001), “Detection and determination of nitrate and nitrite: a review”, Talanta, 54 (5), 785-803.
- [17] 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.
- [18] Sepahvand M., Ghasemi F., Hosseini H. M. S., (2021), “Plasmonic nanoparticles for colorimetric detection of nitrite and nitrate”, Food and Chemical Toxicology, 149, 112025.
- [19] Gill A., Zajda J., Meyerhoff M. E., (2019), “Comparison of electrochemical nitric oxide detection methods with chemiluminescence for measuring nitrite concentration in food samples”, Analytica Chimica Acta, 1077, 167-173.
- [20] Abdolmohammad-Zadeh H., Rahimpour E., (2015), “Utilizing of Ag@AgCl@graphene oxide@Fe₃O₄ nanocomposite as a magnetic plasmonic nanophotocatalyst in light-initiated H₂O₂ generation and chemiluminescence detection of nitrite”, Talanta, 144, 769-777.
- [21] Kodamatani H., Yamazaki S., Saito K., Tomiyasu T., Komatsu Y., (2009), “Selective determination method for measurement of nitrite and nitrate in water samples using high-performance liquid chromatography with post-column photochemical reaction and chemiluminescence detection”, Journal of Chromatography A, 1216 (15), 3163-3167.
- [22] Hao N., Wang K., (2016), “Recent development of electrochemiluminescence sensors for food analysis”, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 408, 7035–7048.
- [23] Zanut A., Fiorani A., Rebecani S., Kesarkar S., Valenti G., (2019), “Electrochemiluminescence as emerging microscopy techniques”, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 411, 4375–4382.

- [24] Li Y., Zhou H., Zhang J., Cui B., Fang Y., (2022), “Determination of nitrite in food based on its sensitizing effect on cathodic electrochemiluminescence of conductive PTH-DPP films”, *Food Chemistry*, 397, 133760.
- [25] Fernández-Argüelles M. T., Cañabate B., Costa-Fernández J. M., Pereiro R., Sanz-Medel A., (2004), “Flow injection determination of nitrite by fluorescence quenching”, *Talanta*, 62, 991–995.
- [26] Balıkçı Y., (2019), “Türkiye’de Yetişen Aynısefa Bitkisinin Kuersetin ve Rutin İçeriğinin Kromatografik ve Spektrofotometrik Yöntemler ile Tayini”, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi.
- [27] Mariyappan V., Chen S.M., Murugan K., Jeevika A., Jeyapragasam T., Ramachandran R., (2022), “Electrochemical sensor based on cobalt ruthenium sulfide nanoparticles embedded on boron nitrogen co-doped reduced graphene oxide for the determination of nitrite”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 637, 128271.
- [28] Özöner Ş., (2010), “Horseradish Peroxidase Enzimi Kullanılarak Amperometrik Fenol Biyosensörlerinin Geliştirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü.
- [29] Kurucuoğlu G., Algur Ö. F., (2011), “Denitrifikasyon ve Mikroorganizmalar”, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 4 (2), 11-15.
- [30] Mishra S., Singh V., Cheng L., Hussain A., Ormeci B., (2022), “Nitrogen removal from wastewater: A comprehensive review of biological nitrogen removal processes, critical operation parameters and bioreactor design”, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10 (3), 107387.
- [31] Liu E., Fan C., Zhao M., Jiang S., Wang Z., Jin Z., Bei K., Zheng X., Wu S., Zeng Q., (2022), “Effects of heavy metals on denitrification processes in water treatment: A review”, *Separation and Purification Technology*, 299, 121793.
- [32] Maier R. M, Pepper I. L., Gerba C. P., (2002), “Environmental Microbiology”, 2nd Edition, Academic Press.
- [33] Web 1, (2017), <https://cleanroomnews.org/biyosensorler?page=4>, (Erişim Tarihi: 05/01/2022).
- [34] Boz B., Paylan İ.C., Kızmaz M. Z., Erkan S.E., (2017), “Biyosensörler ve Tarım Alanında Kullanımı”, *Tarım Makinaları Bilimi Dergisi*, 13 (3), 141-148.
- [35] Özer İ., Tezer H., Sanajou S., Yirün A., Baydar T., Erkekoğlu P., (2022), “Biyosensörler ve Kullanım Alanları: Geleneksel Derleme”, *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi*, 11 (1), 35-48.
- [36] Keskin M., Arslan F., (2020), “Biyosensörler”, *Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi*, 1, 51-60.

- [37] Kökbaş U., Kayrın L., Tuli A., (2013), “Biosensors and their Medical Applications”, *Archives Medical Review Journal*, 22 (4), 499-513.
- [38] Dai Z., Liu S., Ju H., Chen H., (2004), “Direct Electron Transfer and Enzymatic Activity of Hemoglobin in a Hexagonal Mesoporous Silica Matrix”, *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 861–867.
- [39] 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.
- [40] Madasamy T., Pandiaraj M., Balamurugan M., Bhargava K., Sethy N. K., Karunakaran C., (2014), “Copper Zinc Superoxide Dismutase and Nitrate Reductase Coimmobilized Biezymatic Biosensor for the Simultaneous Determination of Nitrite and Nitrate”, *Biosensors and Bioelectronics*, 52, 209–215.
- [41] Zazoua A., Hnaïen M., Cosnier S., Jaffrezic-Renault N., Kherrat R., (2009), “A New HRP/Catalase Biosensor Based on Microconductometric Transduction for Nitrite Determination”, *Materials Science and Engineering: C*, 29, 1919–1922.
- [42] 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, 267–275.
- [43] 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, 2240–2245.
- [44] 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 cd1nitrite Reductase and its Redox Partner Cytochrome c552 to Improve the Selectivity of Nitrite Biosensing”, *Analytica Chimica Acta*, 693, 41–46.
- [45] Zhang Z., Xia S., Leonard D., Jaffrezic-Renault N., Zhang J., Bessueille F., Goepfert Y., Wang X., Chen L., Zhu Z., (2009), “A Novel Nitrite Biosensor Based on Conductometric Electrode Modified with Cytochrome c Nitrite Reductase Composite Membrane”, *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 1574–1579.
- [46] Sousa E. H. S., Carepo M. S. P., Moura J. J. G., (2020), “Nitrate-nitrite fate and oxygen sensing in dormant Mycobacterium tuberculosis: A bioinorganic approach highlighting the importance of transition metals”, *Coordination Chemistry Reviews*, 423, 213476.

- [47] Sun S., Hou Y. N., Wei W., Sharif H. M. A., Huang C., Ni B. J., Li H., Song Y., Lu C., Han Y., Guo J., (2022), “Perturbation of clopyralid on bio-denitrification and nitrite accumulation: Long-term performance and biological mechanism”, *Environmental Science and Ecotechnology*, 9, 100144.
- [48] Besson S., Almeida M. G., Silveira C. M., (2022), “Nitrite reduction in bacteria: A comprehensive view of nitrite reductases”, *Coordination Chemistry Reviews*, 464, 214560.
- [49] Song Q., Wang B., Zhao F., Han Y., Zhou Z., (2020), “Expression, characterization and molecular docking of the assimilatory NaDH-nitrite reductase from *Acidovorax wautersii* QZ-4”, *Biochemical Engineering Journal*, 159, 107589.
- [50] Pandey C. B., Kumar U., Kaviraj M., Minick K. J., Mishra A.K., Singh J. S., (2020), “DNRA: A short-circuit in biological N-cycling to conserve nitrogen in terrestrial ecosystems”, *Science of The Total Environment*, 738, 139710.
- [51] Macdonald H., Pope N. R., Cole J. A., (1985), “Isolation, Characterization and Complementation Analysis of nir B Mutants of *Escherichia coli* Deficient Only in NADH-dependent Nitrite Reductase Activity”, *Microbiology*, 131 (10), 2771-2782.
- [52] Wang X., Tamiev D., Alagurajan J., DiSpirito A. A., Phillips G. J., Hargrove M. S., (2019), “The role of the NADH-dependent nitrite reductase, Nir, from *Escherichia coli* in fermentative ammonification”, *Archives of Microbiology*, 201, 519–530.
- [53] Wang H., Gunsalus R. P., (2000), “The *nrfA* and *nirB* Nitrite Reductase Operons in *Escherichia coli* Are Expressed Differently in Response to Nitrate than to Nitrite”, *Journal of Bacteriology*, 182 (20), 5813–5822.
- [54] Khlebodarova T. M., Ree N. A., Likhoshvai V. A., (2016), “On the control mechanisms of the nitrite level in *Escherichia coli* cells: the mathematical model”, *BioMed Central Microbiology*, 16, 15-30.
- [55] Yılmaz H., İbici H. N., Türedi Z., Erdoğan E. M., Kus P., Özkan M., (2022), “Nitrite is reduced by Nitrite Reductase NirB without small subunit NirD in *Escherichia coli*”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 134 (5), 393-398.
- [56] Keskin M., Arslan F., (2020), “Biyosensörler”, *Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi*, 1, 51-60.
- [57] Özoğlu Ö., (2019), “Enzim Temelli Amperometrik Laktat Biyosensörü Üretimi ve Tayin Sınırının Belirlenmesi”, *Yüksek Lisans Tezi*, Bursa Uludağ Üniversitesi.
- [58] Sharma A., Thatai K. S., Kuthiala T., Singh G., Arya S. K., (2021), “Employment of polysaccharides in enzyme immobilization”, *Reactive and Functional Polymers*, 167, 105005.

- [59] Nemiwal M., Zhang T. C., Kumar D., (2022), “Enzyme immobilized nanomaterials as electrochemical biosensors for detection of biomolecules”, *Enzyme and Microbial Technology*, 156, 110006.
- [60] Sassolas A., Blum L. J., Leca-Bouvier B. D., (2012), “Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors”, *Biotechnology Advances*, 30 (3), 489-511.
- [61] Çınar M., (2006), “Pt Biriktirilmiş Polivinil Ferrosen Modifiye Pt Elektrodunu Temel Alan Yeni Bir Kolin Biyosensörünün Geliştirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi.
- [62] Web 3, (2022), https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=basic_cloning_vectors&plasmid=pGEM-T, (Erişim Tarihi: 02/09/2022).
- [63] Web 2, (2022), [https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pet_and_duet_vectors_\(novagen\)&plasmid=pET-28a\(%2B\)](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pet_and_duet_vectors_(novagen)&plasmid=pET-28a(%2B)), (Erişim Tarihi: 02/09/2022).
- [64] Coleman K. J., Cornish-Bowden A., Cole J. A., (1978), “Purification and properties of nitrite reductase from *Escherichia coli* K12”, *Biochemical Journal*, 175 (2), 483–493.
- [65] Martinez-Espinosa R. M., Marhuenda-Egea F. C., Bonete M. J., (2001), “Purification and characterisation of a possible assimilatory nitrite reductase from the halophile archaeon *Haloferax mediterranei*”, *FEMS Microbiology Letters*, 196 (2), 113–118.
- [66] WHO, (2017), *Guidelines for Drinking-water Quality*, World Health Organization.
- [67] EPA, (2022), *National Primary Drinking Water Regulations, Chemical Contaminant Rules*, United States Environmental Protection Agency.
- [68] Lei H., Zhu H., Sun S., Zhu Z., Hao J., Lu S., Cai Y., Zhang M., Du M., (2021), “Synergistic integration of Au nanoparticles, Co-MOF and MWCNT as biosensors for sensitive detection of low-concentration nitrite”, *Electrochimica Acta*, 365, 137375.
- [69] Harborne N. R., Griffiths L., Busby S. J., Cole J. A., (1992), “Transcriptional control, translation and function of the products of the five open reading frames of the *Escherichia coli* nir operon”, *Molecular Microbiology*, 6 (19), 2805-2813.
- [70] Peakman T., Crouzet J., Mayaux J. F., Busby S., Mohan S., Harborne N., Cole J. A., (1990), “Nucleotide Sequence, Organisation and Structural Analysis of the Products of genes in the nirB–cysG region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome”, *European Journal of Biochemistry*, 191 (2), 315–323.

- [71] Jia W, Cole J. A., (2005), “Nitrate and nitrite transport in *Escherichia coli*”, *Biochemical Society Transactions*, 33 (1), 159-161.
- [72] Macdonald H., Cole J. A., (1985), “Molecular cloning and functional analysis of the *cysG* and *nirB* genes of *Escherichia coli* K12, two closely-linked genes required for NADH-dependent nitrite reductase activity”, *MGG Molecular & General Genetics*, 200 (2), 328–334.
- [73] 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.
- [74] Türedi Z., (2023), “Amperometrik Nitrit Biyosensörünün Geliştirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.



ÖZGEÇMİŞ

Hilal Nisanur İBİCİ, eğitim hayatına İstanbul'da başladı ve akabinde 2016 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Bölümüne başlayıp, 2020 yılında lisans eğitimini başarıyla tamamlamıştır. Aynı yıl Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü İş Sağlığı ve Güvenliği Anabilim Dalında tezsiz yüksek lisans programına başlamış, 2021 yılında eğitimini tamamlamış ve B sınıfı İş Güvenliği Uzmanı sertifikasını almıştır. 2020 yılında yüksek lisans eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında başlamıştır. Yüksek lisans eğitimi süresince TÜBİTAK'ın desteklediği bir projede tam zamanlı bursiyer olarak görev yapmıştır.

