

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NİTRİT VE NİTRAT TAYİNİNE YÖNELİK POLİMER MEMBRAN
TEMELLİ TEK ELEKTROTLU BİYOSENSÖR SİSTEMİNİN
HAZIRLANMASI VE UYGULAMALARI

ALİ ERDOĞAN

DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

MALATYA
EKİM 2014

Tezin Başlığı: “Nitrit ve Nitrat Tayinine Yönelik Polimer Membran Temelli Tek Elektrotlu Biyosensör Sisteminin Hazırlanması ve Uygulamaları”

Tezi Hazırlayan: **Ali ERDOĞAN**

Sınav Tarihi: 28.10.2014

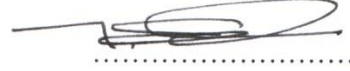
Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Kimya Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri

Prof. Dr. Fikret KARATAŞ
Fırat Üniversitesi

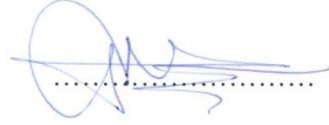


Prof. Dr. Turgay SEÇKİN
İnönü Üniversitesi



Tez Danışmanı:

Prof.Dr. İsmet YILMAZ
İnönü Üniversitesi



Doç. Dr. Burhan ATEŞ
İnönü Üniversitesi



Doç. Dr. Süleyman KÖYTEPE
İnönü Üniversitesi



Prof. Dr. Mehmet ALPASLAN
Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Doktora Tezi olarak sunduğum “**Nitrit ve Nitrat Tayinine Yönelik Polimer Membran Temelli Tek Elektrotlu Biyosensör Sisteminin Hazırlanması ve Uygulamaları**” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Ali ERDOĞAN

ÖZET

Doktora Tezi

NİTRİT VE NİTRAT TAYİNİNE YÖNELİK POLİMER MEMBRAN TEMELLİ TEK ELEKTROTLU BİYOSENSÖR SİSTEMİNİN HAZIRLANMASI VE UYGULAMALARI

Ali ERDOĞAN

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

232 + xxii sayfa

2014

Danışman: Prof.Dr. İsmet YILMAZ

İnsan sağlığı üzerine, olumsuz etkilerinden dolayı nitrit ve nitrat, belirli dozların üzerinde gıdalarda bulunması istenmeyen maddelerdir. Bu maddelerin toksik olmalarının nedeni methemoglobinemi'e yol açmaları ve insan vücudunda bulunan sekonder aminlerle tepkimeye girerek kanserojen olan nitrozaminleri oluşturmalarıdır. Başta *clostridium botulinum* cinsine ait patojen bakteriler olmak üzere diğer bazı patojenlerin gelişimini engellemek ve ürüne özgü kür lezzetini oluşturmak üzere nitrit ve nitrat et ürünlerine yasaların izin verdiği oranda katılmaktadır. Sulardaki nitrit ve nitrat ise su kalitesinin indikatörleridir. Gıdalardaki nitrat ve nitrit seviyesinin artması halk sağlığı açısından önemli bir problem oluşturmaktadır. Bu nedenle bu bileşiklerin gıdalardaki derişimlerinin izlenmesi gerekmektedir.

Bu tez kapsamında, farklı karbonhidratları içeren poliüretan polimerler kullanılarak, nitrat redüktaz enzimi immobilizasyonu ile hazırlanan biyosensörlerle nitrit ve nitrat tayini gerçekleştirilmiştir. Platin elektrot yüzeyine hazırlanan bu biyosensörler ile nitritin +0,87 V'da Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) tekniği ile izlenmesi temel alınmıştır. Enzim temelli biyosensörlerin optimizasyon çalışmaları doğrultusunda nitrat tayini için yanıt süresi 2 dakika, enzim miktarı 0,5 U, koenzim miktarı (NADPH) 0,25 mM ve optimum sıcaklık 25 °C olarak belirlenmiştir. Ayrıca en iyi biyosensör yanıtları 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu ile alınmıştır. Nitrit için en geniş doğrusal tayin aralığı, PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle ve 0,25 mM - 125 mM derişim aralığında elde edilmiştir. Nitrat için en geniş doğrusal tayin aralığı beş biyosensörde de 1 mM - 10 mM olarak bulunmuştur. Optimizasyon çalışmalarından sonra biyosensörlerin karakterizasyonuna geçilmiş ve bu amaç doğrultusunda tekrarlanabilirlik, girişim etkileri, operasyonel kararlılık ve depo kararlılığı incelenmiştir. Ayrıca bu biyosensörler ile optimize edilen koşullarda salam, sosis, sucuk ve atık su örneklerinde nitrit ve nitrat miktar tayini yapılmış ve gerçek değerlerle karşılaştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyosensör, Enzim temelli biyosensör, Nitrit, Nitrat, Nitrat redüktaz, Poliüretan

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

PREPARATION OF POLYMER MEMBRANE BASED SINGLE ELECTRODE BIOSENSOR SYSTEM AND APPLICATION FOR DETERMINATION OF NITRITE AND NITRATE

Ali ERDOGAN

Inonu University
Graduate School of Natural
and Applied Sciences
Department of Chemistry

xxii +232 pages

2014

Supervisor: Prof.Dr. Ismet YILMAZ

Nitrates and nitrites are undesired food additives because of their adverse effects on human health. Toxicity of these food additives arises from the formation of carcinogenic nitrosamines between nitrite and secondary amines present in human body. Furthermore, consumption of nitrates and nitrites in foods may cause methaemoglobinaemia. Nitrites and nitrates are added to meat products to inhibit the growth of *Clostridium botulinum* and to enhance unique flavor of cured meat products. However, food laws strictly restrict the amount of nitrite and nitrate added to foods. Nitrite and nitrate concentrations in water supplies are good indicators for water quality. Increase in the nitrate and nitrite concentrations of foods causes a significant concern for public health. Therefore, nitrate and nitrite contents of foods must be monitored periodically.

In this thesis, which prepared by immobilization of nitrate reductase enzyme with polyurethane polymers they contains different carbohydrates have been developed for determination nitrite and nitrate with a single electrode. Nitrite was monitored at +0,87 V Differential Pulse Voltammetry (DPV) technique with these biosensors prepared on platinum electrode surface. In line with the studies on optimization of enzyme based biosensors for nitrate determination the response time 2 minutes, enzyme amount 0,5 U, coenzyme amount (NADPH) 0,25 mM and optimum temperature were determined as 25 °C. Additionally, the best biosensor responses were obtained with 100 mM, pH 7,5 phosphate buffer. The largest linear range for nitrite was attained with the biosensor prepared with PU-Maltoz-%1 polymer at 0,25 mM - 125 mM concentration interval. The largest linear range for nitrate was found as 1 mM - 10 mM in five biosensors. After the optimization studies, the characterization studies of the biosensors were done. For this purpose, repeatability, interference effect, operational stability and storage stability were examined. In addition, on the optimized conditions with these biosensors, amounts of nitrite and nitrate were determined on salami, sausage, and waste water samples.

Key Words: Biosensor, Enzyme-based biosensor, Nitrite, Nitrate, Nitrate reductase, Polyurethane

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince her konuda destek ve ilgisini benden esirgemeyen danışman hocam Prof.Dr. İsmet YILMAZ başta olmak üzere;

Çalışmam süresince bilgi ve yardımlarından faydalandığım Doç.Dr. Burhan ATEŞ ve Doç.Dr. Süleyman KÖYTEPE'ye;

Değerli arkadaşlarım Uzman Dr. Akın MUMCU, Bülent DURMAZ ve Arş. Grv. Mert Olgun KARATAŞ'a;

Tezim süresince manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim sözlüm Mine KURT'a;

Ayrıca tüm hayatım boyunca ilgi ve sabırla beni destekleyen, bugünlere gelmemde büyük katkıları olan AİLEM'e,

Teşekkür ederim.

“ Doktoram süresince Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında beni destekleyen TÜBİTAK-BİDEB'e teşekkür ederim”

“2012-15 nolu proje kapsamında bu çalışmayı destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederim.”

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xx
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xxii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. Biyosensörler.....	3
2.2. İçerdikleri Biyolojik Tanıma Elemanına Göre Biyosensör Türleri.....	5
2.2.1. Enzim biyosensörleri.....	5
2.2.2. Doku temelli biyosensörler.....	8
2.2.3. DNA biyosensörleri.....	8
2.2.4. Mikrobiyal biyosensörler.....	9
2.2.5. İmmüno-sensörler.....	10
2.3. İçerdikleri Fiziksel Dönüştürücülere Göre Biyosensör Türleri.....	11
2.3.1. Elektrokimyasal biyosensörler.....	11
2.3.1.1. Amperometrik biyosensörler.....	11
2.3.1.2. Potansiyometrik biyosensörler.....	12
2.3.2. Optik temelli biyosensörler.....	13
2.3.3. Piezoelektrik temelli biyosensörler.....	13
2.3.4. Kalorimetri temelli biyosensörler.....	14
2.4. Biyolojik Tanıma Elemanlarının İmmobilizasyon Yöntemleri.....	14
2.4.1. Kovalent bağlama.....	15
2.4.2. Tutuklama.....	15
2.4.3. Çapraz bağlama.....	16
2.4.4. Adsorbsiyon.....	16
2.5. Biyosensörde Optimize Edilen Özellikler	17
2.5.1. Seçicilik.....	17
2.5.2. Kullanım ömrü.....	18
2.5.3. Tekrarlanabilirlik.....	18
2.5.4. Kararlılık.....	18

2.5.5.	Duyarlılık.....	18
2.5.6.	Düşük tayin sınırı	19
2.5.7.	Kısa cevap süresi.....	19
2.5.8.	Geniş ölçüm aralığı.....	19
2.5.9.	Basit ve ucuz olması.....	19
2.5.10.	Sıcaklık.....	20
2.5.11.	Biyoyumluluk.....	20
2.6.	Gıdalarda Nitrit ve Nitrat.....	20
2.7.	Çevre Örneklerinde Nitrit ve Nitrat.....	22
2.8.	Biyolojik Sıvılarda Nitrit ve Nitrat.....	23
2.9.	Nitrit ve Nitrat İyonlarının İnsan ve Hayvan Sağlığı Üzerine Etkisi.....	24
2.10.	Nitrit ve Nitratın Analiz Yöntemleri.....	26
2.11.	Nitrat Redüktaz Enzimi ve Tepkime Mekanizması.....	28
2.12.	Literatür Taraması.....	30
3.	MATERYAL VE YÖNTEM.....	38
3.1.	Materyal.....	38
3.2.	Kullanılan Cihazlar ve Sistemler.....	39
3.3.	Yöntem.....	39
3.3.1.	Polimerlerin hazırlanması.....	39
3.3.3.1.	Reaktiflerin saflaştırılması.....	39
3.3.3.2.	Polimerler için genel testler.....	40
3.3.1.3.	Poliüretanların sentezi.....	41
3.3.2.	Örneklerin hazırlanması.....	42
3.3.3.	Biyosensörlerin hazırlanması.....	42
3.3.3.1.	Platin elektrot yüzeyinin temizlenmesi.....	42
3.3.3.2.	Hazırlanan farklı polimerlerle biyosensör hazırlanması.....	43
3.3.4.	Biyosensörün ölçüm prosedürü.....	44
3.4.	Potansiyel Belirleme Çalışmaları.....	45
3.4.1.	Nitrit için yükseltgenme potansiyelinin belirlenmesi.....	45
3.4.2.	Nitrat için potansiyel taraması.....	46
3.4.3.	Koenzim (NADPH) için potansiyel taraması.....	46
3.4.4.	NADP ⁺ için potansiyel taraması.....	46
3.4.5.	Ölçüm çözeltisinde bulunan nitrat ve koenzimin nitrit yanıtına etkisi.....	47

3.5.	Çıplak Platin Elektrot ile Nitrit Tayin Aralığının Belirlenmesi.....	47
3.6.	Platin Elektrodun Çeşitli Polimerlerle Kaplanması ve Nitrit Ölçümü	47
3.7.	Farklı Polimerlerle Hazırlanan Biyosensörlerin Optimizasyon Çalışmaları	48
3.7.1.	Biyosensörlerin nitrat ölçümü için yanıt süresinin belirlenmesi	48
3.7.2.	Enzim miktarının farklı polimerlerle hazırlanan biyosensör cevaplarına etkisi	50
3.7.3.	Koenzim miktarının farklı polimerlerle hazırlanan biyosensör cevaplarına etkisi	51
3.7.4.	Biyosensörlerin optimum pH değerinin belirlenmesi	52
3.7.5.	Biyosensörlerin optimum sıcaklığının belirlenmesi	53
3.8.	Farklı Polimerler ile Hazırlanan Biyosensörlerin Karakterizasyon Çalışmaları	53
3.8.1.	Farklı polimerler ile hazırlanan biyosensörlerin nitrit tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi	54
3.8.2.	Farklı polimerler ile hazırlanan biyosensörlerin nitrat tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi	54
3.8.3.	Biyosensörlerin nitrit ve nitrat ölçümü için tekrarlanabilirliği	55
3.8.4.	Biyosensörlerin operasyonel kararlılığı	56
3.8.5.	Farklı polimerler ile hazırlanan biyosensörlerin girişim etkilerinin incelenmesi	57
3.8.6.	Biyosensörlerin depo kararlılığı	58
3.9.	Biyosensörlerle Örnek Uygulamaları	59
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI	61
4.1.	Poliüretan Yapılarının Karakterizasyonu.....	62
4.1.1.	Fruktoz temelli poliüretanların karakterizasyonu.....	62
4.1.2.	Ksiloz temelli poliüretanların karakterizasyonu.....	68
4.1.3.	Laktoz temelli poliüretanların karakterizasyonu.....	73
4.1.4.	Maltoz temelli poliüretanların karakterizasyonu.....	77
4.1.5.	Gliserol içermeyen maltoz temelli poliüretanların karakterizasyonu.....	82
4.2.	Potansiyel Belirleme Çalışmaları.....	86
4.2.1.	Nitrit için yükseltgenme potansiyelinin belirlenmesi.....	86
4.2.2.	Nitrat için potansiyel taraması.....	88
4.2.3.	Koenzim (NADPH) için potansiyel taraması.....	89
4.2.4.	NADP ⁺ için potansiyel taraması.....	90

4.2.5.	Ölçüm çözeltisinde bulunan nitrat ve koenzimin nitrit yanıtına etkisi.....	91
4.3.	Çıplak Platin Elektrot ile Nitrit Tayin Aralığının Belirlenmesi.....	92
4.4.	Platin Elektrodun Çeşitli Polimerlerle Kaplanması.....	94
4.4.1.	Platin elektrodun fruktoz temelli polimer serisiyle kaplanması.....	94
4.4.1.1.	Fruktoz temelli polimerler için elde edilen yanıtların karşılaştırılması...	97
4.4.2.	Platin elektrodun maltoz temelli polimer serisiyle kaplanması.....	99
4.4.2.1.	Maltoz temelli polimerler için elde edilen yanıtların karşılaştırılması.....	102
4.4.3.	Platin elektrodun laktoz temelli polimer serisiyle kaplanması.....	103
4.4.3.1.	Laktoz temelli polimerler için elde edilen yanıtların karşılaştırılması.....	106
4.4.4.	Platin elektrodun ksiloz temelli polimer serisiyle kaplanması.....	108
4.4.4.1.	Ksiloz temelli polimerler için elde edilen yanıtların karşılaştırılması.....	111
4.4.5.	Platin elektrodun gliserol içermeyen maltoz temelli polimer serisiyle kaplanması.....	112
4.4.5.1.	Gliserol içermeyen maltoz temelli polimerler için elde edilen yanıtların karşılaştırılması.....	115
4.4.6.	En yüksek yanıtların alındığı polimerlerin karşılaştırılması.....	117
4.5.	PU-F-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörün Optimizasyon Çalışmaları.....	118
4.5.1.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün nitrat ölçümü için yanıt süresinin belirlenmesi.....	118
4.5.2.	Enzim miktarının PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi.....	119
4.5.3.	Koenzim miktarının PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi.....	120
4.5.4.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum pH değerinin belirlenmesi.....	121
4.5.5.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum sıcaklığının belirlenmesi.....	122
4.6.	PU-F-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları.....	123
4.6.1.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi.....	123
4.6.2.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrat tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi.....	125
4.6.3.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit ve nitrat ölçümü için tekrarlanabilirlik.....	130
4.6.4.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün operasyonel kararlılığı...	132

4.6.5.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün girişim etkilerinin incelenmesi.....	132
4.6.6.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün depo kararlılığı.....	133
4.7.	PU-F-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörle Örnek Uygulamaları....	134
4.8.	PU-M-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörün Optimizasyon Çalışmaları.....	136
4.8.1.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün nitrat ölçümü için yanıt süresinin belirlenmesi.....	136
4.8.2.	Enzim miktarının PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi.....	137
4.8.3.	Koenzim miktarının PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi.....	139
4.8.4.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum pH değerinin belirlenmesi.....	140
4.8.5.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum sıcaklığının belirlenmesi.....	141
4.9.	PU-M-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları.....	142
4.9.1.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi.....	142
4.9.2.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrat tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi.....	144
4.9.3.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit ve nitrat ölçümü için tekrarlanabilirlik.....	149
4.9.4.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün operasyonel kararlılığı.....	151
4.9.5.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün girişim etkilerinin incelenmesi.....	151
4.9.6.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün depo kararlılığı.....	152
4.10.	PU-M-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörle Örnek Uygulamaları...	153
4.11.	PU-L-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörün Optimizasyon Çalışmaları.....	155
4.11.1.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün nitrat ölçümü için yanıt süresinin belirlenmesi.....	155
4.11.2.	Enzim miktarının PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi.....	156
4.11.3.	Koenzim miktarının PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi.....	158
4.11.4.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum pH değerinin belirlenmesi.....	159

4.11.5.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum sıcaklığının belirlenmesi.....	160
4.12.	PU-L-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları.....	161
4.12.1.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi.....	161
4.12.2.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrat tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi.....	163
4.12.3.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit ve nitrat ölçümü için tekrarlanabilirlik.....	168
4.12.4.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün operasyonel kararlılığı...	170
4.12.5.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün girişim etkilerinin incelenmesi.....	170
4.12.6.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün depo kararlılığı.....	171
4.13.	PU-L-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörle Örnek Uygulamaları....	172
4.14.	PU-X-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörün Optimizasyon Çalışmaları.....	174
4.14.1.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün nitrat ölçümü için yanıt süresinin belirlenmesi.....	174
4.14.2.	Enzim miktarının PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi.....	175
4.14.3.	Koenzim miktarının PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi.....	177
4.14.4.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum pH değerinin belirlenmesi.....	178
4.14.5.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum sıcaklığının belirlenmesi.....	179
4.15.	PU-X-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları.....	180
4.15.1.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi.....	180
4.15.2.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrat tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi.....	182
4.15.3.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit ve nitrat ölçümü için tekrarlanabilirlik.....	187
4.15.4.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün operasyonel kararlılığı..	189
4.15.5.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün girişim etkilerinin incelenmesi.....	189
4.15.6.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün depo kararlılığı.....	190
4.16.	PU-X-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörle Örnek Uygulamaları...	191

4.17.	PU-Maltoz-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörün Optimizasyon Çalışmaları.....	193
4.17.1.	PU-Maltoz-%1 Polimeri ile hazırlanan biyosensörün nitrat ölçümü için yanıt süresinin belirlenmesi.....	193
4.17.2.	Enzim miktarının PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi.....	194
4.17.3.	Koenzim miktarının PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi.....	196
4.17.4.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum pH değerinin belirlenmesi.....	197
4.17.5.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum sıcaklığının belirlenmesi.....	198
4.18.	PU-Maltoz-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları.....	199
4.18.1.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi.....	199
4.18.2.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrat tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi.....	202
4.18.3.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit ve nitrat ölçümü için tekrarlanabilirlik.....	207
4.18.4.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün operasyonel kararlılığı.....	208
4.18.5.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün girişim etkilerinin incelenmesi.....	209
4.18.6.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün depo kararlılığı....	210
4.19.	PU-Maltoz-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörle Örnek Uygulamaları.....	211
5.	SONUÇ.....	214
6.	KAYNAKLAR.....	222
	ÖZGEÇMİŞ.....	231

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi.....	4
Şekil 2.2.	Ticari biyosensörlerin uygulama alanları.....	5
Şekil 2.3.	Amperometrik esaslı biyosensör sistemi.....	12
Şekil 2.4.	Biyolojik tanıma elemanlarının immobilizasyonu için kullanılan yöntemler.....	17
Şekil 2.5.	Nitrat redüktazın şematik gösterimi.....	28
Şekil 2.6.	Son 20 yılda gerçekleştirilen nitrit ve nitrat biyosensör çalışmalarının yıllara göre dağılımı.....	36
Şekil 2.7.	Son 20 yılda gerçekleştirilen nitrit ve nitrat biyosensör çalışmalarına yapılan atıfların yıllara göre dağılımı.....	37
Şekil 4.1.	Fruktoz temelli poliüretanların sentez şeması.....	63
Şekil 4.2.	Fruktoz temelli poliüretanlara ait FTIR spektrumları.....	64
Şekil 4.3.	Fruktoz temelli poliüretanlara ait TGA termogramları.....	65
Şekil 4.4.	Fruktoz temelli poliüretanlara ait DTA termogramları.....	66
Şekil 4.5.	Fruktoz temelli poliüretanlara ait DSC termogramları ve Tg değerleri.....	67
Şekil 4.6.	Fruktoz temelli poliüretanlara ilişkin sıvı temas açısı görüntüleri.....	67
Şekil 4.7.	Ksiloz temelli poliüretanların sentez şeması.....	68
Şekil 4.8.	Ksiloz temelli poliüretanlara ait FTIR spektrumları.....	69
Şekil 4.9.	Ksiloz temelli poliüretanlara ait TGA termogramları.....	70
Şekil 4.10.	Ksiloz temelli poliüretanlara ait DTA termogramları.....	71
Şekil 4.11.	Ksiloz temelli poliüretanlara ait DSC termogramları ve Tg değerleri.....	71
Şekil 4.12.	Ksiloz temelli poliüretanlara ilişkin sıvı temas açısı görüntüleri.....	72
Şekil 4.13.	Laktoz temelli poliüretanların sentez şeması.....	73
Şekil 4.14.	Laktoz temelli poliüretanlara ait FTIR spektrumları.....	74
Şekil 4.15.	Laktoz temelli poliüretanlara ait TGA termogramları.....	75
Şekil 4.16.	Laktoz temelli poliüretanlara ait DTA termogramları.....	75
Şekil 4.17.	Laktoz temelli poliüretanlara ait DSC termogramları ve Tg değerleri.....	76
Şekil 4.18.	Laktoz temelli poliüretanlara ilişkin sıvı temas açısı görüntüleri.....	76
Şekil 4.19.	Maltoz temelli poliüretanların sentez şeması.....	77
Şekil 4.20.	Maltoz temelli poliüretanlara ait FTIR spektrumları.....	78

Şekil 4.21.	Maltoz temelli poliüretanlara ait TGA termogramları.....	79
Şekil 4.22.	Maltoz temelli poliüretanlara ait DTA termogramları.....	80
Şekil 4.23.	Maltoz temelli poliüretanlara ait DSC termogramları ve Tg değerleri.....	80
Şekil 4.24.	Maltoz temelli poliüretanlara ilişkin sıvı temas açısı görüntüleri.....	81
Şekil 4.25.	Gliserol içermeyen maltoz temelli poliüretanlara ait FTIR spektrumları.....	83
Şekil 4.26.	Gliserol içermeyen maltoz temelli poliüretanlara ait TGA termogramları.....	84
Şekil 4.27.	Gliserol içermeyen maltoz temelli poliüretanlara ait DTA termogramları.....	84
Şekil 4.28.	Gliserol içermeyen maltoz temelli poliüretanlara ait DSC termogramları ve Tg değerleri.....	85
Şekil 4.29.	Gliserol içermeyen maltoz temelli poliüretanlara ilişkin sıvı temas açısı görüntüleri.....	86
Şekil 4.30.	Nitrit için yükseltgenme potansiyelinin belirlenmesi amacıyla farklı derişimler için alınan CV eğrileri.....	87
Şekil 4.31.	Nitrit için yükseltgenme potansiyelinin belirlenmesi amacıyla alınan DPV eğrisi.....	88
Şekil 4.32.	Nitrat için DPV tekniği ile potansiyel taraması.....	89
Şekil 4.33.	Koenzim (NADPH) için DPV tekniği ile potansiyel taraması...	90
Şekil 4.34.	NADP ⁺ için DPV tekniği ile potansiyel taraması.....	91
Şekil 4.35.	Ölçüm çözeltisinde bulunan nitrat ve koenzimin nitrit yanıtına etkisi.....	92
Şekil 4.36.	Çıplak platin elektrotla 0,1 mM – 5 mM aralığındaki nitrit derişimleri için alınan DPV eğrileri.....	93
Şekil 4.37.	Çıplak platin elektrotla 5 mM – 150 mM aralığındaki nitrit derişimleri için alınan DPV eğrileri.....	93
Şekil 4.38.	0,1 mM – 100 mM aralığındaki nitrit derişimlerine karşılık akımdaki değişimleri gösteren doğrusal grafik.....	94
Şekil 4.39.	Platin elektrodun PU-F-%1 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü.....	95
Şekil 4.40.	Platin elektrodun PU-F-%3 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü.....	96
Şekil 4.41.	Platin elektrodun PU-F-%5 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü.....	96
Şekil 4.42.	Platin elektrodun PU-F-%10 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü.....	97

Şekil 4.43.	PU-F-%1, PU-F-%3, PU-F-%5 ve PU-F-%10 polimerleri için alınan en yüksek yanıtlar.....	98
Şekil 4.44.	PU-F-%1, PU-F-%3, PU-F-%5 ve PU-F-%10 polimerleri için alınan bütün yanıtların karşılaştırılması.....	98
Şekil 4.45.	Platin elektrodun PU-M-%1 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü.....	100
Şekil 4.46.	Platin elektrodun PU-M-%3 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü.....	100
Şekil 4.47.	Platin elektrodun PU-M-%5 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü.....	101
Şekil 4.48.	Platin elektrodun PU-M-%10 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü.....	101
Şekil 4.49.	PU-M-%1, PU-M-%3, PU-M-%5 ve PU-M-%10 polimerleri için alınan en yüksek yanıtlar.....	102
Şekil 4.50.	PU-M-%1, PU-M-%3, PU-M-%5 ve PU-M-%10 polimerleri için alınan bütün yanıtların karşılaştırılması.....	103
Şekil 4.51.	Platin elektrodun PU-L-%1 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü.....	104
Şekil 4.52.	Platin elektrodun PU-L-%3 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü.....	105
Şekil 4.53.	Platin elektrodun PU-L-%5 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü.....	105
Şekil 4.54.	Platin elektrodun PU-L-%10 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü.....	106
Şekil 4.55.	PU-L-%1, PU-L-%3, PU-L-%5 ve PU-L-%10 polimerleri için alınan en yüksek yanıtlar.....	107
Şekil 4.56.	PU-L-%1, PU-L-%3, PU-L-%5 ve PU-L-%10 polimerleri için alınan bütün yanıtların karşılaştırılması.....	107
Şekil 4.57.	Platin elektrodun PU-X-%1 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü.....	109
Şekil 4.58.	Platin elektrodun PU-X-%3 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü.....	109
Şekil 4.59.	Platin elektrodun PU-X-%5 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü.....	110
Şekil 4.60.	Platin elektrodun PU-X-%10 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü.....	110
Şekil 4.61.	PU-X-%1, PU-X-%3, PU-X-%5 ve PU-X-%10 polimerleri için alınan en yüksek yanıtlar.....	111
Şekil 4.62.	PU-X-%1, PU-X-%3, PU-X-%5 ve PU-X-%10 polimerleri için alınan bütün yanıtların karşılaştırılması.....	112

Şekil 4.63.	Platin elektrodun PU-Maltoz-%1 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü.....	113
Şekil 4.64.	Platin elektrodun PU-Maltoz-%3 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü.....	114
Şekil 4.65.	Platin elektrodun PU-Maltoz-%5 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü.....	114
Şekil 4.66.	Platin elektrodun PU-Maltoz-%10 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü.....	115
Şekil 4.67.	PU-Maltoz-%1, PU-Maltoz-%3, PU-Maltoz-%5 ve PU-Maltoz-%10 polimerleri için alınan en yüksek yanıtlar.....	116
Şekil 4.68.	PU-Maltoz-%1, PU-Maltoz-%3, PU-Maltoz-%5 ve PU-Maltoz-%10 polimerleri için alınan bütün yanıtların karşılaştırılması....	116
Şekil 4.69.	PU-Maltoz-%1, PU-X-%1, PU-F-%1, PU-L-%1 ve PU-M-%1 polimerleri için alınan en yüksek yanıtların karşılaştırılması.....	117
Şekil 4.70.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün nitrat ölçümü için yanıt süresinin belirlenmesi.....	118
Şekil 4.71.	Nitrit ölçümü için enzim miktarının PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi.....	119
Şekil 4.72.	Nitrat ölçümü için enzim miktarının PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi.....	120
Şekil 4.73.	Nitrat ölçümü için koenzim (NADPH) miktarının PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi.....	121
Şekil 4.74.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum pH grafiği.....	122
Şekil 4.75.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum sıcaklık grafiği.....	123
Şekil 4.76.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 0,5 mM – 10 mM aralığındaki nitrit derişimleri için alınan DPV eğrileri.....	124
Şekil 4.77.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 10 mM – 150 mM aralığındaki nitrit derişimleri için alınan DPV eğrileri.....	124
Şekil 4.78.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı.....	125
Şekil 4.79.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 0,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	126
Şekil 4.80.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 1 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	126
Şekil 4.81.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 2,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	127
Şekil 4.82.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	127

Şekil 4.83.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 7,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	128
Şekil 4.84.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 10 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	128
Şekil 4.85.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 12,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	129
Şekil 4.86.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 15 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	129
Şekil 4.87.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrat tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı.....	130
Şekil 4.88.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün operasyonel kararlılığı.....	132
Şekil 4.89.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün depo kararlılığı.....	134
Şekil 4.90.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün nitrat ölçümü için yanıt süresinin belirlenmesi.....	137
Şekil 4.91.	Nitrit ölçümü için enzim miktarının PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi.....	138
Şekil 4.92.	Nitrat ölçümü için enzim miktarının PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi.....	139
Şekil 4.93.	Nitrat ölçümü için koenzim (NADPH) miktarının PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi.....	140
Şekil 4.94.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum pH grafiği.....	141
Şekil 4.95.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum sıcaklık grafiği.....	142
Şekil 4.96.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 0,5 mM – 10 mM aralığındaki nitrit derişimleri için alınan DPV eğrileri.....	143
Şekil 4.97.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 10 mM – 150 mM aralığındaki nitrit derişimleri için alınan DPV eğrileri.....	143
Şekil 4.98.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı.....	144
Şekil 4.99.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 0,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	145
Şekil 4.100.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 1 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	145
Şekil 4.101.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 2,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	146
Şekil 4.102.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	146

Şekil 4.103.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 7,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	147
Şekil 4.104.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 10 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	147
Şekil 4.105.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 12,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	148
Şekil 4.106.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 15 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	148
Şekil 4.107.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrat tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı.....	149
Şekil 4.108.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün operasyonel kararlılığı.....	151
Şekil 4.109.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün depo kararlılığı.....	153
Şekil 4.110.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün nitrat ölçümü için yanıt süresinin belirlenmesi.....	156
Şekil 4.111.	Nitrit ölçümü için enzim miktarının PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi.....	157
Şekil 4.112.	Nitrat ölçümü için enzim miktarının PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi.....	158
Şekil 4.113.	Nitrat ölçümü için koenzim (NADPH) miktarının PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi.....	159
Şekil 4.114.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum pH grafiği.....	160
Şekil 4.115.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum sıcaklık grafiği.....	161
Şekil 4.116.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 0,5 mM – 10 mM aralığındaki nitrit derişimleri için alınan DPV eğrileri.....	162
Şekil 4.117.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 10 mM – 150 mM aralığındaki nitrit derişimleri için alınan DPV eğrileri.....	162
Şekil 4.118.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı.....	163
Şekil 4.119.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 0,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	164
Şekil 4.120.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 1 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	164
Şekil 4.121.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 2,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	165
Şekil 4.122.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	165

Şekil 4.123.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 7,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	166
Şekil 4.124.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 10 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	166
Şekil 4.125.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 12,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	167
Şekil 4.126.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 15 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	167
Şekil 4.127.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrat tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı.....	168
Şekil 4.128.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün operasyonel kararlılığı.....	170
Şekil 4.129.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün depo kararlılığı.....	172
Şekil 4.130.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün nitrat ölçümü için yanıt süresinin belirlenmesi.....	175
Şekil 4.131.	Nitrit ölçümü için enzim miktarının PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi.....	176
Şekil 4.132.	Nitrat ölçümü için enzim miktarının PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi.....	177
Şekil 4.133.	Nitrat ölçümü için koenzim (NADPH) miktarının PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi.....	178
Şekil 4.134.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum pH grafiği.....	179
Şekil 4.135.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum sıcaklık grafiği.....	180
Şekil 4.136.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 0,5 mM – 10 mM aralığındaki nitrit derişimleri için alınan DPV eğrileri.....	181
Şekil 4.137.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 10 mM – 150 mM aralığındaki nitrit derişimleri için alınan DPV eğrileri.....	181
Şekil 4.138.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı.....	182
Şekil 4.139.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 0,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	183
Şekil 4.140.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 1 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	183
Şekil 4.141.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 2,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	184
Şekil 4.142.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	184

Şekil 4.143.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 7,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	185
Şekil 4.144.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 10 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	185
Şekil 4.145.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 12,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	186
Şekil 4.146.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 15 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	186
Şekil 4.147.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrat tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı.....	187
Şekil 4.148.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün operasyonel kararlılığı.....	189
Şekil 4.149.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün depo kararlılığı.....	191
Şekil 4.150.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün nitrat ölçümü için yanıt süresinin belirlenmesi.....	194
Şekil 4.151.	Nitrit ölçümü için enzim miktarının PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi.....	195
Şekil 4.152.	Nitrat ölçümü için enzim miktarının PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi.....	196
Şekil 4.153.	Nitrat ölçümü için koenzim (NADPH) miktarının PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi.....	197
Şekil 4.154.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum pH grafiği.....	198
Şekil 4.155.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum sıcaklık grafiği.....	199
Şekil 4.156.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 0,5 mM – 10 mM aralığındaki nitrit derişimleri için alınan DPV eğrileri...	200
Şekil 4.157.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 10 mM – 150 mM aralığındaki nitrit derişimleri için alınan DPV eğrileri..	201
Şekil 4.158.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı.....	201
Şekil 4.159.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 0,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	202
Şekil 4.160.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 1 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	203
Şekil 4.161.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 2,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	203
Şekil 4.162.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	204

Şekil 4.163.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 7,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	204
Şekil 4.164.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 10 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	205
Şekil 4.165.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 12,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	205
Şekil 4.166.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 15 mM nitrat tayini için DPV eğrileri.....	206
Şekil 4.167.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrat tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı.....	206
Şekil 4.168.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün operasyonel kararlılığı.....	209
Şekil 4.169.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün depo kararlılığı.....	211

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1.	Türk Gıda Kodeksi 2002 yılı verilerine göre bazı gıdalara katılabilecek potasyum nitrit, sodyum nitrit, sodyum nitrat ve potasyum nitrat miktarları.....	21
Tablo 3.1.	Deneysel çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar.....	38
Tablo 3.2.	Biyosensörün hazırlama prosedürü.....	43
Tablo 3.3.	Biyosensörün ölçüm prosedürü.....	44
Tablo 4.1.	PU-F-%1 polimeriyle hazırlanan biyosensörle 25 mM’lık nitrit ölçümleri için tekrarlanabilirlik sonuçları.....	131
Tablo 4.2.	PU-F-%1 polimeriyle hazırlanan biyosensörle 5 mM’lık nitrat ölçümleri için tekrarlanabilirlik sonuçları.....	131
Tablo 4.3.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün girişim etkilerinin incelenmesi.....	133
Tablo 4.4.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle örneklerde nitrit ölçümü.....	135
Tablo 4.5.	PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle örneklerde nitrat ölçümü.....	136
Tablo 4.6.	PU-M-%1 polimeriyle hazırlanan biyosensörle 25 mM’lık nitrit ölçümleri için tekrarlanabilirlik sonuçları.....	150
Tablo 4.7.	PU-M-%1 polimeriyle hazırlanan biyosensörle 5 mM’lık nitrat ölçümleri için tekrarlanabilirlik sonuçları.....	150
Tablo 4.8.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün girişim etkilerinin incelenmesi.....	152
Tablo 4.9.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle örneklerde nitrit ölçümü.....	154
Tablo 4.10.	PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle örneklerde nitrat ölçümü.....	155
Tablo 4.11.	PU-L-%1 polimeriyle hazırlanan biyosensörle 25 mM’lık nitrit ölçümleri için tekrarlanabilirlik sonuçları.....	169
Tablo 4.12.	PU-L-%1 polimeriyle hazırlanan biyosensörle 5 mM’lık nitrat ölçümleri için tekrarlanabilirlik sonuçları.....	169
Tablo 4.13.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün girişim etkilerinin incelenmesi.....	171
Tablo 4.14.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle örneklerde nitrit ölçümü.....	173
Tablo 4.15.	PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle örneklerde nitrat ölçümü.....	174

Tablo 4.16	PU-X-%1 polimeriyle hazırlanan biyosensörle 25 mM’lık nitrit ölçümleri için tekrarlanabilirlik sonuçları.....	188
Tablo 4.17.	PU-X-%1 polimeriyle hazırlanan biyosensörle 5 mM’lık nitrat ölçümleri için tekrarlanabilirlik sonuçları.....	188
Tablo 4.18.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün girişim etkilerinin incelenmesi.....	190
Tablo 4.19	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle örneklerde nitrit ölçümü.....	192
Tablo 4.20.	PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle örneklerde nitrat ölçümü.....	193
Tablo 4.21.	PU-Maltoz-%1 polimeriyle hazırlanan biyosensörle 25 mM’lık nitrit ölçümleri için tekrarlanabilirlik sonuçları.....	207
Tablo 4.22.	PU-Maltoz-%1 polimeriyle hazırlanan biyosensörle 5 mM’lık nitrat ölçümleri için tekrarlanabilirlik sonuçları.....	208
Tablo 4.23.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün girişim etkilerinin incelenmesi.....	210
Tablo 4.24.	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle örneklerde nitrit ölçümü.....	212
Tablo 4.25	PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle örneklerde nitrat ölçümü.....	213

SEMBOL ve KISALTMALAR

PU	Poliüretan
F	Fruktoz
L	Laktoz
X	Ksiloz
M	Maltoz
DTA	Diferansiyel termal analiz
TGA	Termogravimetrik analiz
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
NR	Nitrat Redüktaz
Tg	Camsı geçiş sıcaklığı
NMP	1-Metil-2-pirrolidon
THF	Tetrahidrofuran
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamit
DMSO	Dimetilsülfoksit
DMAc	<i>N,N</i> -dimetilasetamit
CV	Dönüşümlü Voltametri
DPV	Diferansiyel Puls Voltametrisi
V	Volt
U	Ünite
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
EC	Enzim komisyon
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PU-F-%	Fruktoz temelli poliüretan polimerler
PU-M-%	Maltoz temelli poliüretan polimerler
PU-L-%	Laktoz temelli poliüretan polimerler
PU-X-%	Ksiloz temelli poliüretan polimerler
PU-Maltoz-%	Gliserol içermeyen maltoz temelli poliüretan polimerler

1. GİRİŞ

İnsan sağığı üzerine olan olumsuz etkilerinden dolayı nitrit ve nitrat tayini çevre kirliliğı, tarım, su analizi ve gıda analizlerinde önemlidir. Nitrit ve nitrat genel olarak kürlenmiş etlerde lezzet arttırıcı, renk verici ve antimikrobiyal ajan olarak kullanılmaktadır. Nitrit *Clostridium botulinum* gelişimini inhibe etmekte ve antioksidan olarak rol oynamaktadır. Nitritin gıdalara katılması ayrıca *Listeria*, *Salmonella* ve *E.Coli* patojenlerinin inhibe edilmesini de sağlamaktadır. Nitrit oldukça aktif bir kimyasaldır ve gıda ürünlerinde çok sayıda reaksiyonda yer almaktadır. Özellikle gıdalarda bulunan aminler ve diğ r azotlu bileşiklerle reaksiyona girerek kanserojen nitrozaminleri meydana getirmektedir.

Su kirliliğinin nedenlerinin başında endüstriden ve tarımsal faaliyetlerden kaynaklanan kirlenmeler gelmektedir. Tarımsal  retimde kullanılan gübrelerden kaynaklanan kirlilik içerisinde ise üzerinde en fazla durulan suların nitrat ile kirlenmesidir. Biriken bu nitratın koşullara göre değışen miktarları özellikle yağmur suları ile toprak derinliğıne hareket etmekte ve bir bölümü yer altı ve yer üstü sularına ulaşmaktadır. Sulardaki nitrat ve nitrit düzeyleri su kalitesinin önemli indikatörleridir.

Yüksek miktarda nitrit ve nitrat vücuda alındığında birçok sağık problemine yol açmaktadır. Nitrat iyonları doğrudan toksik etkiye sahip değıldir fakat bakteriyel nitrat redüktaz aktivitesi vasıtasıyla zararlı nitrit iyonlarına dönüşmektedir. Altı aydan küçük bebeklerde mide asitleri oluşmamaktadır. Bu ortamda nitratlar nitrite indirgenmekte ve sindirim sisteminde oluşan nitrit kandaki hemoglobin ile reaksiyona girerek methemoglobin oluşurmaktadır. Bu durum bebeklerde mavi bebek sendromu olarak bilinen “methemoglobinemi” meydana getirmektedir. Bu arada hemoglobindeki demir, Fe^{3+} ’e yükseltgenmekte, böylece kan oksijen taşıma işlevini yitirmekte ve bunun sonucunda bebekler boğularak ölmektedir.

Nitrik Oksit (NO), merkezi sinir sisteminin çeşitli bölgelerindeki hafıza oluşumu, denge, koku alma ve uyarı geçişi gibi birçok fonksiyonu destekleyen sinir ileti i olarak, kan basıncının ayarlanması, kalp atışının düzenlenmesi, solunum mide ve bağırsak fonksiyonlarının düzenlenmesi gibi vücut içerisinde birçok fizyolojik ve biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Nitrik oksit kısa yarı ömrü

ve hızlı metabolizması nedeniyle nitrit ve nitrat metabolitlerine kolayca yükseltgenir. Dolayısıyla nitrik oksit seviyesi genel olarak, plazma nitrit ve nitrat derişimlerinin belirlenmesiyle değerdendirilir. Bu etkiler nitrit ve nitrat için duyarlı, seçici ve basit analitik ölçümler için talebi arttırmıştır.

İlk biyolojik tanıma elemanı olarak glikoz oksidaz, 1962 yılında biyosensör hazırlanmasında kullanılmıştır. O zamandan beri, klinik teşhis, gıda güvenliği ve çevrenin izlenmesi amacıyla birçok analitin belirlenmesinde enzim temelli biyosensörler geliştirilmiştir. Biyosensörler, spesifik bir analit derişiminin izlenmesi için biyolojik bir reseptör olarak tanımlanmaktadır.

Enzim moleküllerinin immobilizasyonu, enzim biyosensörünün analitik özelliklerini etkileyen önemli bir husustur. Enzimin aktivitesi ve özellikleri immobilizasyondan sonra da korunmaktadır. İmmobilize enzimi içeren elektrotla, girişim türlerinden az etkilenen, geniş bir doğrusal aralığa sahip, yanıt süresi kısa ve yüksek kararlılığa sahip bir biyosensör üretmek amaçlanmaktadır. Duyarlılığı ve seçiciliği yüksek enzim içeren biyosensörler, gerçek örneklerde nitrat ve nitrit analizi için kullanılmıştır. Nitrat ölçümü için rapor edilen optik ve elektrokimyasal bu biyosensörlerin çoğunda bakteri, fungus ve bitki kaynaklı nitrat redüktaz enzimi kullanılmıştır.

Yapılan tez çalışmasının amacı, tek bir elektrot yüzeyine çeşitli polimerler kullanılarak nitrat redüktaz enzimi immobilizasyonu ile hem nitrit iyonunu hem de nitrat iyonunu aynı anda tayin eden bir biyosensör geliştirmektir. Kullanılan polimerlerle ortamdaki girişimlerin engellenmesi ve seçiciliği daha yüksek bir biyosensörün ortaya konması çalışmanın diğer önemli bir amacıdır. Geliştirilen bu biyosensör ile çeşitli örneklerde (et ürünlerinde, atık sularda) nitrit ve nitrat ölçümü gerçekleştirilerek uygulama alanının tam olarak ortaya konması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Biyosensörler

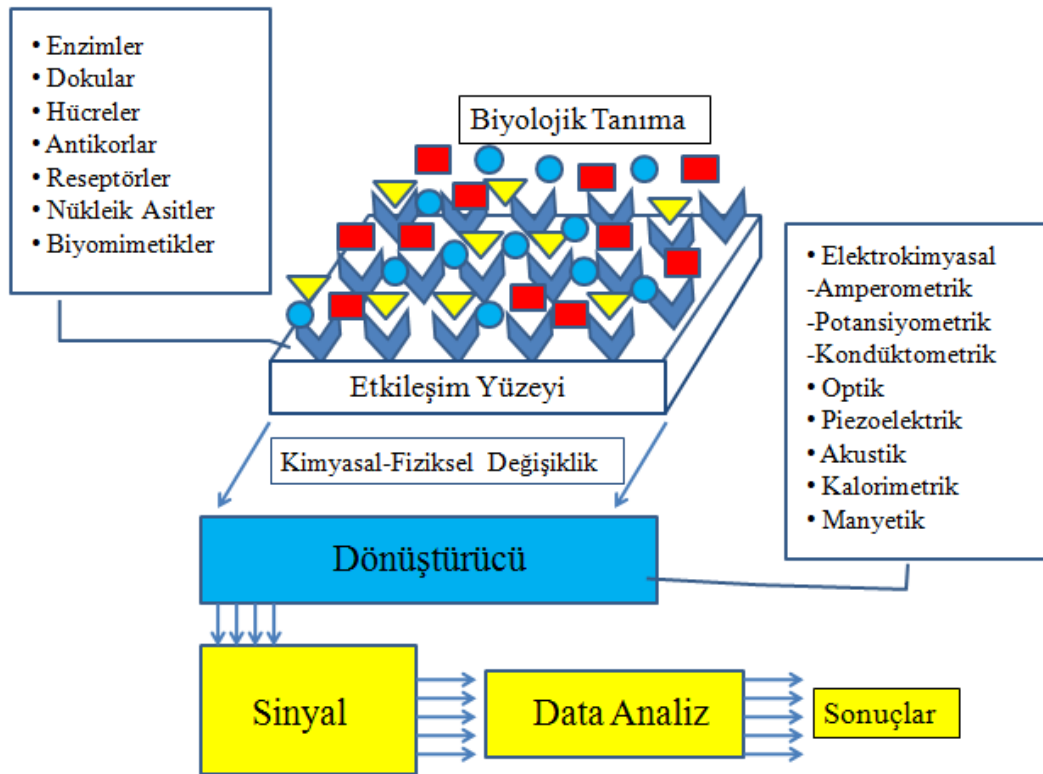
Biyosensörler, spesifik bir analit derişiminin izlenmesi için biyolojik bir reseptör olarak tanımlanmaktadır (Wang vd., 2009). Biyosensör genel olarak biyolojik tanıma elemanı ve dönüştürücü olmak üzere iki kısımdan oluşan hibrit bir cihazdır. Biyosensör tasarlanırken öncelikle biyolojik materyal seçilmeli, daha sonra onun doğasıyla (optik, elektrokimyasal vb.) uyumlu uygun bir dönüştürücü belirlenmelidir. Biyolojik tanıma elemanı genellikle istenen etkileşimi sağlayan bir protein (enzim) ya da bazı durumlarda nükleik asit olabilmektedir. Enzimler çok spesifiktir ancak bazı durumlarda birden fazla substrat için etki gösterebilmektedirler ve bu biyosensörlerde istenmeyen bir durumdur. Bu nedenle sadece tayin etmek istediğimiz analit ile bağlanan bir protein (enzim) seçilmelidir (Looger vd., 2003; Lorimier vd., 2006). Enzimler ve nükleik asitler dışında doku parçaları, mikroorganizmalar, organeller, doğal biyomembranlar veya lipozomlar, reseptörler, antikor-antijenler, diğer biyomoleküller ve biyomimetikler (yapısal ve işlevsel özelliklerini taklit eden doğal anoloğu) biyolojik tanıma elemanı olarak biyosensörlerde kullanılmaktadır (Şekil 2.1). Biyolojik tanıma elemanı, analit ile seçici bir bağlanma yapan ya da biyokimyasal dönüşümünü sağlayan ve böylece fiziksel veya fizikokimyasal özelliklerinde değişikliğe neden olan bir tanıma birimi olarak da tanımlanmaktadır (Scheller vd., 1991; Gonchar vd., 2002; Nakamura ve Karube, 2003; Sharma vd., 2003; Serra, 2011).

Biyosensörlerin dönüştürücü kısmı ise, elektrokimyasal (amperometrik, potansiyometrik, kondüktometrik), optik, piezoelektrik, termometrik, akustik, kalorimetrik ve manyetik özellikteki gruplardan oluşabilir (Şekil 2.1). Elektrokimyasal ve optik dönüştürücüler piyasada mevcut biyosensörlerde en çok kullanılan gruplardır (Valesco-Garcia, 2003; Sharma vd., 2003; Serra, 2011).

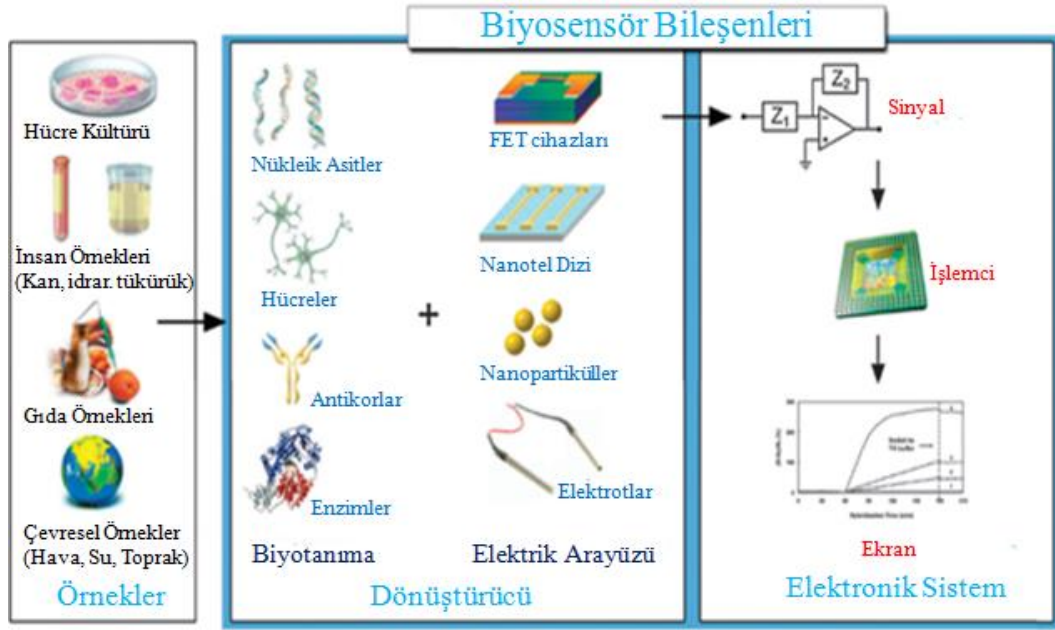
Biyolojik tanıma elemanı genellikle dönüştürücü yüzeyinde immobilize şekilde hazırlanır ve bazen dıştan bir membranla ya da sandviç şeklinde iki membran arasına yerleştirilerek kaplanır. Bu biyoseçici tabaka girişim yapacak türleri engellerken, analit için de bir difüzyon bariyeri oluşturmaktadır. Bu tür membranlar,

biyolojik tanıma elemanının kararlılığını ve seçiciliğini arttırmakta fakat biyokimyasal reaksiyonlar için difüzyon sınırlaması sağlamaktadır (Serra, 2011).

Biyosensörler biyoanalitik kimyanın yeni bir başarısı olsa da, sadece araştırmalarla kalmamış gerçek ticari ürünlere de dönüştürülmüştür (Kissinger, 2005). Hücre kültürü, insan örnekleri (kan, idrar, tükürük vb.), gıda örnekleri ve çevresel örnekler (hava, su, toprak vb.) için ticari biyosensörler geliştirilmiştir (Şekil 2.2). Analitik alanında tahmini dünya pazarı 20 milyar dolardır ve bunun % 30'u sağlık alanındadır. Biyosensör pazarı 2009 yılında 6,72 milyar dolarken bunun 2016 yılında 14,42 milyar dolar olması beklenmektedir (Serra, 2011).



Şekil 2.1. Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi.



Şekil 2.2. Ticari biyosensörlerin uygulama alanları.

2.2. İçerdikleri Biyolojik Tanıma Elemanına Göre Biyosensör Türleri

Biyosensörler farklı kategorilere göre sınıflandırılmaktadır. Bunlardan bir tanesi biyoaktif tabakanın içerdiği biyolojik tanıma elemanına (enzim, DNA, doku, hücre, antikor v.b.) göre yapılan sınıflandırmadır.

2.2.1. Enzim biyosensörleri

İlk biyolojik tanıma elemanı olarak glikoz oksidaz, 1962 yılında biyosensör hazırlanmasında kullanılmıştır. O zamandan beri, klinik teşhis, gıda güvenliği ve çevrenin izlenmesi amacıyla birçok analitin belirlenmesinde enzim temelli biyosensörler geliştirilmiştir. Yapılan yayınların önemli bir kısmı bu analitik cihazların performanslarını geliştirmek için rapor edilmiştir (Wang vd., 2014).

Enzim temelli biyosensörler, belirli bir analiti belirlemek ve ölçmek için kullanılan ve dönüştürücü eleman (elektrot) üzerinde immobilize bir enzim tabakası içeren analitik bir cihazdır. Enzim biyosensörleri ile gerçekleştirilen ölçüm yöntemleri, enzim ile hedef analit arasındaki etkileşime göre ikiye ayrılır. İlk yöntemde immobilize enzim tarafından katalitik dönüşüme uğratılan analitin derişimi ölçülür. Bu geleneksel amperometrik biyosensörlerin çalışma prensibi, biyokimyasal

reaksiyonun ürünlerinin direk indirgenmesi ya da yükseltgenmesi sonucunda oluşan akımdaki değişim görüntülenmektedir. İkinci ölçüm yönteminde ise enzim aktivitesi analit tarafından inhibe edilir ve bu biyosensörler enzim inhibisyon temelli biyosensörler olarak adlandırılır. Bu yöntemde enzim aktivitesinin değişmesinden dolayı ürün oluşumundaki azalma izlenir. Pestisit, insektisit ve ağır metaller gibi su kirleticiler bu tür amperometrik biyosensörlerle belirlendi (Chen vd., 2008; Amman, 2014; Wang vd., 2014).

Enzimler birçok faydalı özelliğinden dolayı ideal biyotanıma elemanı olarak görülmüşlerdir. İlk olarak, enzimler yüksek substrat spesifikliğınden dolayı numunede bulunan birçok bileşik içerisinde sadece hedef analitle reaksiyona girerler. Enzimlerin diğerk önemli bir özelliğı ise kolayca katı bir destek üzerine immobilize edilebilir olmalarıdır. Böylece daha az enzim ya da yüksek oranda saflaştırılmış protein kullanılır. Aynı zamanda ısı, pH ve organik çözücülere karşı enzimatik kararlılık artar. Uygun bir desteğe immobilize edilen enzimler uzun süre aktivitesini kaybetmezler ve defalarca kullanılabilirler. Bu şekilde sürekli bir modda çalışması analiz maliyetlerini en aza indirir ve enzimleri ekonomik olarak uygun kılar (Yakovleva vd., 2013).

Enzim moleküllerinin immobilizasyonu, enzim biyosensörünün analitik özelliklerini etkileyen önemli bir husustur (Fu vd., 2011). Enzimin aktivitesi ve özellikleri immobilizasyondan sonra da korunmaktadır. İmmobilize enzimi içeren elektrotla, girişim türlerinden az etkilenen, geniş bir doğrusal aralığa sahip, yanıt süresi kısa ve yüksek kararlılığa sahip bir biyosensör üretmek amaçlanmaktadır (Wilson ve Ammam, 2007).

Seçicilik açısından girişim türlerine karşı enzimler tek başlarına etkili değildir. Bu türler enzim tabakasını geçerek elektroda ulaşmakta ve bir sinyal oluşturabilmektedir. Bunu önlemenin yolu, elektrot üzerine yoğun ve kalın enzim kaplamalarının yapılmasıdır. Kalın bir enzim kaplaması girişim türlerinin bir kısmını engellemektedir (Amman, 2014).

Girişimleri engellemek için başka bir etkin yolda enzimleri polimerler, sol-jeller ve diğerk malzemeler içerisine tutukladıktan sonra elektrodun üzerine tutturulmaktadır. Diğerk taraftan elektrot yüzeyinde yapılan bu kaplamalar biyosensörün yanıt süresini uzatmaktadır (Amman, 2014).

Yüzeye bağlı enzimin dezavantajı, genellikle aynı enzimin çözelti formundaki haliyle karşılaştırıldığında biraz daha düşük bir aktivite sergilemesidir ve aktivitesinin çeşitli faktörlere büyük ölçüde bağlı olmasıdır. Tercih edilen bağlama tekniği, destek materyalinin özellikleri ve enzimin yapısal karakteri yüzeye bağlı enzimin katalitik performansı üzerinde belirgin bir etkiye sahiptir (Yakovleva vd., 2013).

Genel bir kural olarak, immobilizasyon için kullanılan fonksiyonel grupların, enzimin katalitik merkezinde yer almaması önemlidir. Immobilizasyon için kullanılan destek materyalinin özellikleri de önemlidir. Immobilizasyonda kullanılan destek materyalinin gözenek boyutu, yüzeye bağlanan enzime substratın ulaşmasına izin verecek kadar büyük olmalıdır. Immobilizasyon için var olan fonksiyonel gruplar ve enzimin büyüklüğü gibi enzim hakkındaki yapısal bilgilerin bilinmesi, destek matriks içerisine bağlanan enzimden, maksimum aktivite elde edilmesi için yararlı olacaktır (Yakovleva vd., 2013).

Enzimler en yaygın kullanılan biyotanıma unsurlarıdır. Fakat, aktif enzimi izole etmek her zaman mümkün değildir ya da yanıt bir kademeli enzimatik reaksiyondan üretilir. Bu durumda hücreler, organeller ya da doku kesitleri bir alternatif olarak kullanılabilir (Yakovleva vd., 2013).

Günümüzde yüksek performanslı ve güvenilir bir minyatür enzim elektrodunun geliştirilmesi birçok alanda önemli bir hedeftir. Bunun nedeni minyatür elektrotlar çok sayıda avantaj sunmaktadır. İlk olarak minyatürize enzim elektrotları biyolojik sıvıların küçük hacimlerinin analizinde kullanılabilir. İkinci olarak, küçük olmasından dolayı minyatür enzim elektrotları yeni bir teknoloji olan akışkan sistemler için kullanılan mikroarray sensörler içine entegre edilebilmektedir. Üçüncü olarak, in vivo implantasyonda kullanıldığında, minyatür enzim elektrotları dokuya daha az hasar verdiği için iyileşme daha hızlı olmaktadır. (Sheldon and van Pelt 2013) Bununla birlikte, minyatür elektrot geliştirilmesinde enzimlerin uygulanmasında önemli bir sorun vardır. Minyatür enzim elektrotları hazırlanırken dönüştürücü üzerine enzimin düzenli ve tekrarlanabilir kaplanması zordur (Dahlin, 2012; Sheldon ve van Pelt, 2013; Amman, 2014).

2.2.2. Doku temelli biyosensörler

Biyolojik tanıma elemanı olarak bitki dokularının kullanılması ile oluşturulan biyosensörler, izole enzimlerle oluşturulan biyosensörlere bir alternatif olmuştur. Hayvansal ve bitkisel dokuların kimi enzimlerce özellikle zengin olduğu bilinmektedir. İşte bu enzimlerin izole edilmiş preparatları yerine, doğrudan yoğun bulundukları bu kaynaklar doku biyosensörü hazırlanmasında kullanılmıştır (Telefoncu, 1999).

Doku biyosensörlerinde enzimin saflaştırılması gerekliliği ortadan kalktığı için maliyet düşüktür. Ayrıca enzimler doğal ortamında bulunduğu için koenzime ihtiyaç duymazlar ve kararlılıkları yüksektir. Doku biyosensörlerinin hazırlanmaları da oldukça kolaydır (Filho ve Vieira, 2000). Doku kesitleri kullanıldığında biyosensörün cevap süresi genellikle uzundur. Bu süreyi kısaltmak için doku kesiti yerine dokunun ezilmesiyle hazırlanan homojenize kısım kullanılmaktadır (Telefoncu, 1999).

2.2.3. DNA biyosensörleri

Watson ve Crick 1953 yılında DNA'nın çift sarmal yapısını önerdikten bu yana, DNA ile ilgili araştırmalar çeşitli alanlarda yoğun ilgi görmüştür. Bilindiği gibi DNA genetik bilgiyi taşıyan ve bunu daha sonraki nesillere aktaran makromoleküldür. DNA fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri nedeniyle yaygın olarak biyosensör uygulamalarında biyotanıma elemanı olarak kullanılmıştır. Son yıllarda, DNA biyosensörü ile ilgili yapılan çalışmaların çoğunda elektrokimyasal ve optik dönüştürücülerin kullanıldığı görülmektedir (Wang vd., 2014).

DNAzim, fonksiyonel nükleik asitlerin bir türüdür ve katalitik reaksiyonları (RNA kesilmesi, peptit bağ oluşumu, polimerizasyon vb.) gerçekleştirmektedir. Bütün DNAzim'ler, iyi bir kararlılık ve düşük maliyetle in vitro olarak izole edilebilirler. Böylece bu DNAzim'ler biyosensör uygulamalarında biyotanıma elemanı olarak kullanılabilirler (Wang vd., 2014).

Organik kirletici maddelerin belirlenmesi için, organik moleküller ve DNA arasındaki etkileşime dayalı elektrokimyasal DNA biyosensörleri geliştirilmiştir.

Yapılan çalışmalarda DNA biyosensörleri ile çevresel kirliliğe neden olan klorlu benzen bileşikleri ve naftalin bileşikleri belirlenmiştir (Wang vd., 2014).

2.2.4. Mikrobiyal biyosensörler

Hücre biyosensörlerinde biyotanıma elemanı olarak bakteri, maya, yosun, mantar ve doku kültürü hücreleri kullanılmaktadır. Bugün bir *Escherichia coli* (*E.coli*)i hücresinde bile 3000'den fazla enzim bulunduğu kabul edilmektedir. Gelişmiş hücrelerdeki enzim sayısının çok daha fazla olacağı açıktır. Saf enzimlerle gerçekleştirilen biyokimyasal reaksiyonları elbette bu enzimi içeren hücre ile de gerçekleştirilebilir. Bunun için ana koşul hedeflenen biyotransformasyon reaksiyonunun hücrenin içerdiği diğer enzimler tarafından etkilenmemesidir. Enzimler ile hazırlanan biyosensörler yerine mikroorganizmalar ile hazırlananların kullanılmasının birçok avantajı vardır (Wang vd., 2014; Telefoncu, 1999).

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

Buna karşın mikrobiyal sensörlerin bazı sakıncaları da vardır:

- Hücre membranı bir difüzyon bariyeri oluşturduğundan makromoleküller ve membrandan geçemeyen moleküller için uygun biyosensörler hazırlanamaz
- Mikrobiyal sensörlerin cevap süresi ve kullanımdan sonra temel sinyal düzeyine dönüş süresi enzim sensörlerinden uzundur

- Hücre birçok enzim içerdiğinden hedeflenen tayin reaksiyonunun diğer enzimler tarafından etkilenmesi söz konusu olabilir.

Ölçüm prensibine bağlı olarak mikrobiyal biyosensörleri, metabolik aktivitenin ölçüldüğü ya da elektrokimyasal aktif metabolitin ölçüldüğü biyosensörler olarak sınıflandırmak mümkündür. Elektrokimyasal mikrobiyal biyosensörler amperometrik, potansiyometrik, kondüktometrik temelli ya da mikrobiyal yakıt hücresi tipinde olabilirler (Lei vd., 2006).

Elektrokimyasal ölçüm prensibini temel alan mikrobiyal biyosensörleri metabolik aktiviteyi ve mikroorganizmalar tarafından üretilen aktif metabolitlerin ölçümünü temel alan sistemler olarak iki grupta toplamak mümkündür. Metabolik aktivitenin ölçümü, hücrelerin asimilasyonu sonucu metabolik aktivitelerindeki değişimi temel alır ve genel olarak substratın ortama eklenmesiyle artar. Bu değişim substrat derişimi ile ilişkilendirilir ve ortamdaki oksijen değişimine bağlı olarak izlenir. Bu biyosensörlerde aerobik mikroorganizmalar kullanılır. Mikrobiyal biyosensör oksijenle doyurulmuş tampon çözeltiye daldırılır. Substratın eklenmesinin ardından analit derişimine bağlı olarak oksijendeki azalma izlenir (Odacı, 2010).

Diğer sınıf mikrobiyal biyosensörlerde ise; mikroorganizmalar tarafından ortama salınan H_2 , CO_2 , NH_3 ve organik asitler gibi elektrokimyasal aktif metabolitlerin ölçümü esas alınır. Bu tip biyosensör sistemlerinde aerobik mikroorganizma kullanma zorunluluğu yoktur. Yapılan çalışmalara bakıldığında geliştirilen mikrobiyal sensörlerin birçoğu metabolik aktiviteyi temel almaktadır (Odacı, 2010).

2.2.5. İmmünosensörler

Biyolojik tanıma elemanı olarak antikorların kullanıldığı biyosensörler immünosensör olarak adlandırılır. İmmünosensörler, antikor-antijen arasındaki etkileşimin, iletim sistemi (elektrokimyasal, optik ve piezoelektrik) aracılığıyla ölçülebilir bir sinyale dönüştürülmesi temeline dayanır. Bu tip sensörler antikor-antijen reaksiyonlarının spesifikliğinden dolayı mükemmel seçiciliği olan sistemlerdir. İmmünolojik temelli sensörler çevre, klinik ve savunma amaçlı kullanılabilirler. İmmünosensörlerle hücreler, sporlar, toksinler, mikroorganizmalar,

virüsler, pestisidler ve endüstriyel kirleticiler analizlenebilmektedir (Wang vd., 2014).

2.3. İçerdikleri Fiziksel Dönüştürücülere Göre Biyosensör Türleri

Biyosensörler iletim elemanına göre elektrokimyasal, optik, piezoelektrik ve kalorimetrik olarak sınıflandırılırlar. Literatürde bildirilen biyosensör çalışmalarının çoğu elektrokimyasal ve optik alandadır (Wang vd., 2014).

2.3.1. Elektrokimyasal biyosensörler

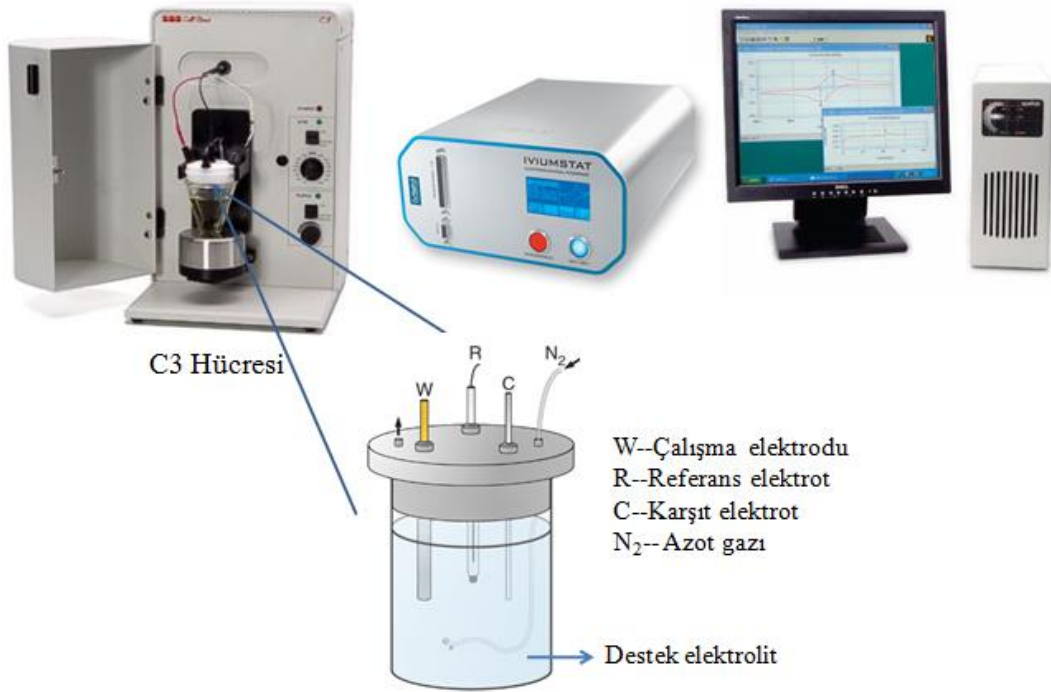
Elektrokimyasal biyosensörler, hedef analit ve biyolojik bileşen arasındaki seçici etkileşime dayanarak amperometrik, potansiyometrik ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi biyosensörleri içermektedir. Elektrokimyasal alanda en çok amperometrik ve potansiyometrik dönüştürücüleri içeren çalışmalar mevcuttur (Wang vd., 2014). Optik, piezoelektrik ve kalorimetrik biyosensörlerin kullanımını zorlaştıran sorunlara elektrokimyasal biyosensörlerde rastlanmaz. Bu tip biyosensörler hızlı, kolay kullanımlı ve düşük maliyetlidir (Chaubey ve Malhotra, 2002).

2.3.1.1. Amperometrik biyosensörler

Amperometrik biyosensör, uygulanan sabit bir potansiyelde elektrokimyasal hücrede akım yoğunluğunun ölçülmesi temeline dayanır. Amperometrik bir biyosensörde çalışma, referans ve karşıt elektrot olmak üzere üç elektrotlu bir sistem kullanılır. Sistemde oluşan akım yoğunluğu, çalışma elektrodunda yükseltgen ya da indirgen elektro aktif türlerin derişiminin bir fonksiyonu olarak tanımlanır. İkinci elektrot referans elektrot olarak iş görür. Karşıt elektrot ise çalışma elektrodu ile referans elektrot arasındaki potansiyelin sabit kalmasını sağlar. Amperometrik sistemde substrat derişimine karşılık elde edilen akımlar ile öncelikle kalibrasyon grafiğı çizilir. Daha sonra okunan akıma karşılık bu grafikten ilgili analitin derişimi belirlenir (Wang vd., 2014).

Dönüştürücü sistem olarak bir amperometrik sensörün kullanılması durumunda potansiyometrik sensörlerden en büyük fark, sinyal oluşturan türün elektrot yüzeyinde tüketilmesidir. Bu sistemde ya substratlar ya da ürünlerden bir tanesinin elektroaktif (yükseltgenebilir veya indirgenebilir) olması gerekmektedir (Dinçkaya, 1999).

Elektrokimyasal ölçümlerin gerçekleştirildiği, analit ve destek elektrolit içeren çözeltide, elektroaktif olmayan iyonların fazla miktarda bulunması çözeltinin elektriksel direncini azaltmaktadır.



Şekil 2.3. Amperometrik esaslı biyosensör sistemi.

2.3.1.2. Potansiyometrik biyosensörler

Bir referans ve uygun bir çalışma elektrodu ile bir çözeltideki potansiyel farkını ölçen tekniğe potansiyometri denir. Referans elektrot kendi çevresinden bağımsız potansiyele sahiptir. Çalışma elektrodu, çözeltideki maddelerin bazılarına seçicilik gösterir. Analizi yapılacak çözeltiye daldırılan bu elektrot ile aynı çözelti ile temasta

olan bir referans elektrodu arasında oluşan gerilim değeri ile analizi yapılan maddenin derişimi arasında logaritmik ilişki vardır (Minh, 1993).

Potansiyometrik enzim elektrotlarında kullanılan temel sensör; pH yada tek değerli iyonlara duyar cam elektrotlar, anyon yada katyonlara duyar iyon seçimli elektrotlar ve CO₂ yada NH₃'e yönelik gaz duyar elektrotlardır. Potansiyometrik esaslı enzim elektrotları söz konusu sensörler üzerine bir veya birden fazla enzimin uygun immobilizasyon yöntemleri ile immobilizasyonu ile hazırlanabilir. Cam membranlar yapısının modifikasyonu ile NH₄⁺, Li⁺, Na⁺, K⁺ gibi monovalent katyonlara duyarlı hale getirilirler. Bu elektrotlar daha sonra enzim sensörleri olarak kullanılabilirler (Yıldız, 1999).

2.3.2. Optik temelli biyosensörler

Biyolojik reaksiyon sonucunda oluşan lüminesas, floresans veya diğer optik sinyallerin ölçülmesi optik biyosensörlerin temelini oluşturmaktadır. Optik algılama yöntemleri genellikle birden çok analitin aynı anda incelenmesini gerektiren biyosensörlerde başarıyla uygulanmaktadır (Brogan ve Walt, 2005). Bu tür biyosensörlerde diğer bir avantaj ölçüm yapılan cihaz ile optik ölçü aparatının birbirinden ayrı yerlerde bulunabilmesidir. Ayrıca fiber optik iletken, magnetik ve elektrik alanlardan etkilenmemektedir. Bu tip sensörlerin ucuz olması da araştırma alanı olmalarına sebep olmuştur. Optik biyosensörlerin dez avantajı ise bulanık çözümlerde kullanılamamalarıdır (Chaubey ve Malhotra, 2002).

2.3.3. Piezoelektrik temelli biyosensörler

Piezoelektrik temelli biyosensörler, hedef analit ile biyolojik tanıma elemanı arasındaki etkileşim nedeniyle meydana gelen kütle değişimini algılayan cihazlardır. Burada enzimle veya antikor ile kaplanmış bir kuartz kristali mikro terazi olarak kullanılabilir. Bu prensip yardımıyla patlayıcı maddeler, tarım ilaçları, uyuşturucu maddeler veya mikroorganizmalar tespit edilebilir. Bu metodun dezavantajı ise her sensörün sadece bir defa kullanılabilmesi ve piezokristalin maliyetinin yüksekliğidir (Minh, 1993; Chaubey ve Malhotra, 2002).

2.3.4. Kalorimetri temelli biyosensörler

Birçok biyokimyasal reaksiyon ekzotermik olduğundan (örneğin enzimatik reaksiyonlar) kalorimetrik tayin için uygundur. Bu tür biyosensörlerde, analit ile uygun enzim arasındaki ekzotermik reaksiyon sonucunda açığa çıkan ısı, ortamdaki analit derişimiyle orantılıdır. Artan sıcaklık kimyasal reaksiyon sonucu konulan substrat miktarı ile bağlantılıdır. Kalorimetri temelli biyosensörlerde karşılaşılan en büyük sorun, ortamın sıcaklığının değişmesidir. Örneğin glukoz oksidaz (GOD) katalizli reaksiyonda, ne kadar çok glukoz dönüşüme uğrarsa sıcaklık o ölçüde artmaktadır. Fakat bu sıcaklık artışı oldukça düşüktür. Bu sebepten dolayı sistem çok iyi yalıtılmalıdır. Ayrıca ölçülecek madde de reaksiyona verilmeden önce aynı sıcaklığa getirilmelidir (Minh, 1993; Griffin ve Stratis-Cullum, 2009).

2.4. Biyolojik Tanıma Elemanlarının İmmobilizasyon Yöntemleri

Biyolojik tanıma elemanlarının (enzim, doku, mikroorganizma, nükleik asit, antikor vb.) elektrokimyasal dönüştürücüye bağlanması amacıyla en çok kullanılan teknikler adsorbsiyon, tutuklama, çapraz bağlama ve kovalent bağlamadır. Biyotanıma elemanının kimyasal yapısı ve fiziksel durumuna göre immobilizasyon yöntemi belirlenir. Örneğin, enzim elektrotlarında enzimin aktif merkezini bloke etmeyecek bir immobilizasyon yöntemi seçilmelidir. Eğer, hazırlanan biyosensör, kararlı, tekrar kullanılabilir ve seçiciliğini devam ettiriyorsa immobilizasyon yöntemi başarılı sayılır. Biyosensörün performansını geliştirmek için immobilizasyon yönteminin dikkatli bir şekilde seçilmesi gerekir (Sharma vd., 2003; Bankar vd., 2009; Ronkainen vd., 2010). Biyosensörün ömrü, immobilizasyon sonrası biyotanıma elemanının dönüştürücü yüzeyine ne kadar süre tutunabildiğine bağlı olduğundan, biyotanıma elemanının uzun süre yüzeyden ayrılmasını engellemelidir. Ayrıca immobilizasyon yöntemi, analitin biyotanıma elemanına ulaşmasını sterik olarak engellememelidir (Telefoncu, 1999).

2.4.1. Kovalent bağlama

Biyoreseptörün dönüştürücü yüzeyine kimyasal reaksiyon sonucu kovalent bağlanmasıdır (Şekil 2.4c). Enzimde katalitik aktivite için gerekli olmayan işlevsel grupların bağlanması yoluyla gerçekleştirilir. Enzimlerin kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için esansiyel olan aminoasitler üzerinden gerçekleşmemesi ve bu grupların bağlanma sırasında sterik olarak rahatsız edilmemesidir. Kovalent bağlanmanın gerçekleşmesi için bağlanma yüzeyinde ve/veya biyotanıma elemanı üzerinde (genellikle proteinlerin amino asit yan zincirlerinde bulunan) amino, karboksil, imidazol, tiyol, hidroksil, karbonil gibi reaktif grupların olması gerekmektedir. Biyotanıma elemanı, aktive edilmiş dönüştürücü yüzeyine bağlanabileceği gibi önceden uygun bir malzemeye kovalent bağlandıktan sonra da dönüştürücü yüzeyinde film oluşturulabilir. Biyotanıma elemanlarının kovalent yolla immobilizasyonu pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi değişkenlere karşı direnç sağlar ve biyosensörün ömrünü uzatır. Ancak biyoaktif tabakada bir miktar aktivite kaybına sebep olabilir (Telefoncu, 1999; Sharma vd. 2003; Ronkainen vd., 2010;).

2.4.2. Tutuklama

Tutuklama yoluyla immobilizasyonda amaç, yüksek molekül ağırlıklı biyomolekülleri belirli bir mekanda durmaya zorlamaktır (Şekil 2.4a). Biyomolekül bulunduğu ortamdan dışarıya çıkamaz. Bu işlem, polimerik jel matriks ile gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ile de gerçekleştirilebilmektedir. Jel matrikste tutuklamada kullanılan başlıca malzemeler poliakrilamid, nişasta, jelatin, naylon, kalsiyum aljinat, polivinil klorür ve polivinil alkoldür. Bu yöntemi kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik, biyotanıma elemanının fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır.

Uygun çaplı substrat molekülleri polimer kafes içerisinde tutuklanmış biyotanıma elemanına ulaşır ve biyokimyasal reaksiyon gerçekleşir. Bu yöntemde kullanılacak substratın küçük molekül olması gerekir. Yöntemin çok kolay uygulanması, gerçek bir fiziksel yöntem olması ve çok az miktarda biyomolekül kullanılarak gerçekleştirilmesi bu tekniğin avantajlarıdır. Bu yöntemin dezavantajı

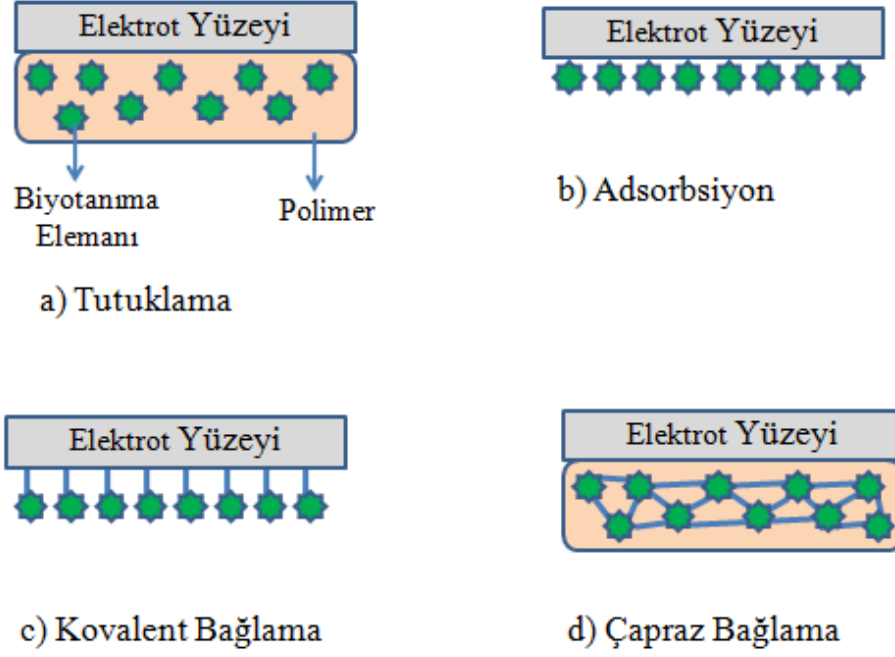
ise immobilize biyotanıma elemanının ancak küçük moleküllü substratlara karşı iyi aktivite göstermesidir (Görgülü, 2011).

2.4.3. Çapraz bağlama

Glutaraldehid, hekzametilen diizosiyanat, 2-izosiyanato-4-izotiyosiyanato-toluen, 1,5-difloro-2,4-dinitrobenzen ve bis-diazobenzidin-2,2-disülfonik asid gibi bifonksiyonel ve multifonksiyonel gruplar içeren kimyasal reaktifler kullanarak biyotanıma elemanlarının birbirine ya da destek adsorbana moleküller arası çapraz bağlanması sağlanır (Şekil 2.4d). Çapraz bağlama işlemi, elektrot yüzeyine olabileceği gibi enzimin katalitik aktivitesinin korunacağı bir immobilizasyon matriksinde olabilir. Son yıllarda doğal polimerler (Agar, aljinat, kitin, kitosan vb.) immobilizasyon matriksi olarak dikkat çekmektedir. Polimerleşme sonucu biyomoleküller çapraz bağlar arasında tutuklanmakta ve böylece ana çözeltiye geçmeleri engellenmektedir. Çapraz bağ yüzdesi öyle ayarlanmalıdır ki, biyomoleküllerin dışarı çıkmasını engelleyecek fakat substratın biyomoleküle ulaşmasını engellemeyecek ve biyomolekülün inhibisyonuna neden olmayacak oranda olmalıdır (Sharma vd. 2003; Wang vd., 2005; Ronkainen vd., 2010)

2.4.4. Adsorbsiyon

İmmobilizasyon için kullanılan en basit yöntemlerden biri olmasına rağmen en dayanıksız olanıdır. Yöntem, yüzey aktif suda çözünmeyen bir adsorbanın biyotanıma elemanını içeren çözelti ile karıştırılması ve enzimin aşırısının yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Taşıyıcıya bağlanmada etkili olan hidrojen bağları, çoklu tuz köprüleri ve Van der Waals bağlarıdır. Aktif karbon, kil, selüloz, silikajel, cam, hidroksiapatit, bentonit, nişasta, gluten ve kollagen enzimleri adsorblamak için kullanılan başlıca yapılardır. Enzim immobilizasyon işleminin basit oluşu, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı yöntemin avantajlarıdır. Ancak desorpsiyon tersinir bir olay olduğundan adsorpsiyon ile immobilizasyon güvenilir bir yöntem değildir ve bu yöntemle hazırlanan biyosensörlerin ömürleri daha kısadır (Şekil 2.4b) (Ronkainen 2010; Görgülü, 2011).



Şekil 2.4. Biyolojik tanıma elemanlarının immobilizasyonu için kullanılan yöntemler.

2.5. Biyosensörde Optimize Edilen Özellikler

2.5.1. Seçicilik

Biyosensörün, ölçüm ortamında var olabilecek diğer türler yanında sadece analite özgünlüğünü gösterir. Kullanılan biyotanıma elemanı açısından bakıldığında enzimler genel anlamda seçicilik sıralamasında antikor ve nükleik asitlerden sonra gelirler. Ancak bu genel yaklaşım mutlak spesifik enzimler söz konusu olduğunda geçersizdir. Dolayısıyla mutlak spesifik bir enzim söz konusu olduğunda seçicilik de en üst seviyelere yükselir. Buna karşılık grup spesifik enzimlerin seçiciliği düşüktür (Çete vd., 2006).

2.5.2. Kullanım ömrü

Biyosensörün verdiği yanıtlarda herhangi bir azalma olmadan kullanıldığı süreyi ifade eder. Biyotanıma elemanı olarak enzim kullanıldığı durumlarda, enzim aktivitesindeki azalma kullanım ömrünü belirler. Enzim elektrodunun kullanım ömrü kararlılık ve tekrarlanabilirlik gibi parametreleride etkilemektedir (Spichiger-Keller, 1998).

2.5.3. Tekrarlanabilirlik

Bir biyosensör ile aynı koşullar altında arka arkaya yapılan ölçümlerden elde edilen sonuçların birbirine olan yakınlığının ifadesidir. Sonuçların standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanarak ifade edilir. Enzim biyosensörlerinde, kullanılan enzimin aktivitesi, kararlılığı ve saflık düzeyi tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesinde büyük önem taşır (Telefoncu, 1999).

2.5.4. Kararlılık

İdeal bir biyosensörde kararlılığın yüksek olması istenir. Kararlılık, kullanılan biyolojik bileşenin fiziksel dayanıklılığına bağlı olduğu gibi; pH, sıcaklık, nem, ortamdaki O₂ derişimi, immobilizasyon materyalinin fiziksel ve kimyasal karakterine de bağlıdır. Biyosensörlerde kararlılık, çalışma ve depolama koşulları açısından başlıca iki durumda incelenir. Optimum çalışma koşullarında sürekli yapılan ölçümler sonucunda biyosensörün operasyonel kararlılığı, kullanılmadan ideal depolama koşullarında saklanmasıyla ise biyosensörün depo kararlılığı incelenir (Kılınç, 1996; Çete vd., 2006).

2.5.5. Duyarlılık

Duyarlılık, analit derişimindeki bir birimlik değişime biyosensörün bire bir cevap vermesi demektir. Biyosensörün duyarlılığı, analitin bir dizi belli derişimdeki çözeltilerini içeren standart çözeltiler ile yapılan ölçümler sonucu elde edilen kalibrasyon grafiğinden kolaylıkla belirlenebilmektedir. Duyarlılık, akım-derişim

eğrisinin eğimi ile orantılıdır. Eğim değeri büyüdükçe duyarlılıkta artış gözlenir (Kılınç, 1996; Telefoncu, 1999)

2.5.6. Düşük tayin sınırı

Biyosensörün tayin edebileceği en düşük analit derişimini ifade eder. Elektrot yüzeyinin büyüklüğü, biyotanıma elemanın tayin edilecek maddeye olan affinitesi, immobilize edilen biyomateryal miktarı ve immobilizasyonda kullanılan polimer tabakasının kalınlığı tayin sınırını etkilemektedir (Kılınç, 1996).

2.5.7. Kısa cevap süresi

Cevap süresi; biyosensörün, analitin bulunduğu ortama temas ettiği andan itibaren, ölçüm sisteminden sonucun okunduğu ana kadar geçen süredir. Biyosensör için cevap süresi genel olarak birkaç saniye ile birkaç dakika arasında değişir. 5 dakikaya kadar olan değerler kabul edilebilir. Ancak 10 dakika gibi bir süre oldukça uzun kabul edilir (Çete vd., 2006).

2.5.8. Geniş ölçüm aralığı

Biyosensörün analit derişimini doğrusal olarak ölçebildiği aralıktır. Enzim temelli biyosensör uygulamalarında, substrat (analit) ölçüm ortamında belirli bir derişim değerine ulaştıktan sonra akım-derişim eğrilerinde doğrusallıktan sapmalar gözlenir. Bu durum enzimatik reaksiyon eğrilerinin en önemli ve karakteristik özelliğidir. Bunun sebebi ise, ortamda artan substrat miktarına karşılık tepkimeye girecek enzim miktarının az olmasıdır (Kılınç, 1996).

2.5.9. Basit ve ucuz olması

Biyosensör tasarımındaki hedeflerden bir tanesinde hazırlanması ve kullanılması basit, maliyeti düşük biyosensörler üretmektir.

2.5.10. Sıcaklık

Enzim temelli biyosensörlerde optimum sıcaklıktan uzaklaştıkça biyosensör yanıtlarında düşmeler gözlenir. Özellikle termal kararlılığı düşük enzimler kullanıldığında geri dönüşümsüz bir denaturasyonda gözlenebilmektedir. Buna karşılık çeşitli kimyasalların difüzyon hızlarının sıcaklıkla artması enzim temelli biyosensör yanıtlarında bir artışla sonuçlanabilmektedir (Çete vd., 2006).

2.5.11. Biyouyumluluk

İnsan vücuduna implante edilerek anlık analit ölçümlerinin alınması için kullanılan biyosensörler de önem kazanmaktadır. İn vivo implantasyonda minyatür enzim elektrotları kullanıldığında, dokuya hasar vermemesi ve dokuda herhangi bir alerjik reaksiyon gerçekleştirmemesi beklenir (Sheldon ve van Pelt, 2013).

2.6. Gıdalarda Nitrit ve Nitrat

Gıda sanayinde gıda katkı maddelerinin kullanımı önemli bir yer tutmaktadır. Çünkü bu kimyasal maddeler hem gıdaların bozunmadan kaldığı süreyi uzatmakla hem de tat ve renginin iyileştirilmesinde ve besin değerlerinin korunmasında da görev almaktadır (Ata, 2010).

Nitrit ve nitratın insan sağlığı üzerine olan olumsuz etkilerinden dolayı belirli dozların üzerinde gıdalarda bulunması istenmemektedir. Nitrit ve nitrat genel olarak kürlenmiş etlerde lezzet arttırıcı, renk verici ve antimikrobiyal ajan olarak kullanılmaktadır (Unnikrishnan, 2013). Nitrit *Clostridium botulinum* gelişimini inhibe etmekte ve antioksidan olarak rol oynamaktadır. Nitritin gıdalara katılması ayrıca *Listeria*, *Salmonella* ve *E.Coli* patojenlerin inihibe edilmesini de sağlamaktadır. Nitrit oldukça aktif bir kimyasaldır ve gıda ürünlerinde çok sayıda reaksiyonda yer almaktadır. Özellikle gıdalarda bulunan aminler ve diğer azotlu bileşiklerle reaksiyona girerek kanserojen nitrozaminleri meydana getirmektedir (Yurchenko and Mölder, 2006; Leszczynska vd., 2009; Özdestan ve Üren, 2010; Ata, 2010).

Gıda ambalajları üzerinde yer alan ve E249, E250, E251 ve E252 kodlarıyla gösterilen nitrit ve nitrat tuzları Tablo 2.1’de verilmiştir. Ayrıca Tablo 2.1’de Türk Gıda Kodeksi 2002 yılı verilerine göre bazı gıdalarda satış anında bulunabilecek potasyum nitrit, sodyum nitrit, sodyum nitrat ve potasyum nitrat miktarları verilmiştir.

EC Kodu ve Maddenin Adı	Gıda Maddesi	Maksimum Doz (mg/kg)
E249 Potasyum Nitrit	Isıl işlem uygulanmamış, kürlenmiş, kurutulmuş et ürünleri	50 (Satış anında, sodyum nitrit cinsinden)
E250 Sodyum Nitrit	Diğer kürlenmiş et ürünleri ve et konserveleri	100 (Satış anında, sodyum nitrit cinsinden)
E251 Sodyum Nitrat	Kürlenmiş et ürünleri ve et konserveleri	250 (Satış anında, sodyum nitrat cinsinden)
E252 Potasyum Nitrat	Sert ve yarı sert peynirler	50 (Satış anında, sodyum nitrat cinsinden)
E252 Potasyum Nitrat	Süt bazlı peynir analogları	50 (Satış anında, sodyum nitrat cinsinden)
E252 Potasyum Nitrat	Tuzlanmış balık	200 (Satış anında, sodyum nitrit cinsinden, nitrattan meydana gelen nitrit kalıntı miktarı)

Tablo 2.1. Türk Gıda Kodeksi 2002 yılı verilerine göre bazı gıdalara katılabilecek potasyum nitrit, sodyum nitrit, sodyum nitrat ve potasyum nitrat miktarları (Özdestan ve Üren, 2010).

Salam, sosis ve sucuk gibi kürlenmiş et ürünlerinde nitrit ve nitrat kullanılmaktadır. Sırıken ve arkadaşları (Sırıken, 2006) tarafından gerçekleştirilen çalışmada 100 Türk tipi sucuk örneğinde kalıntı nitrat ve kalıntı nitrit analizleri gerçekleştirilmiştir. Türk Gıda Kodeksi’ne göre bu ürünlerde izin verilen maksimum kalıntı sodyum nitrat derişimi 250 mg/kg, kalıntı sodyum nitrit derişimi ise 100 mg/kg’dır. Örneklerin %18’inde sodyum nitrat ve %11’inde de sodyum nitrit bu sınır değerlerinin üzerinde bulunmuştur. Nitrit farklı çorba çeşitlerinde de kullanılmaktadır ve yapılan çalışmalarda çoğu çorbadaki nitrit miktarı Gıda Katkı Maddeleri Uzmanlar Komitesi (JECFA) tarafından izin verilen seviyeden fazla bulunmuştur (Erkekoglu, 2009).

Gıda üretiminde farklı teknolojik işlemlerin (yıkama, haşlama, dondurma, konserve vb.) hem gıdaların besin öğelerinde hem de bazı istenmeyen bileşenlerin seviyelerinde önemli değişikliklere yol açtığı bilinmektedir. Genel olarak su kullanılarak yapılan bazı işlemler (yıkama, haşlama) nitrat ve nitrit miktarını azaltmaktadır. Bunun nedeni olarak nitrat ve nitritin suda çözünmesi ve haşlama suyu ile beraber uzaklaştırılması gösterilmektedir (Jaworska, 2005).

Pastörizasyonla yok edilemeyen *Clostridium spp.* sporları, peynirin yapılışından birkaç hafta sonra bütirik fermentasyona yol açarak peynirlerde geç şişme ve gazlı defekte neden olmaktadır. Bu kusurların önlenmesi için peynir yapılacak sütlere nitrat ilave edilmektedir. Nitrat düzeyi kesinlikle 200 mg/L süt düzeyinden fazla olmamalı ve peynir mutlaka olgunlaştırılmalıdır. Belirtilenden daha fazla miktarda katılan nitratın mikroorganizmalarca indirgenmesiyle oluşan nitrit, tirozin ile birleşerek peynirde renk bozukluklarına neden olmaktadır. Ayrıca peynirin olgunlaştırılması sırasında oluşan nitrit toksik bir maddedir. Bu nedenle nitrat kullanımı bazı ülkelerde yasaktır veya dozu 0,1-0,2 mg/L süt ile sınırlandırılmıştır, ya da olgun peynirlerde en yüksek değer çoğunlukla 5 mg/kg olarak kabul edilmiştir (Özdestan ve Üren, 2010)

Tarımsal üretimde, bitkilerde ki verimi arttırmak için kullanılan zirai nitrat gübrelere, sebze ve meyvelerin topraktan bu iki iyonu almalarına ve depolanmasına neden olur. Bitkilerin pek çoğu bünyelerine aldıkları nitratı kullanarak proteinleri ve diğer azotlu bileşikler sentezlerler. Nitrat, bitkilerdeki nitrat redüktaz enzimi ile nitrite indirgenmektedir, bu enzimin aktivitesi inhibe edildiğinde bitkilerde nitrat birikimi artmaktadır. Yeşil yapraklı sebzeler diyetdeki nitratın başlıca kaynağıdır. Sebzelerdeki nitratın varlığı topraktaki azot bileşiklerine bağlıdır. Gıdalardaki nitrat ve nitrit seviyesinin artması halk sağlığı açısından önemli bir problem oluşturmaktadır. Bu nedenle bu bileşiklerin gıdalardaki derişimlerinin izlenmesi gerekmektedir (Pasquali vd., 2007; Özdestan ve Üren, 2010; Chan, 2011).

2.7. Çevre Örneklerinde Nitrit ve Nitrat

Atmosferin %78'ini oluşturan azot, azot döngüsüne bağlı olarak atmosfer, toprak ve canlı organizmalar arasında sürekli dolaşmaktadır. Nitrit ve nitrat bu döngünün doğal bir parçası olan inorganik iyonlardır. Organik azot içeren atıklar

toprağa geçtiklerinde önce serbest amonyağa sonra nitrite daha sonrada nitrata dönüşmektedir. Azot döngüsünde yaygın olarak oluşan nitrit ve nitrat yağmur suyu, yer altı ve yer üstü sularının en önemli bileşenleridir (Masserini ve Fanning, 2000; Biswas vd., 2004; Zuo vd., 2006; Ata, 2010).

Su kirliliğinin nedenlerinin başında endüstriden ve tarımsal faaliyetlerden kaynaklanan kirlenmeler gelmektedir. Tarımsal üretimde kullanılan kimyasal ve doğal gübreler suların kirlenmesinde önemli bir paya sahiptir. Gübrelerden kaynaklanan kirlilik içerisinde ise üzerinde en fazla durulan suların nitrat ile kirlenmesidir. Çünkü nitrat, tarımsal üretimde kullanılan gübrelerle gün geçtikçe artan miktarda uygulanmakta ve toprakta birikmektedir. Biriken bu nitratın koşullara göre değişen miktarları özellikle yağmur suları ile toprak derinliğine hareket etmekte ve bir bölümü yer altı ve yer üstü sularına ulaşmaktadır. Sulardaki nitratı gün ışığı ve bazı bakteriler kolaylıkla nitrite dönüştürmektedir (Mikuska ve Vecera, 2003;

Nitrat ve nitritin gıdalarda ve içeceklerde artmasının nedeni, topraktaki organik maddelerden, azotlu gübrelerin ve böcek ilaçlarının kullanılmasından ve kimyasal endüstri atıklarından kaynaklanmaktadır. Sulardaki nitrat ve nitrit düzeyleri su kalitesinin önemli indikatörleridir. Dünya sağlık örgütü (WHO) verilerine göre içme sularında nitrat ve nitrit için maksimum izin verilebilir düzeyler 50 mg/L ve 0,1 mg/L'dir (Özdestan ve Üren, 2010).

2.8. Biyolojik Sıvılarda Nitrit ve Nitrat

Nitrik Oksit (NO), merkezi sinir sisteminin çeşitli bölgelerindeki hafıza oluşumu, denge, koku alma ve uyarı geçişi gibi birçok fonksiyonu destekleyen sinir iletilici olarak, kan basıncının ayarlanması, kalp atışının düzenlenmesi, solunum mide ve bağırsak fonksiyonlarının düzenlenmesi gibi vücut içerisinde birçok fizyolojik ve biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Ata, 2010; Madasamy vd., 2014) Ayrıca, hipoksi, iskemi ve doku hasarları sonucunda meydana gelen nitrik oksitlerin ürettiği nitrit ve nitrat endokrin rezervuarında ortaya çıkmaktadır. Nitrik oksit kısa yarı ömrü ve hızlı metabolizması nedeniyle nitrit ve nitrat metabolitlerine kolayca yükseltgenir. Dolayısıyla nitrik oksit seviyesi genel olarak, plazma nitrit ve nitrat derişimlerinin belirlenmesiyle değerlendirilir (Toplam NO = NO₂⁻ + NO₃⁻) (Madasamy vd., 2014).

Vücuttaki nitrit ve nitratın en önemli kaynağı nitrik oksit sentazın etkisiyle L-arjinininden sentezlenen nitrik oksittir. Ancak aşırı ve kontrolsüz nitrik oksit sentezi hücreler için zararlı olabilmektedir. Daha dikkat çekici olan nitrit ve nitratın kandaki derişimleri, muhtemelen fizyolojik hipoksi sinyali, vazodilatasyon ve iskemi strese hücrel cevap olarak değişmektedir. Bu nedenle insan fizyolojisinde nitrit ve nitrat ölçümleri zorunludur. Bu ölçümler, in vivo nitrik oksit üretimi ile ilgili olarak ve oksidatif stresin neden olduğu çeşitli hastalıkların belirlenmesinde değerli bilgiler sağlar (Ata, 2010; Madasamy vd., 2014).

2.9. Nitrit ve Nitrat İyonlarının İnsan ve Hayvan Sağlığı Üzerine Etkisi

Yüksek miktarda nitrit ve nitrat vücuda alındığında birçok sağlık problemine yol açmaktadır. Organik azotun biyokimyasal oksidasyonunun son ürünü nitrattır. Nitrat iyonları doğrudan toksik etkiye sahip değildir. Nitrat, bakteriyel nitrat redüktaz aktivitesi vasıtasıyla zararlı nitrit iyonlarına dönüşmektedir. Vücuda alınan nitratın önemli bir kısmı dışkı yoluyla hızla atılmakta iken bir kısmıda tükürük bezlerine taşınmakta ve ağız boşluğuna salgılanmaktadır. Burada ağızda bulunan bakteriler tarafından nitrite indirgenir ve yutma yoluyla mideye taşınır. Nitrit varlığında, gıda sisteminin fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak bazı kompleks reaksiyonlar oluşmaktadır. Nitrit hem indirgen hem de yükseltgen bir madde olup, organik maddelere karşı aşırı derecede reaktiftir ve ısıya karşı dayanıklı değildir. Toplum sağlığı açısından nitratın en önemli özelliği, nitrat ve mide kanseri arasındaki ilişkidir. Nitrat kanserojenik nitrozaminlerin oluşumuna yardımcı olmaktadır. Midenin pH'sı 5,5'in üzerine çıktığında bakteriyel gelişime bağlı olarak nitrat, nitrite dönüşmekte, nitrit ise nitrozaminlerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu bileşikler potansiyel olarak kanserojen, mutajen ve/veya teratojendir (Connolly ve Paul, 2001; Mikuska ve Vecera, 2003; Prasad ve Chetty, 2008; Özdestan ve Üren, 2010).

Nitratın akut toksisitesi çok seyrek görülmektedir. Çoğu olguda meydana gelen bulgular nitratın nitrite indirgenmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Yetişkinlerde 8-15 g sodyum veya potasyum nitrat alınmasını takiben aniden ortaya çıkan şiddetli gastroenterit, karın ağrısı, halsizlik, idrar ve gaitada kan görülebilir. Nitratın aksine nitritin akut toksisitesi çok sık görülür ve buna bağlı çok sayıda ölüm bildirilmiştir. Bu genellikle sodyum nitritin yanlışlıkla alımına veya gıdalarda kontrolsüz kullanımına bağlı olarak gelişmektedir. Nitrit insanlar tarafından kullanılmasına izin

verilen ve ürün formülasyonuna giren tek toksik maddedir. Nitrit kullanımı oldukça sıkı kurallara bağlıdır (Özdestan ve Üren, 2010).

Çeşitli yollarla vücuda alınan nitrat derişimi 45 mg/L'den büyükse bu durum 6 aydan küçük bebeklerde nitrat zehirlenmesine yol açmaktadır. Altı aydan küçük bebeklerde mide asitleri oluşmamaktadır. Bu ortamda nitratlar nitrite indirgenmekte ve sindirim sisteminde oluşan nitrit kandaki hemoglobin ile reaksiyona girerek methemoglobin oluşturmaktadır. Bu arada hemoglobindeki demir Fe^{3+} e yükseltgenmekte, böylece kan oksijen taşıma işlevini yitirmekte ve bunun sonucunda bebekler boğularak ölmektedir. İlerleyen yaşlarda bu etki midedeki asiditenin artması sonucu ortadan kalmaktadır. Bunun sonucunda bebeklerde mavi bebek sendromu olarak bilinen “methemoglobinemi” meydana gelir (Gladvin vd., 2004; Cemek vd., 2007; Romitelli vd., 2007).

Klasik akut nitrit ve nitrat zehirlenmesi, kandaki nitrit varlığının yeterli seviyeye ulaşp anoksi (dokunun oksijensiz kalması) meydana getirmesi nedeniyle olmaktadır. Nitrat sindirim kanalındaki mikroorganizmaların etkisi ile nitrite dönüşür ve bu da vücudun savunma sistemini bastırır. Nitrit zehirlenmesi, nitrit seviyesinin beyin damar dokularında veya akciğer, kalp, karaciğer, böbrek ve testislerde yeterli miktara ulaşmasıyla meydana gelmektedir. Uzun süreli nitrit ve nitrata maruz kalınması söz konusu dokuların şiddetli olarak bozunmasına yol açabilmektedir (Groveni vd., 2008; Raat vd., 2009; Ata, 2010).

Cockburn ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, nitritin sadece nitrit içeren hayvan yemleriyle beslenen çiftlik hayvanları için değil aynı zamanda bu hayvanların etiyle beslenen insanlar içinde toksik olduğunu göstermişlerdir (Cockburn vd., 2010). Çiftlik hayvanlarında nitritin aşırı kullanımı nabız atışında artış, nefes darlığı, kaslarda titreme, kusma, dengesiz yürüme ve ölüme yol açmaktadır. Alındıktan sonra nitrit kanda hemoglobinle reaksiyona girerek methemoglobini oluşturur. Methemoglobin oksijene bağlanamaz ve methemoglobinemi olarak bilinen durum ortaya çıkar (Harvey vd., 2010). Ferrucci ve arkadaşları nitrat ve nitritle beslenmenin potansiyel kanserojen etkisi üzerine yaptıkları çalışmada, nitrit ve nitratla beslenmenin mesane kanseri riskini arttırdığını göstermişlerdir (Ferruci vd., 2010). Bu nedenle çeşitli gıda ürünlerinde, sebze, içme

suyu, hayvan yemi, su kaynaklarında yapılan nitrit tayini, insan ve hayvan sağlığını korumak için çok önemli ve gereklidir.

Sularda nitrit ve nitrat derişiminin yükselmesinin birçok olumsuz etkisi bulunmaktadır. Taiwan’da yapılan bir araştırmada içme sularındaki nitrit ve nitrat miktarının yükselmesi ile kolon kanserine yakalanan kişi sayısında bir artış olduğu belirlenmiştir (Yang vd., 2007). Mide ortamındaki nitrit ve nitrat ile mide ve yemek borusu kanseri arasında muhtemel bir ilişki olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Hamilton and Meltzer 2006; McColl, 2006). Yapılan bir çalışmada yüksek düzeyde nitrit ve nitrat içeren suların tüketilmesi ile doğum kusurları arasında bir ilişkinin olduğu tespit edilmiştir (Manassaram vd., 2006).

İnsan sağlığı üzerine olan olumsuz etkilerinden dolayı nitrit ve nitrat tayini çevre kirliliği, tarım, su analizi ve gıda analizlerinde önemlidir. Nitratin insan sağlığı ve çevre üzerinde iyi bir kirletici olduğu bilinmektedir. Bu etkiler nitrat için duyarlı, seçici ve basit analitik ölçümler için talebi arttırmıştır. Yüksek substrat seçiciliğinden dolayı nitrat redüktaz enzimi temelli nitrat biyosensörleri geliştirilmiştir (Can vd., 2012).

2.10. Nitrit ve Nitratın Analiz Yöntemleri

Nitrit ve nitrat tayinini için Griess kolorimetrik analizi, (Guevara vd., 1998; Miranda vd., 2001; Nataliya ve Andrei, 2005), florometrik (Fang vd., 2009) ve kemilüminesans (Nagababu ve Rifkind, 2010) yöntemler uygulanmıştır. Kullanılan yöntemlerden en iyisi Griess reaksiyonu olarak bilinen ve asidik ortamda 4-aminobenzen-sülfonik asit ile nitritin reaksiyonu sonucunda oluşan maddenin naftalen-1-amin ile reaksiyona girerek oluşturduğu azo boyar maddenin UV’deki absorbans ölçümüyle yapılmaktadır (Ata, 2010).

Nitrit ve nitrat miktarının tayini önemli hale geldikçe yeni yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin çoğu eğitimli bireyler tarafından kullanılan pahalı ekipman gerektiren ve zaman alıcı bir örnek hazırlığı olan karmaşık kromatografik veya spektroskopik tekniklerdir (Serra vd., 2011). Ayırma temelli yöntemlerden gaz kromatografisi-kütle spektrofotometresi (GC-MS) (Tsikas vd., 2012; Kage vd., 2002) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (Jobgen vd., 2007) ile çeşitli dedektör sistemleri birleştirilerek yapılan çalışmalar rapor edilmiştir.

Çok düşük derişimlerdeki nitrit ve nitratın belirlenmesi için en sık kullanılan yöntem, nitritin 2,3-diaminonaftalen (DAN) gibi floresans bir reaktif ile reaksiyonu sonucu oluşan 2,3-naftotriazol'ün (NAT) florometrik olarak HPLC-FL ile ölçülmesine dayanmaktadır. Bu yöntem için nitritin minimum algılama limiti pg düzeyindedir. Nitritin belirlenmesinde kullanılan diğer bir floresans reaktif 5-aminofloresein'dir. Nitrit ve nitratın GC-MS tekniği kullanılarak kalitatif ve kantitatif tayininin yapıldığı çalışmalarda, pentaflorobenzil bromür ile nitritin reaksiyonu sonucu oluşan α -nitropentaflorotoluenin GC-MS'de ölçülmesi temeline dayanmaktadır (Ata, 2010).

Spektrofotometrik tayinine dayalı, bazı ticari analiz kitleri (Cayman Chemical Company, Prod.no.850-001-KI01 Sigma, Catalogno.06239) de piyasada mevcuttur. Bu tekniklerden çoğu *in vivo* ölçümler için uygun değildir ve gelişmiş cihazlar gerektirmektedir. Genellikle biktırıcı tayin prosedürü vardır ve bu nedenle de zaman alıcıdır (Madasamy vd., 2014).

Son zamanlarda, elektrokimyasal biyosensör tekniklerinin çalışma kolaylığı, düşük üretim gideri ve real-time analize uygunluğu gibi sağladığı çeşitli pratik avantajlardan dolayı, nitrit ve nitrat ölçümü için etkili bir araç olduğu kanıtlanmıştır. Buna ek olarak biyosensörler hızlı cevap, daha duyarlı (özellikle modifiye edilmiş elektrotların kullanımı ile) ve seçiciliği yüksek belirleme sağlarlar. (Madasamy,2014)

Son zamanlarda, zamandan ve yüksek deney maliyetlerinden kurtulmak için aynı anda nitrit ve nitratın doğrudan belirlenmesi ilgi görmüştür. Bu çaba, araştırmacıların aynı anda nitrit ve nitratı tayin ettikleri elektrokimyasal sensörlerin (gümüş katkılı zeolit elektrot (Manea vd., 2010), bakır kompleksli elektrot (Shiddiky vd., 2006), grafit elektrot (Kaminskaya vd.,2004), bakır elektrotlar kullanarak (Shariar ve Hinoue, 2010) geliştirilmesiyle sonuçlanmıştır.

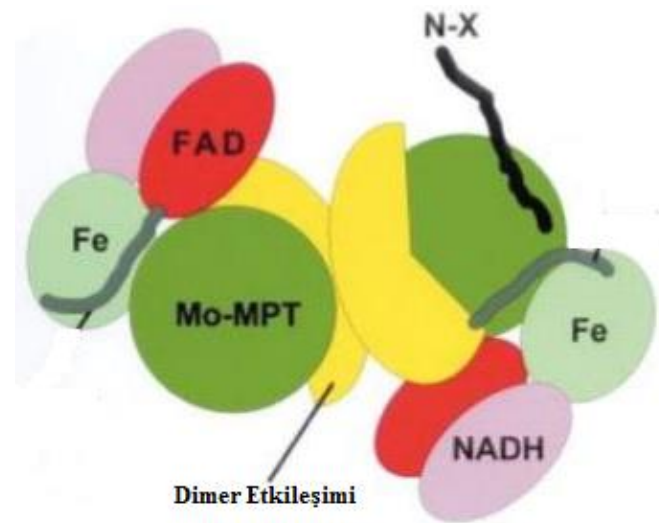
Bununla birlikte, kimyasal olarak modifiye edilmiş bu elektrotların seçiciliği düşüktür ve bu nedenle biyolojik örnek uygulamalarında istenmeyen ve girişim yaratan başka biyolojik substratların varlığı, düşük derişimde ki nitrit ve nitrat ölçümünü sınırlamaktadır (Madasamy vd., 2014).

Biyolojik sıvılar, gıda ve çevre gibi çeşitli örneklerdeki nitratın belirlenmesi için literatürde değişik yöntemler bulunmasına rağmen nitrat, genellikle çeşitli

işlemler (kimyasal ve biyolojik indirgenme) ile nitrite dönüştürülerek kalitatif ve kantitatif olarak tayin edilmektedir. Bunun için en çok kullanılan yöntem çeşitli kimyasallar ile nitratın nitrite indirgenmesidir. Çinko tozu, çinko kaplamalı kolonlar ve $TiCl_3$ kullanılarak nitrat kolaylıkla nitrite indirgenmektedir. Kadmiyum kolon ile nitratın nitrite dönüştürülmesi günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. Enzimatik reaksiyonlarla nitratın nitrite indirgenmesi de en sık kullanılan yöntemler arasındadır. Bu yöntem genellikle biyolojik sıvılardaki nitratın indirgenmesinde kullanılmaktadır. Bir nitrat indirgeyici ile birlikte nikotinamit adenin dinükleotit fosfat (NADPH) kullanılarak indirgenme yapılmaktadır (Dziedzic vd., 2003; Kisko vd., 2006; Romitelli vd., 2007; Ata, 2010).

2.11. Nitrat Redüktaz Enzimi ve Tepkime Mekanizması

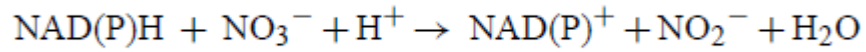
Nitrat redüktazlar (NR) çeşitli hayvan, bitki ve mantarları da içine alan mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. *Aspergillus niger* nitrat redüktazı (E.C. 1.6.6.2), her biri yaklaşık 100 kDa olan iki özdeş alt birimden oluşan bir homodimer'dir. Her bir alt birim stokiyometrik olarak 1:1:1 oranlarında 3 kofaktör içerir ki bunlar NAD(P)H'n oksidasyona uğradığı yer olan flavin edenin dinükleotid (FAD), bir de nitratın indirgendiği yer olan heme-demir (heme-Fe) ve Mo-molibdopterin (Mo-MPT)'dir. Her bir kofaktör bağımsız bir yapısal bileşeni oluşturmaktadır. Böylece molibden, elektron verici varlığında nitratın indirgenmesinden sorumludur (Ferreya ve Solís, 2004; Xuejiang vd., 2006).



Şekil 2.5. Nitrat redüktazın şematik gösterimi.

Nitrat redüktaz enzimi doğada bolca bulunur ve iki temel metabolik yolda görev alır. Birincisi biyosenstetik amaçlar için nitratın asimilasyonla alımını ve kullanımını sağlar. İkinci olarak da solunum zincirinde bu anyonun anaerobik koşullar altında oksidan olarak kullanımını sağlar. Nitrat redüktaz enzimi doğal enzim yenileyici bir piridin nükleotit ile birlikte nitratın nitrite indirgenmesini katalizler (Ferreya ve Solís, 2004).

Nitratın nitrite indirgenmesi NAD(P)H'dan flavin bölgesine elektron transferiyle başlar. Sonrasında heme boyunca ve sonunda molibdenyum kofaktör aracılığı ile NO₃⁻ üstüne devam eder. Reaksiyon aşağıdaki gibidir.



Nitrat biyosensörlerinin hazırlanması için NR enzimi kullanıldığında genellikle NADH gibi bir kofaktör kullanılmaktadır. Bir kofaktör varlığında NR tarafından nitratın katalitik indirgenmesi nitrat/nitrit denge potansiyeline karşı elektrot potansiyelini değiştirir ki bu değişim substrat derişimi ile orantılı olarak elektrot yanıtında keskin bir azalma ile sonuçlanır. Ne yazık ki, nitrat biyosensörü için NADH kullanımının iki dez avantajı vardır. Bunlardan biri NADH'ın elektrokimyasal oksidasyonu sırasında oluşan düşük akımlar, diğeri ise dimerizasyon (NAD• radikali ve diğeri oksidasyon ürünlerinin dimerizasyonu) yoluyla oluşan dimerler kolayca elektrot yüzeyi üzerinde adsorbe edilir ve böylece bu yan ürünler elektrot yüzeyini kirletirler. Sonuç olarak, bu biyosensörün duyarlılık, seçicilik ve kararlılığını azaltır. Amperometrik biyosensörler için bu problemler, elektrot ve enzimin redoks merkezi arasındaki elektron transferi için redoks mediyatörleri kullanılarak bu sorunun üstesinden gelinmiştir. NADH'ın yerine redoks mediyatörü kullanmanın diğeri faydası ise daha ucuz olmasıdır. Amperometrik nitrat biyosensörleri için kullanılan bazı redoks mediyatörlerine örnekler; potasyum ferrisiyanür, metil violojen, safranin, brom fenol, nötr kırmızı vb. (Can vd., 2012).

Duyarlılığı ve seçiciliği yüksek enzim içeren biyosensörler, gerçek örneklerde nitrat ve nitrit analizi için kullanılmıştır. Nitrat ölçümü için rapor edilen optik ve elektrokimyasal biyosensörlerin çoğunda bakteri, fungus ve bitki kaynaklı nitrat redüktaz enzimi kullanılmıştır. Ancak, nitrat ve nitrit belirlenmesi için uygulanan

düşük potansiyellerde, çözülmüş oksijen, biyotanıma elemanı olarak redüktazları içeren biyosensörleri güçlü bir şekilde etkilemektedir (Xuejiang vd., 2006; Wang vd., 2014).

Nitrat redüktaz aktivitesinin sodyum azid, potasyum rodanür, etilendiamin tetraasetikasit (EDTA), Ni^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} gibi bileşikler ve ağır metallerle inhibe olduğu tespit edilmiştir (Çimen, 1996; Aiken vd., 2003; Sparacino-Watkins vd., 2014).

2.12. Literatür Taraması

Bu bölümde nitrit ve nitrat tayini için son 10 yılda yapılmış bazı biyosensör çalışmaları özetlenmiştir.

Silva ve arkadaşları (2004) nitrat tayini için, camsı karbon elektrot yüzeyine, iki redoks matriksi (polipirol-violojen) içerisine immobilize ettikleri nitrat redüktaz enzimi ile elektrokimyasal bir biyosensör geliştirmişlerdir. Ölçümler 100 mM, pH 7,5 tris-HCl tamponunda, 30 °C’de ve -0,44 V’luk ölçüm potansiyelinde gerçekleştirilmiştir. Biyosensörün nitrat için doğrusal tayin aralığı 5 – 163 μM ’dır (Silva vd., 2004).

Ferreya ve Solís (2004) *Aspergillus niger* nitrat redüktazını ve fenosafranini kullanarak modifiye ettikleri camsı karbon elektrodun kinetik parametrelerini incelemiş ve nitrat tayini için kullanmışlardır. Camsı karbon elektrot hazırlanırken elektrot yüzeyine aktivitesi bilinen *Aspergillus niger* nitrat redüktazından küçük bir hacim (0,047 U) damlatmış ve çözücü buharlaştıktan sonra elektrot yüzeyini selüloz diyaliz membran (12 kDa) ile kaplamış ve O-ring halkası geçirmişlerdir. Mediyatör olarak ise metil violojen kullanmışlardır. Ölçümler 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponunda ve -0,75 V’luk ölçüm potansiyelinde gerçekleştirilmiştir (Ferreya ve Solís, 2004).

Wang ve arkadaşları (2006) yaptıkları çalışmada *Aspergillus niger* nitrat redüktazını kullanarak metil violojen/nafyon kompozit film temelli kondüktometrik nitrat biyosensörü geliştirmişlerdir. Ölçümler 5 mM, pH 7,5 fosfat tamponunda ve oda sıcaklığında (25 °C) gerçekleştirilmiştir. Biyosensörün nitrat için doğrusal tayin aralığı 20 – 250 μM ’dır (Wang vd., 2006).

Quan ve arkadaşları (2006) camı karbon elektrot yüzeyine bir polimer aracılığıyla nitrit redüktaz ve metil violejeni birlikte immobilize ederek nitritin amperometrik belirlenmesi için kullanmışlardır. Ölçümler 50 mM, pH 7 PBS tamponunda ve oda sıcaklığında (25 ± 2 °C) gerçekleştirilmiştir. Biyosensörün nitrit için doğrusal tayin aralığı 1,5 - 260 μ M'dır (Quan vd., 2006).

Xuejiang ve arkadaşları (2006) yaptıkları diğer bir çalışmada metil violojen/nafyon/nitrat redüktaz (*Aspergillus niger*) temelli kondüktometrik nitrat biyosensörü geliştirmişlerdir. Ölçümler 5 mM, pH 7,5 fosfat tamponunda ve oda sıcaklığında (25 °C) gerçekleştirilmiştir. Biyosensörün nitrat için doğrusal tayin aralığı 20 – 250 μ M'dır (Xuejiang vd., 2006).

Chen ve arkadaşları (2007) nitriti yüksek duyarlılıkta tayin etmek için bir enzim biyosensörü geliştirmişlerdir. Bu amaç doğrultusunda camı karbon elektrot yüzeyine sitokrom c nitrit redüktaz enzimi immobilize etmişler ve elektriksel bağlantıyı da modifiye elektrot yüzeyine hapsedilen redoks aktif [ZnCr-AQS (antraknon-2-sülfonat)] ile sağlamışlardır. Ölçümler 100 mM, pH 7,6 PBS tamponunda, 30 °C'de ve -0,6 V'luk ölçüm potansiyelinde gerçekleştirilmiştir. Biyosensörün nitrit için doğrusal tayin aralığı 0,015 – 2,35 μ M'dır (Chen vd., 2007).

Geng ve arkadaşları (2008) bor kaplı elmas film elektrodun üzerini bir sandviç misali SiO₂/Sitokrom c/SiO₂ kaplayarak elektrokimyasal bir nitrit biyosensörü geliştirmişlerdir. Ölçümler 25 mM, pH 6,86 PBS tamponunda gerçekleştirilmiştir. Sensörün nitrit için doğrusal ölçüm aralığı 1 μ M- 1 mM'dır (Geng vd., 2008).

Chen ve arkadaşları (2008) nitrit tayini için yaban turpu peroksidazı/katalaz enzimi temelli yeni bir biyosensör geliştirmişlerdir. Bu iki enzimi içeren sistem enzim inhibisyon temelli biyosensörlere yeni bir kavram katmıştır. Her iki enzimde hidrojen peroksitin ayrışmasını katalizler. Nitrit ise katalazın spesifik bir inhibitörüdür. Hidrojen peroksit varlığında nitrit ilavesi, katalaz tarafından tüketilen hidrojen peroksiti bloke etmiş ve böylece hidrojen peroksitin amperometrik sinyalinde bir artış olmuştur. Ölçümler, camı karbon elektrot kullanılarak pH 7,5 PBS tamponunda ve 30 °C'de gerçekleştirilmiştir. Biyosensör ile 4 - 50 μ M'lık nitrit standartları için doğrusal sonuçlar elde edilmiştir (Chen vd., 2008).

Sohail ve Adeloju (2008) yaptıkları çalışmada nitrat redüktaz ve nikotinamid adenin dinükleotit (NADPH)'nin polipirol film içerisine elektroimmobilizasyonunu gerçekleştirmiş ve nitratı potansiyometrik olarak tayin etmişlerdir. Ölçümler, platin elektrot kullanılarak 100 mM, pH 7,3 fosfat tamponunda ve oda sıcaklığında (25 °C) gerçekleştirilmiştir. Potansiyometrik nitrat biyosensörünün doğrusal tayin aralığı 0,1 – 5 mM'dır (Sohail ve Adeloju, 2008).

Dai ve arkadaşları (2008) içi boş CdS nanoküreleri üzerine immobilize edilen hemoglobin ile modifiye edilmiş camı karbon elektrot temelli nitrit biyosensörü geliştirmişlerdir. Ölçümler 100 mM, pH 7 fosfat tamponunda, oda sıcaklığında (25±2 °C) ve -0,85 V'luk ölçüm potansiyelinde gerçekleştirilmiştir. Biyosensörün nitrit için doğrusal tayin aralığı 0,3-182 µM'dır (Dai vd., 2008).

Cosnier ve arkadaşları (2008) yaptıkları çalışmada poli(pirol-violejen) film-nitrat redüktaz-kil kompozit temelli elektrokimyasal nitrat biyosensörü geliştirmişlerdir. Nitrat ve metil violejen varlığında, nitratın nitrite enzimatik indirgenmesi -0,6 V'da meydana gelen katalitik akımla izlenmiştir. Ölçümler, camı karbon elektrot kullanılarak pH 7,5 tris-HCl tamponunda ve 30 °C'de gerçekleştirilmiştir. Biyosensör ile 5 - 50 µM aralığındaki nitrit standartları için doğrusal sonuçlar elde edilmiştir (Cosnier vd., 2008).

Hong ve Dai (2009) yaptıkları çalışmada tek boyutlu altın nanopartikül üzerine hemoglobin immobilize ederek, nitrit ve hidrojen peroksit tayinine yönelik amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Ölçümler, tek boyutlu altın nanopartikülle kaplanan camı karbon elektrot kullanılarak pH 7 PBS tamponunda, oda sıcaklığında (20±2 °C) ve -0,85 V'luk ölçüm potansiyelinde gerçekleştirilmiştir. Nitrit için doğrusal tayin aralığı 0,4 – 14,8 µM olarak bulunmuştur (Hong ve Dai, 2009).

Zazoua ve arkadaşları (2009) yaptıkları çalışmada peroksidaz ve katalazın birlikte kullanılmasıyla hazırladıkları kondüktometrik elektrotla sularda nitrit tayini için yeni bir biyosensör geliştirmişlerdir. Ölçümler pH 7,3 fosfat tamponunda ve oda sıcaklığında (22±2 °C) gerçekleştirilmiştir. Nitrit için doğrusal tayin aralığı 0,3 – 446 µM olarak bulunmuştur (Zazoua vd.,2009).

Zhang ve arkadaşları (2009) *Desulfovibrio desulfuricans* hücrelerinden ekstrakte edilen sitokrom c nitrit redüktaz enzimini, kompozit membrana immobilize

ederek hazırladıkları kondüktometrik elektrot ile nitrit tayini yapmışlardır. Ölçümler pH 6,5 PBS tamponunda gerçekleştirilmiştir. Nitrit için doğrusal tayin aralığı 0,2 – 120 μ M olarak bulunmuştur (Zhang vd., 2009).

Chen ve arkadaşları (2009) yaptıkları çalışmada çok duvarlı karbon nanotüp-poli(amidoamin)-kitosan nanokompozit ile modifiye camı karbon elektrot üzerine sitokrom c'yi immobilize ederek geliştirdikleri biyosensör ile nitrit tayini yapmışlardır. Ölçümler pH 7 PBS tamponunda, oda sıcaklığında (25 ± 2 °C) ve +0,9 V'luk ölçüm potansiyelinde gerçekleştirilmiştir. Nitrit için doğrusal tayin aralığı 29 – 254 μ M olarak bulunmuştur (Chen vd., 2009).

Ding ve arkadaşları (2010) camı karbon elektrot yüzeyine oldukça poröz bir yapıya sahip olan hemoglobin mikrokemer immobilizasyonu ile hazırladıkları biyosensör ile nitrit ve hidrojen peroksitin duyarlı bir şekilde tayinini gerçekleştirmişlerdir. Ölçümler 50 mM, pH 4 Britton-Robinson tamponunda ve - 0,65 V'luk ölçüm potansiyelinde yapılmıştır (Ding vd., 2010).

Silveira ve arkadaşları (2010) kompleks örneklerde nitrit tayini için mediyatör kullanmadan etkili bir amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Biyosensör hazırlanırken *Desulfovibrio desulfuricans*'den elde edilmiş kararlılığı ve seçiciliği yüksek Sitokrom c nitrit redüktaz (ccNiR), pirolitik grafit çalışma elektrodu üzerine immobilize edilmiş ve nitrit ölçümü gerçekleştirilmiştir. Ölçümler pH 7,6 tris-HCl tamponunda, 20 °C'de ve -0,9 V'luk çalışma potansiyelinde gerçekleştirilmiştir. Nitrit için doğrusal tayin aralığı 0,25 – 50 μ M olarak bulunmuştur (Silveira vd., 2010).

Eguílaz ve arkadaşları (2010) camı karbon elektrot kullanarak poli-3-metiltiyofen/çok duvarlı karbon nanotüpler üzerine sitokrom c immobilizasyonu ile elde edilen hibrit-modifiye elektrot temelli bir biyosensör geliştirmiş ve bu biyosensörü nitritin elektrokimyasal tayininde kullanmışlardır. Ölçümler pH 7 PBS tamponunda ve +0,9 V'luk çalışma potansiyelinde gerçekleştirilmiştir. Nitrit için doğrusal tayin aralığı 10 – 100 μ M olarak bulunmuştur (Eguílaz vd., 2010).

Adeloju ve Sohail (2011) yaptıkları çalışmada polipirrol temelli iki tabakalı amperometrik nitrat biyosensörü geliştirmişlerdir. Tabakaların birinde inorganik girişimleri engellemek için seçici poli-o-fenilendiamin kullanmışlardır. Nitrat

redüktaz ve NADH polipirol tabakası içerisine immobilize edilmiştir. Biyosensör hazırlanırken *Aspergillus niger* nitrat redüktazı (E.C. 1.6.6.1) kullanılmıştır. Ölçümler 100 mM, pH 7,3 fosfat tamponunda ve -0,325 V'luk çalışma potansiyeline CV tekniği ile yapılmıştır. Biyosensörün nitrat ölçümü için doğrusal tayin aralığı 10 - 500 μ M'dır (Adeloju ve Sohail, 2011).

Yeu ve arkadaşları (2011) yaptıkları bir çalışmada, tek katmanlı grafen nanotrombosit-protein kompozit film temelli nitrit biyosensörünü geliştirmişlerdir. Nitrit varlığında gerçekleşen reaksiyon sonucunda, heme proteini ve elektrot yüzeyi arasındaki elektron transferi ile akımda meydana gelen değişim CV tekniği ile izlenmiştir. Ölçümler modifiye camısı karbon elektrot ile pH 7,4 fosfat tamponunda alınmıştır. Nitrit için doğrusal tayin aralığı 0,05 – 2,5 mM olarak bulunmuştur (Yeu vd., 2011).

Serra ve arkadaşları (2011) yayınladıkları çalışmada nitrit tayinine yönelik yeni bir enzimatik biyosensör tanımlamışlardır. Nitrit biyosensörü, karbon pasta elektrot yüzeyine sitokrom cd_1 nitrit redüktaz ve onun redoks partneri sitokrom c_{552} 'nin birlikte immobilizasyonu ile hazırlanmıştır. 50 mM, pH 6,3 MES tamponunda ve oda sıcaklığında gerçekleştirilen ölçümlerde, biyosensörün nitrit için doğrusal tayin aralığı 10 – 200 μ M olarak bulunmuştur (Serra vd., 2011).

Can ve arkadaşları (2012) yaptıkları bir çalışmada, camısı karbon elektrot yüzeyinde hazırladıkları karbon nanotüp/polipirol/nitrat redüktaz biyofilm temelli amperometrik nitrat biyosensörünü geliştirmişlerdir. Nitrat için optimum amperometrik cevaplar 0,1 M lityum klorür ve 7 mM potasyum ferrisiyanür içeren 100 mM, pH 7,5 PBS tamponu ile +0,13 V'luk ölçüm potansiyelde alınmıştır. Biyosensörün nitrat ölçümü için doğrusal tayin aralığı 0,44 - 1,45 mM olarak bulunmuştur (Can vd., 2012).

Liang ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan bir çalışmada indiyum kalay oksit elektrotlar platin nanoparçacıklarla kaplanmış, nitrit ve hidrojen peroksit tayinine yönelik amperometrik sensör olarak kullanılmıştır. Optimum koşullar olan 100 mM, pH 7 PBS tamponunda ve +0,7 V'luk çalışma potansiyelinde, biyosensörün nitrit için doğrusal tayin aralığı 5 – 800 μ M olarak bulunmuştur (Liang vd., 2012).

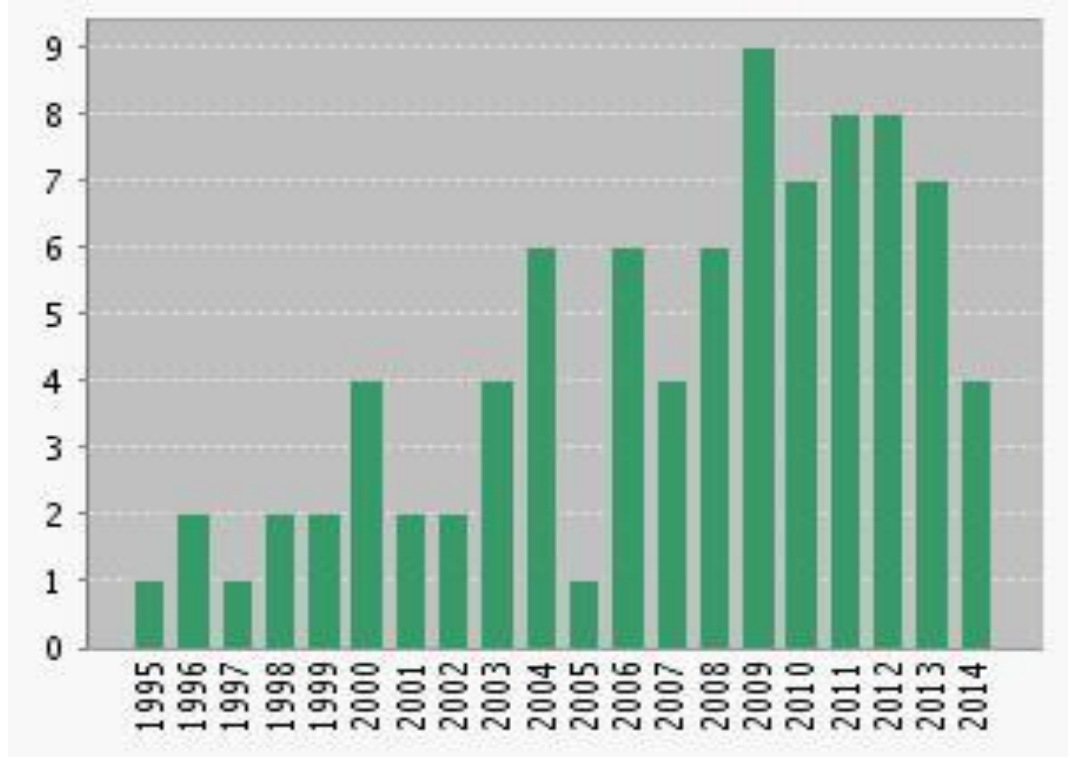
Dong ve arkadaşları (2012) CeO₂ katkılı LaF₃ ve iyonik sıvı kompozit film ile beraber miyoglobinin camı karbon elektrot üzerine immobilize edilmesiyle hazırlanan nitrit biyosensörüyle nitrit tayini yapmışlardır. Ölçümler 100 mM, pH 7 PBS tamponunda, oda sıcaklığında ve +0,8 V'luk çalışma potansiyelinde gerçekleştirilmiştir. Nitrit için doğrusal tayin aralığı 5 – 4650 µM olarak bulunmuştur (Dong vd., 2012).

Unnikrishnan ve arkadaşları (2013) nitrit tayinine yönelik gerçekleştirdikleri sensör çalışmasında, camı karbon elektrodu elektrokimyasal olarak sentezledikleri polidifenilamin-Pt kompozit ile modifiye etmişlerdir. Bütün ölçümler pH 4 çalışma tamponunda, oda sıcaklığında (25 °C±2) ve +0,85 V'luk çalışma potansiyelinde CV tekniği ile yapılmıştır. Biyosensörün nitrit için doğrusal tayin aralığı 1 µM – 9,5 mM olarak bulunmuştur (Unnikrishnan vd., 2013).

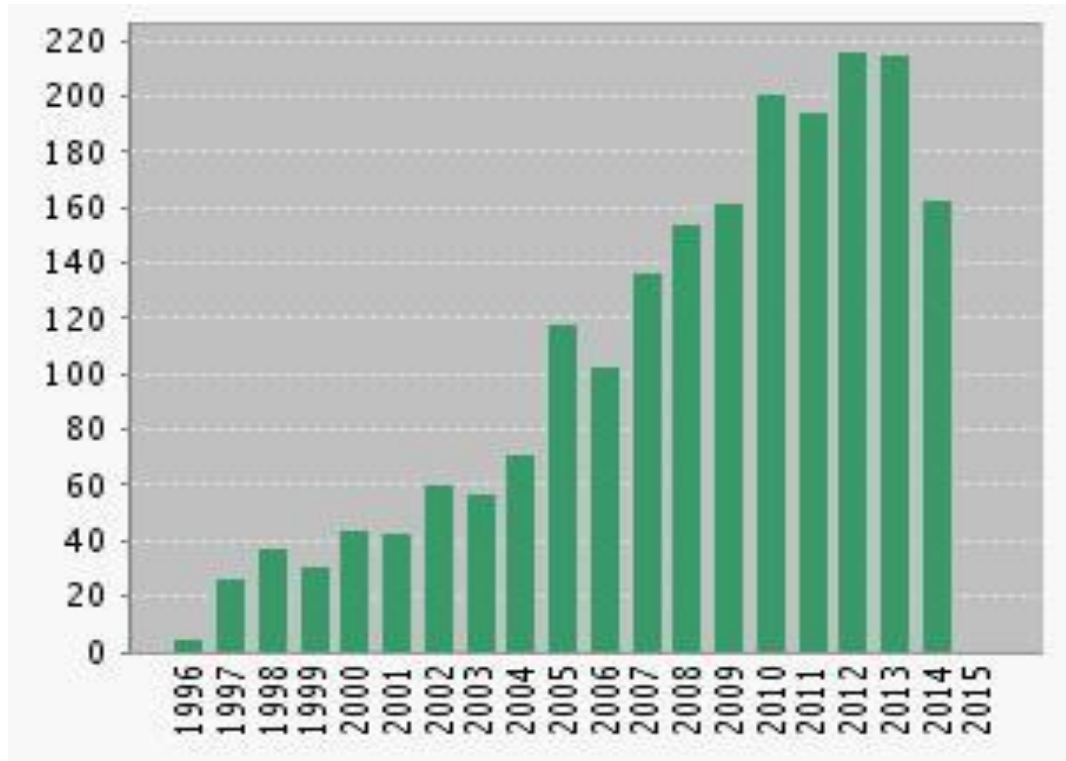
Madasamy ve arkadaşları (2014) yaptıkları çalışmada karbon nanotüp-polipirol nanokompozit modifiye platin elektrot üzerine süperoksit dismutaz ve nitrat redüktaz enzimlerini immobilize ederek hazırladıkları biyenzimatik biyosensör ile nitrit ve nitrat iyonlarının aynı anda tayinini gerçekleştirmişlerdir. Süperoksit dismutaz enziminin elektrokatalitik aktivitesi sonucu nitritin yükseltgenmesi +0,8 V'da izlenmiş ve doğrusal tayin aralığı 100 nM – 1 mM olarak bulunmuştur. Benzer şekilde nitrat redüktaz enziminin elektrokatalitik aktivitesi sonucu nitratın indirgenmesi -0,76 V'da izlenmiş ve doğrusal tayin aralığı 500 nM – 10 mM olarak bulunmuştur. Ölçümler 0,1 M KCl içeren 100 mM pH 7 PBS tamponunda gerçekleştirilmiştir (Madasamy vd., 2014).

Sachdeva ve Hooda (2014) yaptıkları çalışmada *Aspergillus niger* nitrat redüktazını, altın nanopartiküllere sabitlenmiş epoksi'lere kovalent olarak bağlamış ve bunu nitrat tayininde kullanmışlardır. Çalışma ortamında 1 mM NADH bulunurken ölçümler alınmıştır. Biyosensörün nitrat için doğrusal tayin aralığı 0,1 – 10 mM olarak bulunmuştur. Çalışmada hem serbest enzim hem de bağlı enzim incelenmiştir. Bağlı ve serbest enzimin optimum sıcaklığı 25 °C olarak bulunmuştur. Optimum pH'ın serbest enzim için 7,5; bağlı enzim için 7 olduğu belirlenmiştir. Biyosensörün incelenen depo kararlılığında 14 gün sonunda biyosensör cevabında %50 düşüş gözlenmiştir (Sachdeva ve Hooda, 2014).

Web of Science’da son 20 yılda yapılan çalışmalar nitrit+nitrat+biyosensör olarak konu içerisinde tarandığında 88 çalışma bulunmuştur. Bu çalışmaların yıllara göre dağılımı Şekil 2.6’da verilmiştir. Bu çalışmalara yapılan atıfların yıllara göre dağılımı da Şekil 2.7’de verilmiştir.



Şekil 2.6. Son 20 yılda gerçekleştirilen nitrit ve nitrat biyosensör çalışmalarının yıllara göre dağılımı.



Şekil 2.7. Son 20 yılda gerçekleştirilen nitrit ve nitrat biyosensör çalışmalarına yapılan atıfların yıllara göre dağılımı.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Yapılan çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar Tablo 3.1’de verilmiştir.

Kimyasal Madde	Firma
Na ₂ HPO ₄	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
NaNO ₂	Merck
KCl	Merck
NaNO ₃	Merck
Nitrat Redüktaz	Sigma
NADPH	Roth
NADP ⁺	Merck
HCl	Sigma
NaOH	Merck
Fruktoz	Merck
Maltoz	Merck
Sükroz	Merck
Laktoz	Merck
Glukoz	Merck
Askorbik asit	Merck
Oksalik asit	Merck
Üre	Merck
1-Metil-2-Pirrolidon	Merck
Gliserol	Merck
Etilen glikol	Merck
Alumina solüsyonu	Basi
pH ayarlama tamponları	Mettler Toledo

Tablo 3.1. Deneysel çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar.

3.2. Kullanılan Cihazlar ve Sistemler

Çalışma kapsamında sentezlenen polyüretanların ve polimerik membranların yapısal karakterizasyonu Matson 1000 model FT-IR ve Perkin-elmer FTIR cihazları ile gerçekleştirildi. Bu analizler esnasında FT-IR çekimleri $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ aralığında ve KBr peletler ile gerçekleştirildi. Termal analizler için ise Shimadzu 50 Diferansiyel Termal Analizör, Shimadzu 60 Diferansiyel Taramalı Kalorimetre ve Shimadzu 50 Termogravimetrik Analizör kullanıldı. Termal analizler hava atmosferinde $10 \text{ }^{\circ}\text{C/dak}$ ısıtma hızı ile gerçekleştirildi. Tüm numunelerde % 10'luk kütle kaybı değerleri ve 800°C ' de kalıntı değerleri TGA ile belirlendi. Ayrıca bozunma sıcaklıkları başlangıç değerleri ve termal bozunma sıcaklıkları DTA ile saptandı. Poliüretanlara ait Tg değerleri DSC ile belirlendi. DSC analizleri diğer termal analizlerden farklı olarak $5 \text{ }^{\circ}\text{C/dak}$ ısıtma hızında ve 50 ml/dk dinamik azot atmosferinde gerçekleştirildi. DSC kalibrasyonu indiyum ve çinko standartları ile yapıldı. DTA ve DSC analizlerinde referans olarak $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ kullanıldı. Örnek miktarı DTA ve TGA' da 10 mg , DSC analizlerinde ise 5 mg olarak alındı. Elektrokimyasal ölçümler Iviumstat marka potansiyostat cihazı ile gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan diğer cihazlar ve markaları ise şöyledir; pH metre (Mettler Toledo / Çin), Su sirkülatörü (Grant / İngiltere), Manyetik karıştırıcılı ısıtıcı (Heidolph / Almanya), Homojenizatör, Terazî (Shimadzu / Japonya), Buzdolabı (Ariston), Mikro pipet seti (Rainin / USA), Platin çalışma elektrodu (Basi / USA), Platin karşıt elektrot (Basi / USA), Ag/AgCl referans elektrot (Basi / USA),

3.3. Yöntem

3.3.1. Polimerlerin hazırlanması

3.3.1.1. Reaktiflerin saflaştırılması

Tez kapsamında kullanılan reaktifler özellikle % 99 saflıkta tercih edildi. Aksi takdirde reaktiflerde bulunan safsızlıklar gerçekleştirilen polimerlerin sentezi sırasında bozucu etkiler oluşturabilir. Genellikle toz reaktiflerin kurutulması sırasında toz reaktifler $120\text{-}125 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat vakum etüvünde tutuldu ve sürekli desikatör içinde muhafaza edildi. Özellikle diizosiyanat yapıları neme karşı oldukça

hassastır ve havanın oksijeni ile katalitik etkilenecek, polimerize olur. Bu nedenle desikatörde ve argon atmosferinde muhafaza edildi. Sentez öncesi ve sentez sırasında argon atmosferinde tutuldu.

THF, DMF gibi çözügenler CaO üzerinde kurutuldu ve moleküler elek ile muhafaza edildi.

3.3.1.2. Polimerler için genel testler

Polimerler DTA, DSC, TGA, FTIR, X-Ray ve GPC ölçümlerinden sonra diğer fizikokimyasal testler olan; yoğunluk ve çözünürlük testleri yapıldı. Poliüretan türü polimerler, zincirler arası kuvvetli ikincil etkileşimlere sahip oldukları için kimyasallara ve çözügenlere karşı dayanıklıdır ve çözünmezler. Bu nedenle polimerler üzerine yapılan pek çok çalışma polimer zinciri üzerine çözünürlüğü artırıcı gruplar takmak ve genel organik çözücülerde çözünebilen polimerlerin sentez edilmesi üzerine odaklanmıştır.

- 2-metil-1-pirolidon (NMP)
- *N,N*-dimetilasetamit (DMAc)
- Dimetilsülfoksit (DMSO)
- *N,N*-Dimetilformamit (DMF)
- Tetrahidrofuran (THF)
- Toluen
- Sülfürik asit (H₂SO₄)
- Aseton

Bu çalışma sırasında çözügen olarak, NMP, DMAc, DMSO, DMF, THF ve H₂SO₄ kullanıldı. Önce elde edilen polimerden 0,2 g tartıldı ve 10 mL istenen çözügende oda sıcaklığında çözünürlüğü kontrol edildi. Eğer çözünüyorsa (++) şeklinde işaretlendi. Çözünme yoksa (- -) şeklinde işaretlendi. Çözünme olmadığı

durumlarda sıcaklık artırılarak sıcakta çözünmenin olup olmadığı denendi. Eğer sıcakta çözünme varsa (+ -) şeklinde işaretlendi.

Sentezi gerçekleştirilen poliüretanların yoğunlukları ise farklı derişimlerde NaCl çözeltilerinde yüzdürme metodu kullanılarak belirlendi.

3.3.1.3. Poliüretanların sentezi

Tez kapsamında elektrot yüzeylerinin modifikasyonu için farklı oranlarda sakkarit içeren poliüretanlar hazırlanmıştır. Bu sentez çalışmalarında çözelti polimerizasyon tekniğı uygulanmış olup, -ol kaynağı olarak farklı oranlarda mono ve di sakkaritler ve bir triol yapısında olan gliserol, etilen glikol yanında kullanılmışlardır. Genel olarak sakkarit:gliserol:etilen glikol 1:1:98, 3:1:96, 5:1:94 ve 10:1:89 olarak tercih edilmiş olup, tüm sentezlerde etilen glikol ana -ol kaynağı olarak yumuşak segmentin sağlanması için kullanılmıştır. Sentezler sırasında çözgen olarak THF:DMF (9:1) karışımı kullanılmıştır.

Poliüretan sentez sistemi olarak bir gaz girişı, soğutucu ve ekleme hunisi ile dizayn edilmiş üç boyunlu balon kullanılmıştır. Yukarıda verilen oranlarda hazırlanan sakkarit:gliserol:etilen glikol karışımı öncelikle 30 mL THF:DMF (9:1) karışımı içerisinde argon atmosferinde çözülmüştür. Ol karışımı ile eş molar olacak şekilde 4,4-difenilmetan diizosiyanat (MDI) 20 mL çözgen karışımında çözülmüş olarak damla damla sisteme ilave edildi. Reaksiyon karışımı 12 saat 90°C’de refluks edilmiştir. Reaksiyon süresi sonunda soğutularak oda sıcaklığına getirilen polimerler, vakum altında çözgenlerinden uzaklaştırılarak elde edilmiştir.

Gliserol içermeyen maltoz temelli polimerlerin sentezinde ise 0,05 mol 4,4-difenilmetan diizosiyanat ve 0,025 mol etilen glikol (EG), dimetilsülfoksit içerisinde çözülmüştür. Bütün çözelti öncü polimerlerin oluşması için 2,5 saat 90 °C’de ısıtılmıştır. Daha sonra öncü polimerlerin içerisine 0,025 mol 1,2-etandiol ve çeşitli oranlarda maltoz (%1, %3, %5, %10) eklenmiş ve 90 °C’de 10 dakika hızlıca karıştırılmıştır. Tepkimenin tamamlanması için 3 saat oda sıcaklığında karıştırmaya devam edilmiştir. DMSO içerisindeki son poliüretan derişimi ağırlıkça %30 olmuştur. Reaksiyon süresi sonunda poliüretan polimerler 70 °C’de çözgenler uzaklaştırılarak elde edilmiştir.

Reaksiyon takibi Fourier Transform Infrared (FTIR) spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon takibi sırasında özellikle izosiyanatlara karakteristik bir pik olan 2265 cm^{-1} frekansındaki serbest izosiyanat piki kullanılmıştır. Bu pikin zamanla azaldığı gözlenmiş ve tamamen yok olduğunda reaksiyon sonlandırılmıştır.

3.3.2. Örneklerin hazırlanması

Hazırlanan biyosensörlerle örnek uygulamaları yapılırken kullanılacak örneklerden, nitrit ve nitratın ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Bunun için homojenize edilmiş salam, sosis ve sucuk örneklerinden 20 gram alındı ve üzerlerine 40 mL saf su konuldu. Örnekler kaynar su banyosu içerisine yerleştirildi ve 1,5 saat kaynamaya bırakıldı. Ara ara buharlaşan suyun yerine saf su eklendi. 1,5 saat sonunda soğutulan örnekler önce kaba süzgeç kâğıdından süzüldü. Daha sonra süzüntüler $0,45\text{ }\mu\text{m}$ 'lik filtreden geçirildi. Süzüntüler 50 mL'lik balonjojeye alındı ve saf su ile son hacim 50 mL'ye tamamlandı. Böylece salam, sosis ve sucuk örneklerinin stok çözeltileri hazırlanmış oldu. Ayrıca biyosensörlerle ölçülmek üzere 3 tanede atık su örneği alındı. Atık su örnekleri, ölçüm öncesi $0,45\text{ }\mu\text{m}$ 'lik filtreden geçirilerek ortamda bulunabilecek partiküllerin uzaklaştırılması sağlandı.

3.3.3. Biyosensörlerin hazırlanması

Bu bölümde elektrot temizliği ve platin elektrot yüzeyine biyosensörün hazırlanması hakkında bilgi verilmiştir.

3.3.3.1. Platin elektrot yüzeyinin temizlenmesi

Çıplak platin elektrot yüzeyine biyosensör hazırlamadan önce elektrot yüzeyi temizleme kitiyle temizlendi. Bu amaç doğrultusunda platin elektrot alümina suspansiyonu ile cilalandı ve daha sonra distile su ile temizlendi. Eğer daha önce platin elektrot yüzeyinde biyosensör hazırlandıysa elektrot önce 1-metil-2-pirrolidon (NMP) çözeltisi içerisinde 2 dakika bekletildi. Daha sonra yumuşak bir peçete ile yüzeyindeki polimer silindi ve elektrot saf su ile yıkandı. Sonrasında elektrot alümina suspansiyonu ile temizlendi ve distile su ile tekrar yıkandı.

3.3.3.2. Hazırlanan farklı polimerlerle biyosensör hazırlanması

Farklı polimerlerle biyosensör hazırlama prosedürü Tablo 3.2’de verilmiştir.

İşlem Sırası	Uygulanan İşlem
1	Alümina solüsyonu ile temizlenen platin elektrot yüzeyine öncelikle fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde hazırlanmış Nitrat Redüktaz (NR) enzim çözeltisinden 0,5 U (5 µL) damlatıldı.
2	Enzim çözeltisinin platin elektrot yüzeyinde kuruması için 25±2 °C’de 30 dakika bekletildi.
3	Daha sonra yüzeye 2 µL (0,1g/mL) polimer damlatılarak enzimin üzeri kaplandı.
4	Polimerin kuruması için elektrot 25±2 °C’de 24 saat bekletildi.
5	24 saat sonunda, platin elektrot fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde ve +4 °C’de kullanılmak üzere saklandı.

Tablo 3.2. Biyosensörün hazırlama prosedürü.

3.3.4. Biyosensörün ölçüm prosedürü

	Uygulanan İşlem
1	Ölçüm hücresine sadece fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5; 0,1 M KCl) konuldu ve cihazın C3 hücresine yerleştirildi.
2	Hücre içerisine, biyosensörün hazırlandığı platin çalışma elektrodu, Ag/AgCl referans elektrodu ve platin tel karşıt elektrodu bağlandı.
3	300 rpm karıştırma hızıyla karıştırılan çözelti 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarandı ve bu yanıt taban akım olarak kaydedildi.
4	Ölçüm sonrası biyosensör, fosfat tamponu içerisinde (100 mM pH 7,5) 10 dakika bekletilerek rejenerasyon gerçekleştirildi.
5	Daha sonra yeni bir ölçüm hücresine, içerisinde belirli bir derişimde nitrit ve nitrat bulunan fosfat tamponu (100 mM pH 7,5) konuldu ve hücre cihazın C3 hücresine yerleştirildi.
6	Rejenere olan biyosensörün hazırlandığı platin çalışma elektrodu, referans elektrot ve karşıt elektrot hücreye bağlandı.
7	300 rpm karıştırma hızıyla karıştırılan çözelti 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarandı ve bu yanıt nitrit yanıtı olarak kaydedildi.
8	Ölçüm çözeltisinde, nitritin yükseltgenme potansiyeli olan +0,87 V civarında akım değerinde taban yanıtı göre bir artış görüldü ve bu artış ortamdaki nitrit derişimiyle doğru orantılı olarak değıştiği tespit edildi.
9	Bu ölçüm sırasında ortamda enzimin koenzimi bulunmadığından enzim aktivite göstermedi ve alınan yanıt sadece ortamda bulunan nitritten ileri geldi.
10	Ölçüm sonrası biyosensör, fosfat tamponu içerisinde (100 mM pH 7,5) 10 dakika bekletilerek rejenerasyon gerçekleştirildi.
11	Daha sonra 5. adımda hazırlanan çözeltiyle aynı miktarda nitrit ve nitrat içeren yeni bir ölçüm çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti ayrıca enzimin koenzimi olan NADPH'dan da 0,25 mM içerdi. Bu çözelti cihazın C3 hücresine yerleştirildi.
12	Elektrot bağlantıları yapılırken önceki ölçümlerden farklı olarak biyosensör ölçüm çözeltisine daldırıldıktan sonra kronometre ile süre başlatıldı ve tam 2. dakikada 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile ölçüm çözeltisi tarandı ve kaydedildi. Ölçüm esnasında çözelti magnet ile 300 rpm'de karıştırıldı.
13	Ortamda koenzim bulunduğu için elektrot yüzeyine tutturulan enzim aktif hale geldi ve substratı olan nitratları nitrite çevirdi. Böylece platin elektrot yüzeyinde ki nitrit yoğunluğunda önceye göre bir artma oldu ve bu artış +0,87 V civarında okunan akım değerini de arttırdı. Akım değerindeki artış ortamdaki nitrat derişimiyle doğru orantılı olarak değışti.

Tablo 3.3. Biyosensörün ölçüm prosedürü.

3.4. Potansiyel Belirleme Çalışmaları

Bu amaç doğrultusunda ölçüm ortamında var olan veya sonradan oluşan nitrit, nitrat, NADP^+ ve NADPH için potansiyel taraması yapıldı.

3.4.1. Nitrit için yükseltgenme potansiyelinin belirlenmesi

Nitrit'in yükseltgenme potansiyelinin belirlenmesine yönelik hem Dönüşümlü Voltametri (CV) hem de Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV) tekniğiyle ölçümler gerçekleştirildi. Bütün ölçümler çıplak platin elektrot ile 25 ± 2 °C'de, 300 rpm karıştırma hızında ve fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde yapıldı. Ölçüm çözeltisinde ki son nitrit derişimleri sırasıyla 40, 20 ve 5 mM olacak şekilde fosfat tamponuyla (100 mM, pH 7,5) çözeltiler hazırlandı. Her bir çözeltiden 7,5 mL konulan ölçüm hücreleri tek tek cihazın C3 hücresine yerleştirildi ve -1 V - +1 V aralığında CV tekniği ile tarandı ve kaydedildi. Ayrıca taban akımı belirlemek için sadece fosfat tamponunun (100 mM, pH 7,5) bulunduğu ölçüm çözeltisi de aynı potansiyeller arasında CV tekniği ile tarandı ve kaydedildi. Artan nitrit derişimine karşılık akımdaki değişimler incelendi ve nitritin yükseltgenme potansiyeline karar verildi.

CV tekniği ile belirlenen nitritin yükseltgenme potansiyeli, bir kez de tez deneylerinin yapılacağı DPV tekniği ile incelendi. Ölçümler çıplak platin elektrot ile 25 ± 2 °C'de, 300 rpm karıştırma hızında ve fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde yapıldı. Ölçüm hücresinde 25 mM nitrit olacak şekilde fosfat tamponuyla (100 mM, pH 7,5) hazırlanan çözelti C3 hücresine yerleştirildi ve 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarandı ve sonuç kaydedildi. Daha sonra taban akımı belirlemek için, sadece fosfat tamponunu (100 mM, pH 7,5) içeren çözelti C3 hücresine yerleştirildi ve aynı potansiyel aralığında DPV tekniği ile tarandı ve sonuç kaydedildi. Yapılan DPV ölçümü sonucunda da CV ile belirlenen aynı potansiyelde akımda değişim olduğu görüldü.

3.4.2. Nitrat için potansiyel taraması

Nitrit için yükseltgenme potansiyeli belirlendikten sonra nitrat için potansiyel taraması yapıldı. Nitrit ile aynı potansiyelde nitratında herhangi bir yanıt verip vermediği incelendi. Ölçümler çıplak platin elektrot ile 25 ± 2 °C’de, 300 rpm karıştırma hızında ve fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde yapıldı. Ölçümler DPV tekniği ile tez süresince taranacak olan 0 V - +1 V aralığında alındı. Bu amaç doğrultusunda ölçüm hücresinde 25 mM nitrat olacak şekilde fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) ile ölçüm çözeltisi hazırlandı. Çözelti C3 hücresine yerleştirildi ve 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarandı ve sonuç kaydedildi. Ölçüm sonucu daha önce alınan taban akım ve nitrit ölçümü ile karşılaştırıldı.

3.4.3. Koenzim (NADPH) için potansiyel taraması

Biyoaktif tabakada immobilize halde bulunan NR enziminin koenzimi olan NADPH için potansiyel taraması yapıldı. Ölçümler çıplak platin elektrot ile 25 ± 2 °C’de, 300 rpm karıştırma hızında ve fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde yapıldı. Ölçüm hücresine, fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde hazırlanmış 0,5 mM NADPH çözeltisi konuldu. Çözelti C3 hücresine yerleştirildi ve 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarandı ve sonuç kaydedildi. Ölçüm sonucu daha önce alınan taban akım ve nitrit ölçümü ile karşılaştırıldı.

3.4.4. NADP^+ için potansiyel taraması

Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan NADP^+ için potansiyel taraması yapıldı. Ölçümler çıplak platin elektrot ile 25 ± 2 °C’de, 300 rpm karıştırma hızında ve fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde yapıldı. Ölçüm hücresine, fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde hazırlanmış 0,5 mM NADP^+ çözeltisi konuldu. Çözelti C3 hücresine yerleştirildi ve 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarandı ve sonuç kaydedildi. Ölçüm sonucu daha önce alınan taban akım ve nitrit ölçümü ile karşılaştırıldı.

3.4.5. Ölçüm çözeltisinde bulunan nitrat ve koenzimin nitrit yanıtına etkisi

Ölçüm çözeltisi içerisinde nitrat ve koenzim varken 25 mM nitrit için ölçümler alınarak ölçüm sonuçları üzerine bu türlerin etkisi incelendi. Ölçümler çıplak platin elektrot ile 25 ± 2 °C’de, 300 rpm karıştırma hızında ve fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde yapıldı. Ölçüm çözeltisi içerisinde ilk olarak sadece 25 mM nitrit varken, ikinci olarak 25 mM nitrit ve 25 mM nitrat varken ve üçüncü olarakta 25 mM nitrit, 25 mM nitrat ve 0,5 mM NADPH varken 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarandı ve sonuçlar kaydedildi.

3.5. Çıplak Platin Elektrot ile Nitrit Tayin Aralığının Belirlenmesi

Temizlenmiş çıplak platin elektrot ile nitrit tayin aralığının belirlenmesi amacıyla 0,1 mM ile 150 mM arasında değişen nitrit derişimlerin de ölçümler gerçekleştirildi. Bütün ölçümler 25 ± 2 °C’de, 300 rpm karıştırma hızında ve fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde yapıldı. Ölçülmek istenen derişimdeki nitrit çözeltileri fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde hazırlandı ve C3 hücresi içerisine yerleştirildi. Daha sonra her çözelti 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarandı ve sonuçlar kaydedildi. Ayrıca taban akımı belirlemek için sadece fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içeren bir çözelti aynı potansiyeller arasında tarandı. Her ölçüm sonrasında platin elektrot yüzeyi temizlendi ve elektrot bir sonraki ölçüme hazır hale getirildi. +0,87 V’luk potansiyelde taban yanıtı göre meydana gelen akımdaki derişimler hesaplandı. Bu veriler doğrultusunda nitrit derişimine karşılık akımdaki derişimler grafiğe geçirildi.

3.6. Platin Elektrodun Çeşitli Polimerlerle Kaplanması ve Nitrit Ölçümü

Bu amaç doğrultusunda platin elektrotlar dört farklı oranda sakkarit içeren fruktoz (PU-F-%1, PU-F-%3, PU-F-%5, PU-F-%10), maltoz (PU-M-%1, PU-M-%3, PU-M-%5, PU-M-%10), laktoz (PU-L-%1, PU-L-%3, PU-L-%5, PU-L-%10), ksiloz (PU-X-%1, PU-X-%3, PU-X-%5, PU-X-%10) ve gliserol içermeyen maltoz (PU-Maltoz-%1, PU-Maltoz-%3, PU-Maltoz-%5, PU-Maltoz-%10) temelli 5 farklı polimer serisi kullanılarak kaplandı.

Her bir polimer için, alümina solüsyonu ile cilalanarak temizlenen 3 adet platin elektrot yüzeyine sırasıyla 2, 3 ve 4 µL polimer damlatıldı ve 25±2 °C’de 24 saat kurumaya bırakıldı. 24 saat sonunda elektrotlar kullanılmak üzere fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde bekletildi.

3 farklı hacimde polimer damlatılarak hazırlanan her bir seri için 25 mM’lık nitrit çözeltisi için ölçümler alındı. Bütün ölçümler 25±2 °C’de, 300 rpm karıştırma hızında ve fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde yapıldı. Her bir elektrotla yapılacak nitrit ölçümü için, ölçüm hücresinde 25 mM nitrit olacak şekilde ölçüm çözeltisi hazırlandı ve bu çözelti C3 hücresine yerleştirildi. Çözelti 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarandı ve sonuçlar kaydedildi. Farklı hacimdeki polimerlerle kaplanmış her bir elektrot için elde edilen biyosensör cevapları karşılaştırıldı. Ayrıca her bir polimer serisi için, ölçümlerde alınan en yüksek akım değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer akım değerleri, en yüksek akım değeri ile oranlanarak bağıl değerler hesaplandı. Bu veriler doğrultusunda damlatılan polimer hacmi ile % biyosensör cevabı arasında grafikler çizildi.

3.7. Farklı Polimerlerle Hazırlanan Biyosensörlerin Optimizasyon Çalışmaları

Beş farklı polimer serisi (PU-F-%1, PU-M-%1, PU-L-%1, PU-X-%1 ve PU-Maltoz-%1) kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin optimizasyon çalışmaları doğrultusunda; nitrit ölçümü, nitrat için yanıt süresinin belirlenmesi, enzim miktarının biyosensör cevabına etkisi, koenzim miktarının biyosensör cevabına etkisi, optimumu pH ve optimum sıcaklığın belirlenmesi için ölçümler yapıldı.

3.7.1. Biyosensörlerin nitrat ölçümü için yanıt süresinin belirlenmesi

En yüksek nitrat yanıtının alındığı sürenin belirlenmesi amacıyla 0,5 U NR enzimi içeren ve 2 µL polimer damlatılarak hazırlanan biyosensörlerle 0,5; 1; 2 ve 3. dakikada 5 mM nitrat içeren çözeltiler için ölçümler alındı. Bütün ölçümler 25±2 °C’de, 100 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde, 0,5 mM nitrit varlığında ve 300 rpm karıştırma hızında yapıldı.

Nitrat ölçümü amacıyla yapılacak birinci ölçüm için 0,5 mM nitrit ve 5 mM nitrat olacak şekilde fosfat tamponunda (100 mM pH 7,5) ölçüm çözeltisi hazırlandı. Ölçüm çözeltisi C3 hücresi içerisine yerleştirildi ve 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarama yapıldı ve bu birinci ölçüm sonucu olarak kaydedildi. Ölçüm sonrasında biyosensör fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde 10 dakika bekletilerek rejenerasyon gerçekleştirildi.

İkinci ölçümde ise yine 0,5 mM nitrit ve 5 mM nitrat olacak şekilde yeni bir çözelti hazırlandı. Fakat bu çözelti birinci ölçümdeki çözeltiden farklı olarak 0,25 mM NADPH içermektedir. Hazırlanan ikinci ölçüm çözeltisi C3 hücresi içerisine yerleştirildi ve elektrot bağlantıları yapılırken, biyosensörün hazırlandığı platin çalışma elektrodu çözeltiye daldırıldığı an kronometreyle süre başlatıldı. Tam 0,5. dakikada 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarama yapıldı ve bu da ikinci ölçüm sonucu olarak kaydedildi.

Yapılan ölçümlerde birinci ölçüm için elde edilen akım değeri sadece ortamdaki 0,5 mM nitritten kaynaklanan değerdir. İkinci ölçüm için okunan değer ise hem ortamda var olan nitritin, hem de ortamda koenzim bulunduğu için aktif hale gelen NR enziminin, nitratlardan nitrit oluşturmaya ile elektrot yüzeyinde artan nitrit yoğunluğundan kaynaklanan toplam bir yanıttır. İki ölçüm arasındaki akım farkı ise sadece enzim tarafından oluşturulan nitritlerden ileri gelmektedir.

Farklı polimerlerle hazırlanan biyosensörlerle aynı şekilde 1, 2 ve 3. dakikalarda da ölçümler gerçekleştirildi. Biyosensörlerin yanıt süresinin belirlenmesi amacıyla farklı dakikalarda gerçekleştirilen birinci ve ikinci ölçüm arasındaki akım farkları alındı. Farklı dakikalar için elde edilen biyosensör cevaplarından en yüksek akım değeri farkı 100 olarak kabul edildi ve diğer akım değerleri, en yüksek akım değeri ile oranlanarak bağıl değerler hesaplandı. Bu veriler doğrultusunda zamana bağlı % biyosensör cevabına ilişkin grafikler çizildi.

3.7.2. Enzim miktarının farklı polimerlerle hazırlanan biyosensör cevaplarına etkisi

Biyoaktif tabakadaki polimer miktarları sabit tutularak NR enziminin değişen miktarları ile farklı biyosensörler hazırlandı. Her bir polimer serisi için, temizlenmiş 3 adet platin elektrot yüzeyine sırasıyla 2,5 µL (0,25 U), 5 µL (0,5 U) ve 10 µL (1U) NR enzim çözeltisi damlatılarak hazırlanan üç farklı biyosensörle hem nitrit tayini hem de nitrat tayini yapıldı ve enzim miktarlarının biyosensör cevabına etkisi incelendi.

İlk olarak hazırlanan biyosensörlerle 0,25 mM ile 150 mM arasında değişen nitrit derişimlerin de ölçümler gerçekleştirildi. Bütün ölçümler 25 ± 2 °C'de, 100 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde, 1 mM nitrat varlığında ve 300 rpm karıştırma hızında yapıldı. İstenilen nitrit derişimine karşılık gelen ve 1 mM nitrat içeren ölçüm çözeltisi hazırlandı. Ölçüm çözeltisi C3 hücresi içerisine yerleştirildi ve 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarama yapıldı ve sonuçlar kaydedildi. Ayrıca taban akımı belirlemek için sadece 1 mM nitrat içeren fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) için aynı potansiyeller arasında tarama yapıldı. Her ölçüm sonrasında biyosensör fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde 10 dakika bekletilerek rejenerasyon gerçekleştirildi. +0,87 V' luk potansiyelde taban akımına göre meydana gelen akımdaki değişimler hesaplandı. Bu veriler doğrultusunda nitrit derişimine karşılık akımdaki değişimler grafiğe geçirildi.

İkinci olarak hazırlanan biyosensörlerle 0,5 mM ile 15 mM arasında değişen nitrat derişimlerin de ölçümler gerçekleştirildi. Bütün ölçümler 25 ± 2 °C'de, 100 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde, 0,5 mM nitrit varlığında ve 300 rpm karıştırma hızında yapıldı. Ölçülecek her nitrat derişimi için istenilen derişime karşılık gelen ve 0,5 mM nitrit içeren ölçüm çözeltisi hazırlandı. Daha sonra ölçüm çözeltisi C3 hücresi içerisine yerleştirildi ve 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarama yapıldı ve sonuçlar kaydedildi. Ölçüm sonrasında biyosensörler fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde 10 dakika bekletilerek rejenerasyon gerçekleştirildi.

Nitrat tayini için yapılan ikinci ölçümde ise yukarıda hazırlanan çözeltiyle aynı derişimde nitrit ve nitrat içeren yeni bir ölçüm çözeltisi hazırlandı. Bu ölçüm çözeltisinde yukarıdakinden farklı olarak birde ortama 0,25 mM NADPH eklendi.

Ölçüm çözeltisi C3 hücresi içerisine yerleştirildi ve elektrot bağlantıları yapılırken, biyosensörün hazırlandığı platin çalışma elektrodu çözeltiye daldırıldığı an kronometreyle süre başlatıldı. Tam 2. dakikada, 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarama yapıldı ve sonuç kaydedildi. Bu ölçümde ortamda koenzim olduğu için enzim aktif hale geldi ve nitratları nitrite çevirdi. Böylece biyoaktif tabakadaki ve dolayısıyla elektrot yüzeyindeki nitrit yoğunluğu artmış oldu ve +0,87 V' luk potansiyelde birinci ölçümdeki akıma göre bir artış meydana geldi. Bu veriler doğrultusunda, farklı polimer serisi için farklı miktardaki enzimlerle hazırlanan biyosensörler ile gerçekleştirilen ölçümlerden elde edilen akımdaki artışlar nitrat derişimine karşılık grafiğe geçirildi.

3.7.3. Koenzim miktarının farklı polimerlerle hazırlanan biyosensör cevaplarına etkisi

Koenzim miktarının farklı polimerlerle hazırlanan ve 0,5 U NR enzimi içeren biyosensör cevaplarına etkisini incelemek amacıyla üç farklı koenzim derişimi için 0,5 mM ile 15 mM arasında değişen nitrat derişimlerinde ölçümler yapıldı.

Bütün ölçümler 25 ± 2 °C'de, 100 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde, 0,5 mM nitrit varlığında ve 300 rpm karıştırma hızında yapıldı. Ölçülecek nitrat derişimine karşılık gelen ve 0,5 mM nitrit içeren ölçüm çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu ilk ölçüm çözeltisine enzimin koenzimi eklenmedi. Daha sonra ölçüm çözeltisi C3 hücresine yerleştirildi ve 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarama yapıldı ve sonuçlar kaydedildi. Bu ölçüm sonrasında biyosensör fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde 10 dakika bekletilerek rejenerasyon gerçekleştirildi.

İkinci ölçümde ise yukarıdaki çözeltiyle aynı derişimde nitrit ve nitrat içeren yeni bir ölçüm çözeltisi hazırlandı. Bu ölçüm çözeltisinde yukarıdakinden farklı olarak birde ortama 0,25 mM NADPH eklendi. Ölçüm çözeltisi C3 hücresi içerisine yerleştirildi ve elektrot bağlantıları yapılırken, biyosensörün hazırlandığı platin çalışma elektrodu çözeltiye daldırıldığı an kronometreyle süre başlatıldı. Tam 2. dakikada 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarama yapıldı ve sonuç kaydedildi. Ortamda bulunan koenzim enzimin aktifleşmesine ve nitratları nitrite çevrilmesine neden olmuştur. Bunun sonucunda biyoaktif tabakadaki nitrit yoğunluğu artmış oldu ve +0,87 V'luk potansiyelde birinci ölçümdeki akıma göre bir artış meydana geldi.

Bu veriler doğrultusunda nitrat derişimine karşılık akımdaki artışlar grafiğe geçirildi. Her ölçüm sonrasında biyosensör fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde 10 dakika bekletilerek rejenerasyon gerçekleştirildi.

Ortamda 0,25 mM NADPH varken yapılan 0,5 mM ve 15 mM arasındaki nitrat ölçümleri aynı şekilde bir de 0,125 mM NADPH ve 0,5 mM NADPH varken de gerçekleştirildi. Her bir NADPH derişimi için elde edilen biyosensör cevapları nitrat derişime karşılık grafiğe geçirilerek koenzim miktarının biyosensör cevabına etkisi incelendi.

3.7.4. Biyosensörlerin optimum pH değerinin belirlenmesi

Farklı polimerlerle kaplanmış 0,5 U NR enzimi içeren biyosensörlerin optimum pH'sını belirlemek amacıyla 100 mM pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 ve 8,5 fosfat tamponlarında 5 mM'lık nitrat derişimi için ölçümler alındı. Hazırlanan biyosensörlerle nitrat tayini yapılırken bütün ölçümler 25 ± 2 °C'de, 0,5 mM nitrit varlığında ve 300 rpm karıştırma hızında yapıldı. Birinci ölçümde hangi pH için ölçüm alınacaksa, o pH'da ki fosfat tamponu içerisinde ölçüm çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti 5 mM nitrat ve 0,5 mM nitrit içerdi. Ölçüm çözeltisi C3 hücresine yerleştirildi ve 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarama yapıldı ve sonuçlar kaydedildi. Bu ölçüm sonrasında biyosensör fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde 10 dakika bekletilerek rejenerasyon gerçekleştirildi. İkinci ölçümde ise yukarıda hazırlanan çözeltiyle aynı derişimde nitrit ve nitrat içeren yeni bir ölçüm çözeltisi hazırlandı. Bu ölçüm çözeltisinde yukarıdakinden farklı olarak birde ortama 0,25 mM NADPH eklendi. Ölçüm çözeltisi C3 hücresi içerisine yerleştirildi ve elektrot bağlantıları yapılırken, biyosensörün hazırlandığı platin çalışma elektrodu çözeltiye daldırıldığı an kronometreyle süre başlatıldı. Tam 2. dakikada 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarama yapıldı ve sonuç kaydedildi. +0,87 V'luk potansiyelde birinci ölçümdeki akıma göre meydana gelen artışlar hesaplandı. Farklı polimerlerle hazırlanan her bir biyosensör ile farklı pH'lar için elde edilen biyosensör cevaplarından en yüksek akım değeri farkı 100 olarak kabul edildi ve diğer akım değerleri, en yüksek akım değeri ile oranlanarak bağıl değerler hesaplandı. Bu veriler doğrultusunda her bir biyosensör için, pH ile % biyosensör cevabı arasında çizilen optimum pH grafiğinden çalışma tamponu belirlendi.

3.7.5. Biyosensörlerin optimum sıcaklığının belirlenmesi

Biyoaktif tabakasında 0,5 U NR enzimi içeren ve farklı polimerlerle hazırlanan biyosensörlerin optimum sıcaklığını belirlemek için 15 – 40 °C arasında ölçümler alındı. Hazırlanan biyosensörlerle farklı sıcaklıklarda 5 mM'lık nitrat derişimi için tayinler yapıldı. Bütün ölçümler 100 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde, 0,5 mM nitrit varlığında ve 300 rpm karıştırma hızında yapıldı. Birinci ölçümde çözelti 5 mM nitrat ve 0,5 mM nitrit içerdi. C3 hücresi içerisinde istenilen sıcaklığa getirilen ölçüm çözeltisi 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarandı ve sonuçlar kaydedildi. Bu ölçüm sonrasında biyosensör fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde 10 dakika bekletilerek rejenerasyon gerçekleştirildi. İkinci ölçümde ise yukarıda hazırlanan çözeltiyle aynı derişimde nitrit ve nitrat içeren yeni bir ölçüm çözeltisi hazırlandı. Bu ölçüm çözeltisinde yukarıdakinden farklı olarak birde ortama 0,25 mM NADPH eklendi. C3 hücresi içerisinde istenilen sıcaklığa getirilen ölçüm çözeltisine elektrot bağlantıları yapılırken, biyosensörün hazırlandığı platin çalışma elektrodu çözeltiye daldırıldığı an kronometreyle süre başlatıldı. Tam 2. dakikada 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarama yapıldı ve sonuç kaydedildi. +0,87 V'luk potansiyelde birinci ölçümdeki akıma göre meydana gelen artışlar hesaplandı. Farklı polimerlerle hazırlanan her bir biyosensör için farklı sıcaklıklarda elde edilen biyosensör cevaplarından en yüksek akım değeri farkı 100 olarak kabul edildi ve diğer akım değerleri, en yüksek akım değeri ile oranlanarak bağıl değerler hesaplandı. Bu veriler doğrultusunda her bir biyosensör için sıcaklık ile % biyosensör cevabı arasında çizilen grafikten optimum sıcaklıklar belirlendi.

3.8. Farklı Polimerler ile Hazırlanan Biyosensörlerin Karakterizasyon Çalışmaları

Optimizasyon çalışmalarından sonra enzim temelli biyosensörlerin karakterizasyon çalışmalarına geçildi. Bu amaç doğrultusunda farklı polimerler ile hazırlanan biyosensörlerin nitrit tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı, nitrat tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı, tekrarlanabilirlik, operasyonel kararlılık, girişim etkileri ve depo kararlılığına yönelik çalışmalar yapıldı.

3.8.1. Farklı polimerler ile hazırlanan biyosensörlerin nitrit tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Optimize edilen koşullarda farklı polimerler ile kaplanmış 0,5 U NR enzimi içeren biyosensörler ile 0,5 mM ile 150 mM arasında değişen nitrit derişimlerin de ölçümler gerçekleştirildi. Bütün ölçümler 25 ± 2 °C’de, 100 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde, 1 mM nitrat varlığında ve 300 rpm karıştırma hızında yapıldı. Ölçülecek derişime karşılık gelen oranlarda nitrit ve nitrat ile hazırlanan ölçüm çözeltisi C3 hücresi içerisine yerleştirildi. Daha sonra her çözelti için 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarama yapıldı ve sonuçlar kaydedildi. Her ölçüm sonrasında biyosensör fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde 10 dakika bekletilerek rejenerasyon gerçekleştirildi. Ayrıca taban akımı belirlemek için sadece 1 mM nitrat içeren fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) için aynı potansiyeller arasında tarama yapıldı. +0,87 V’luk potansiyelde taban akımına göre meydana gelen akımdaki derişimler hesaplandı. Bu veriler doğrultusunda farklı polimerlerle hazırlanan her bir biyosensör için nitrit derişimine karşılık akımdaki derişimler grafiğe geçirildi ve nitrit için doğrusal tayin aralığı belirlendi.

3.8.2. Farklı polimerler ile hazırlanan biyosensörlerin nitrat tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Beş farklı poliüretan temelli polimer kullanılarak hazırlanan ve 0,5 U NR enzimi içeren biyosensörler ile optimize edilen koşullarda 0,5 mM ile 15 mM arasında değişen nitrat derişimleri için ölçümler alındı. Bütün ölçümler 25 ± 2 °C’de, 100 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde, 0,5 mM nitrit varlığında ve 300 rpm karıştırma hızında yapıldı.

Birinci ölçüm için istenilen derişimde nitrat ve 0,5 mM nitrit içeren ölçüm çözeltisi C3 hücresi içerisine yerleştirildi. Daha sonra 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarama yapıldı ve sonuçlar kaydedildi. Bu ölçüm sonrasında biyosensör fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde 10 dakika bekletilerek rejenerasyon gerçekleştirildi.

İkinci ölçümde ise yukarıda hazırlanan çözeltiyle aynı derişimde nitrit ve nitrat içeren yeni bir ölçüm çözeltisi hazırlandı. Bu ölçüm çözeltisinde

yukarıdakinden farklı olarak birde ortama 0,25 mM NADPH eklendi. Ölçüm çözeltisi C3 hücresi içerisine yerleştirildi ve elektrot bağlantıları yapılırken, biyosensörün hazırlandığı platin çalışma elektrodu çözeltiye daldırıldığı anda kronometreyle süre başlatıldı. Tam 2. dakikada 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarama yapıldı ve sonuç kaydedildi. Ortamda enzimin aktivite için ihtiyaç duyduğu koenzim bulunduğu için enzim aktif hale geldi ve nitratları nitrite çevirdi. Böylece biyoaktif tabakadaki nitrit yoğunluğu artmış oldu ve +0,87 V'luk potansiyelde birinci ölçümdeki akıma göre bir artış meydana geldi. Bu veriler doğrultusunda, her bir biyosensör için nitrat derişimine karşılık akımdaki artışlar grafiğe geçirildi ve nitrat için doğrusal tayin aralığı belirlendi.

3.8.3. Biyosensörlerin nitrit ve nitrat ölçümü için tekrarlanabilirliği

Karakterizasyon çalışmalarından bir diğeri hazırlanan biyosensörlerle nitrit ve nitrat tayininde tekrarlanabilir sonuçlar alınıp alınmadığını test etmekte. Bu amaç doğrultusunda her bir polimer serisi için iki adet 0,5 U NR enzimi içeren biyosensör hazırlandı.

Bu biyosensörlerden bir tanesiyle 25 mM'lık nitrit çözeltisi için arka arkaya 10 adet ölçüm alındı. Bütün ölçümler 25 ± 2 °C'de, 100 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde, 1 mM nitrat varlığında ve 300 rpm karıştırma hızında yapıldı. Her seferinde 25 mM nitrit ve 1 mM nitrat içeren ölçüm çözeltisi C3 hücresine yerleştirildi ve 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarandı ve sonuç kaydedildi. Ayrıca taban akımı belirlemek için sadece 1 mM nitrat içeren fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) için aynı potansiyeller arasında tarama yapıldı. Her ölçüm sonrasında biyosensör fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde 10 dakika bekletilerek rejenerasyon gerçekleştirildi. Her ölçüm için taban akıma göre +0,87 V'luk potansiyelde meydana gelen artışlar hesaplandı. Bu akım farkına karşılık gelen nitrit derişimleri standart nitrit grafiğinden okunarak belirlendi. Her bir farklı polimer ile hazırlanan biyosensörle gerçekleştirilen 10 ölçüm için ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

Hazırlanan diğer biyosensörle bu sefer nitrat tayini için tekrarlanabilir sonuçlar alınıp alınmadığı araştırıldı. Bu amaç doğrultusunda 5 mM'lık nitrat derişimi için arka arkaya 10 tane biyosensör ölçümü yapıldı. Bütün ölçümler 100 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde, 0,5 mM nitrit varlığında ve 300 rpm karıştırma hızında yapıldı. Birinci ölçümde 0,5 mM nitrit ve 5 mM nitrat içeren ölçüm çözeltisi C3 hücresine yerleştirildi ve 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarandı ve sonuç kaydedildi. Her ölçüm sonrasında biyosensör fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde 10 dakika bekletilerek rejenerasyon gerçekleştirildi. İkinci ölçümde ise yukarıda hazırlanan çözeltiyle aynı derişimde nitrit ve nitrat içeren yeni bir ölçüm çözeltisi hazırlandı. Bu ölçüm çözeltisinde yukarıdakinden farklı olarak birde ortama 0,25 mM NADPH eklendi. Ölçüm çözeltisi C3 hücresi içerisine yerleştirildi ve elektrot bağlantıları yapılırken, biyosensörün hazırlandığı platin çalışma elektrodu çözeltiye daldırıldığı anda kronometreyle süre başlatıldı. Tam 2. dakikada 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarama yapıldı ve sonuç kaydedildi. +0,87 V'luk potansiyelde birinci ölçümdeki akıma göre meydana gelen artışlar hesaplandı. İki ölçüm arasındaki akım farkına karşılık gelen nitrat derişimleri standart nitrat grafiğinden okunarak hesaplandı. Beş farklı polimer ile hazırlanan biyosensörlerle gerçekleştirilen çalışmada her bir biyosensör için 10 nitrat ölçümü yapıldı. Ölçüm sonucunda ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

3.8.4. Biyosensörlerin operasyonel kararlılığı

Optimize edilen koşullarda, 0,5 U NR enzimi içeren ve beş farklı polimerden hazırlanan biyosensörler ile 5 mM'lık nitrat derişimi için 30 dakikada bir ölçümler alındı. Bütün ölçümler 25 ± 2 °C'de, 100 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde, 0,5 mM nitrit varlığında ve 300 rpm karıştırma hızında yapıldı. Birinci ölçümde 0,5 mM nitrit ve 5 mM nitrat içeren ölçüm çözeltisi C3 hücresine yerleştirildi ve 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarandı ve sonuç kaydedildi. Her ölçüm sonrasında biyosensör fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde 10 dakika bekletilerek rejenerasyon gerçekleştirildi. İkinci ölçümde ise yukarıda hazırlanan çözeltiyle aynı derişimde nitrit ve nitrat içeren yeni bir ölçüm çözeltisi hazırlandı. Bu ölçüm çözeltisinde yukarıdakinden farklı olarak birde ortama 0,25 mM NADPH eklendi. Ölçüm çözeltisi C3 hücresi içerisine yerleştirildi ve elektrot bağlantıları yapılırken,

biyosensörün hazırlandığı platin çalışma elektrodu çözeltiye daldırıldığı anda kronometreyle süre başlatıldı. Tam 2. dakikada 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarama yapıldı ve sonuç kaydedildi. +0,87 V'luk potansiyelde birinci ölçümdeki akıma göre meydana gelen artış hesaplandı. Her ölçüm sonrasında biyosensör fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde 25 dakika bekletilerek hem rejenerasyon gerçekleştirildi hem de bir sonraki ölçüm için bekletilmiş oldu. Biyosensörlerle alınan ilk ölçüm için hesaplanan biyosensör yanıtı 100 olarak kabul edildi ve diğer akım değerleri, en yüksek akım değeri ile oranlanarak bağıl değerler hesaplandı. Bu veriler doğrultusunda 6 saat boyunca yapılan ölçümlerde elde edilen biyosensör cevapları kıyaslandı.

3.8.5. Farklı polimerler ile hazırlanan biyosensörlerin girişim etkilerinin incelenmesi

Beş farklı polimerle hazırlanmış ve 0,5 U NR enzimi içeren biyosensörler ile ortamda farklı türler varken nitrit ve nitrat ölçümleri yapıldı. Bu amaç doğrultusunda yapılan ölçümlerde ortamda 1 mM olacak şekilde fruktoz, maltoz, sükroz, laktoz, glukoz, askorbik asit, oksalik asit ve üre çözeltileri kullanıldı.

Her bir biyosensör ile 25 mM'lık nitrit ölçümü için girişim etkileri incelendi. Bütün ölçümler 25 ± 2 °C'de, 100 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde, 1 mM nitrat varlığında ve 300 rpm karıştırma hızında yapıldı. Başlangıç nitrit ölçümü için 25 mM nitrit ve 1 mM nitrat içeren ölçüm çözeltisi C3 hücrelerine yerleştirildi ve 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarandı ve sonuç kaydedildi. Ayrıca taban akımı belirlemek için sadece 1 mM nitrat içeren fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) için aynı potansiyeller arasında tarama yapıldı. Taban akıma göre +0,87 V'luk potansiyelde meydana gelen artış hesaplandı. Daha sonra girişim etkisi incelenecek türler için aynı nitrit derişiminde ölçümler alındı. Ölçüm çözeltisine ilk ölçümden farklı olarak ortamda 1 mM olacak şekilde girişim etkisinin inceleneceği türden eklendi. Bu çözelti C3 hücrelerine yerleştirildi ve 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarandı ve sonuç kaydedildi. Taban akıma göre +0,87 V'luk potansiyelde meydana gelen artış hesaplandı. Girişim etkisi incelenecek her bir tür için bu ölçüm alındı. 25 mM'lık nitrit çözeltisi için elde edilen akım değeri 100 olarak kabul edildi ve girişim türleri için elde edilen diğer akım değerleri, en yüksek akım değeri ile oranlanarak bağıl

değerler hesaplandı. Her ölçüm sonrasında biyosensör fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde 10 dakika bekletilerek rejenerasyon gerçekleştirildi.

Girişim türlerinin nitrat ölçümüne etkisini incelemek için 5 mM'lık nitrat derişimleri için ölçümler alındı. Bütün ölçümler 25 ± 2 °C'de, 100 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde, 0,5 mM nitrit varlığında ve 300 rpm karıştırma hızında yapıldı. Birinci ölçümde 0,5 mM nitrit ve 5 mM nitrat içeren ölçüm çözeltisi C3 hücresine yerleştirildi ve 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarandı ve sonuç kaydedildi. Ölçüm sonrası biyosensör fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde 10 dakika bekletilerek rejenerasyon gerçekleştirildi. İkinci ölçümde ise yukarıda hazırlanan çözeltiyle aynı derişimde nitrit ve nitrat içeren yeni bir ölçüm çözeltisi hazırlandı. Bu ölçüm çözeltisinde yukarıdakinden farklı olarak birde ortama 0,25 mM NADPH eklendi. Ölçüm çözeltisi C3 hücresi içerisine yerleştirildi ve elektrot bağlantıları yapılırken, biyosensörün hazırlandığı platin çalışma elektrodu çözeltiye daldırıldığı anda kronometreyle süre başlatıldı. Tam 2. dakikada 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarama yapıldı ve sonuç kaydedildi. +0,87 V'luk potansiyelde birinci ölçümdeki akıma göre meydana gelen artış hesaplandı. Bu ölçüm için alınan biyosensör cevabı 100 olarak kabul edildi. Ölçüm sonrası biyosensör fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde 10 dakika bekletilerek rejenerasyonu gerçekleştirildi.

Daha sonra ölçüm ortamında 0,5 mM nitrit, 5 mM nitrat ve 1 mM olacak şekilde girişim türleri varken ölçümler alındı. Yapılan ölçümler sonucunda +0,87 V'luk potansiyeldeki akım artışları hesaplandı. İlk ölçümde nitrat için elde edilen akım değeri 100 olarak kabul edildi ve girişim türleri için elde edilen diğer akım değerleri, bu akım değeri ile oranlanarak bağıl değerler hesaplandı.

3.8.6. Biyosensörlerin depo kararlılığı

Depo kararlılığının belirlenmesi amacıyla 0,5 U NR enzimi içeren farklı polimerlerle kaplanmış biyosensörler ile 5 mM'lık nitrat derişimi için ölçümler yapıldı. Biyosensörlerin hazırlandığı gün yapılan ölçüm değeri 0. gün olarak alındı ve daha sonra her 3 günde bir aynı biyosensörle 5 mM'lık nitrat stokları için ölçümler alındı. Ölçüm yapılmadığı günlerde biyosensör fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde ve +4 °C'de saklandı. Bütün ölçümler 25 ± 2 °C'de, 100 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde, 0,5 mM nitrit varlığında ve 300 rpm karıştırma hızında

yapıldı. Birinci ölçümde 0,5 mM nitrit ve 5 mM nitrat içeren ölçüm çözeltisi C3 hücresine yerleştirildi ve 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarandı ve sonuç kaydedildi. Ölçüm sonrasında biyosensör fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde 10 dakika bekletilerek rejenerasyon gerçekleştirildi. İkinci ölçümde ise yukarıda hazırlanan çözeltiyle aynı derişimde nitrit ve nitrat içeren yeni bir ölçüm çözeltisi hazırlandı. Bu ölçüm çözeltisinde yukarıdakinden farklı olarak birde ortama 0,25 mM NADPH eklendi. Ölçüm çözeltisi C3 hücresi içerisine yerleştirildi ve elektrot bağlantıları yapılırken, biyosensörün hazırlandığı platin çalışma elektrodu çözeltiye daldırıldığı anda kronometreyle süre başlatıldı. Tam 2. dakikada 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarama yapıldı ve sonuç kaydedildi. +0,87 V'luk potansiyelde birinci ölçümdeki akıma göre meydana gelen artış hesaplandı. Biyosensörlerle alınan ilk ölçüm için hesaplanan akım değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer akım değerleri, en yüksek akım değeri ile oranlanarak bağıl değerler hesaplandı. Bu veriler doğrultusunda her bir biyosensör için 24 gün boyunca yapılan ölçümler sonucunda elde edilen biyosensör cevapları kıyaslandı.

3.9. Biyosensörlerle Örnek Uygulamaları

Stok çözeltileri hazırlanan 6 adet örnek içerisindeki nitrit ve nitrat derişimleri, öncelikle ölçüm kitleriyle ölçüldü ve stoklar içerisinde yer alan miktarları mM olarak hesaplandı. Daha sonra bu örnekler, beş farklı polimer ile hazırlanan biyosensörlerle ölçülerek her iki ölçüm sonucu arasında bir fark olup olmadığı incelendi.

İlk olarak biyosensörler ile nitrit tayini yapıldı. Bütün ölçümler 25 ± 2 °C'de, 100 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde, 1 mM nitrat, 0,5 mM nitrit varlığında ve 300 rpm karıştırma hızında yapıldı. Örneklerdeki nitrit derişimi bilinmediğinden, standart grafiği aralığına düşmesi için ölçüm ortamına 0,5 mM olacak şekilde standart nitrit çözeltisi eklendi. 1 mM nitrat ve 0,5 mM nitrit içeren ölçüm hücresine 1,5 mL tayini yapılacak örnekten konuldu ve son hacim fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) ile 7,5 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti C3 hücresine yerleştirildi ve 0 V - +1 V aralığında DPV tekniği ile tarandı ve sonuç kaydedildi. Ölçüm sonrasında biyosensör fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde 10 dakika bekletilerek rejenerasyon işlemi gerçekleştirildi. Ayrıca taban akımı belirlemek için 1 mM nitrat ve 0,5 mM nitrit içeren ölçüm hücresine 1,5 mL saf su konuldu ve son hacim fosfat

tamponu (100 mM, pH 7,5) ile 7,5 mL'ye tamamlandıktan sonra aynı potansiyeller arasında tarama yapıldı. Taban akıma göre +0,87 V'luk potansiyelde meydana gelen artış hesaplandı. Akımdaki artış değerine karşılık gelen nitrit derişimi standart grafikten okunduktan sonra gerekli seyreltmeler ve ortama katılan 0,5 mM nitrit dikkate alınarak stok çözeltinin nitrit derişimi hesaplandı. Ölçüm sonrasında biyosensör fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) içerisinde 10 dakika bekletilerek rejenerasyon işlemi gerçekleştirildi.

İkinci olarak aynı biyosensörle aynı örnekte nitrat tayini yapıldı. Bütün ölçümler 25 ± 2 °C'de, 100 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde, 1 mM nitrat, 0,5 mM nitrit varlığında ve 300 rpm karıştırma hızında yapıldı. Örneklerdeki nitrat derişimi bilinmediğinden, standart grafiğı aralığına düşmesi için ölçüm ortamına 1 mM olacak şekilde standart nitrat çözeltisi eklendi. 1 mM nitrat ve 0,5 mM nitrit içeren ölçüm hücresine 1,5 mL tayini yapılacak örnekten ve 0,25 mM olacak şekilde de NADPH çözeltisi ölçüm hücresine eklendi. Son hacim fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) ile 7,5 mL'ye tamamlandı. Ölçüm çözeltisi C3 hücresi içerisine yerleştirildi ve elektrot bağlantıları yapılırken, biyosensörün hazırlandığı platin çalışma elektrodu çözeltiye daldırıldığı anda kronometreyle süre başlatıldı. Tam 2. dakikada 0 V - +1 V aralığında DPV tekniğı ile tarama yapıldı ve sonuç kaydedildi. +0,87 V'luk potansiyelde birinci ölçümdeki nitrit akımına göre meydana gelen artış hesaplandı. Akımdaki artış değerine karşılık gelen nitrat derişimi standart grafikten okunduktan sonra gerekli seyreltmeler ve ortama katılan 1 mM nitrat dikkate alınarak stok çözeltinin nitrat derişimi hesaplandı.

Hazırlanan her bir biyosensör ile nitrit ve nitrat ölçümleri 3 kez tekrarlandı ve bu ölçümler için standart sapmalar belirlendi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Gerçekleştirilen çalışma kapsamında elektrot yüzeylerinde kimyasal olarak hazırlanmış poliüretan membranlar kullanılmıştır. Bu tür bir amaç için poliüretanların tercih edilmesinin nedeni, poliüretan yapısının farklı modifikasyonlar ile çeşitlendirmeye uygunluğu, kolay temizlenebilir olması, kolay uygulanabilir ve film haline getirilebilir olmasıdır. Ayrıca enzim taşıyıcı olarak kullanıldıklarında enzim aktivasyonuna engel olmaması ve sensör yanıtlarını etkileyen interferant türlerin girişimini engellemesinde oldukça önemlidir.

Poliüretanların genel olarak hazırlanmaları ve şekillendirilmeleri kolaydır ve bu nedenle tıbbi uygulamalarda dahil olmak üzere pek çok alanda kullanıma sahiptirler. Poliüretanlar tıp alanında plastik materyaller olarak yoğun bir şekilde uygulama alanı bulmaktadır. Özellikle yüksek biyouyumluluğu ve dayanıklılığı nedeniyle yüksek direnç gerektiren elastik özellikli biyomateryal olarak yaygın kullanıma sahiptirler. Bugün poliüretanlar suni organlar, beslenme hortumları, kalp-damar sistemi için balonlar, diyaliz parçaları, non-alerjik eldivenler, implantlar, stentler ve yara iyileştirici örtülerinin üretilmesinde polimerik biyomalzemeler olarak öne çıkmaktadırlar.

Poliüretan sentezindeki çeşitlilik, yapıdaki poliollerin değiştirilmesi ya da modifikasyonu ile sağlanmaktadır. Biyouyumlu poliüretanlar elde etmek için özellikle doğal polioller kullanmak önemli avantajlar sağlamaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda doğal polioller kaynağı olarak karbohidratları içeren poliüretanların hazırlanması hâlihazırda çalışılan bir alandır. İlgili çalışma kapsamında karbohidrat içeren poliüretan polimerler sentezlenmiş ve yapısal olarak karakterize edilmiştir.

Çalışma farklı yüzeylere tutunma özelliği güçlü sakkarit üniteleri taşıyan poliüretanların sentez edilmesi ve uygulanması olarak iki kısımdan oluşmaktadır. Tez kapsamında diizosiyanat yapısı olarak 4,4-diizosiyanatdifenilmetan ve ol kaynağı olarak ise etilen glikol, mono yada disakkaritler ve gliserolden oluşan karma bir kaynak kullanılmıştır. Etilen glikol ve gliserol miktarı sabit tutularak sakkarit miktarları arttırılmış ve poliüretan yapısında bir çeşitlilik sağlanmıştır. Özellikle sakkarit miktarındaki artmaya bağlı olarak polimer yapısındaki çapraz bağlanma ve

geçirgenlik özellikleri ayarlanmıştır. Sentez sırasında gliserol, polimer yapısının mekanik olarak kuvvetlendirilmesi ve bu polimerlerden hazırlanacak olan sensörlerin uzun süreli kullanımlarına olanak sağlanması için kullanılmıştır. Üçlü bir ol kaynağından hazırlanan poliüretan yapıları literatür açısından bir ilk niteliğinde olup film özelliği ve kararlılık açılarından oldukça ileri özellikler taşımaktadır.

Tez kapsamında gerçekleştirilen sentezleri kullanılan monomerlerin çeşitliliği açısından beş kısımdan oluşmaktadır. Elde edilen ürünlerin yapısal karakterizasyonları da bu dört sınıfa bağlı olarak gerçekleştirilmiş ve yorumlanmıştır. Sonuç olarak her bir polimerik yapının yapısal karakterizasyonu, saflığı ve hedeflenen yapının doğrulanması sırası ile FTIR, DTA, TGA ve DSC teknikleri ile gerçekleştirilmiştir.

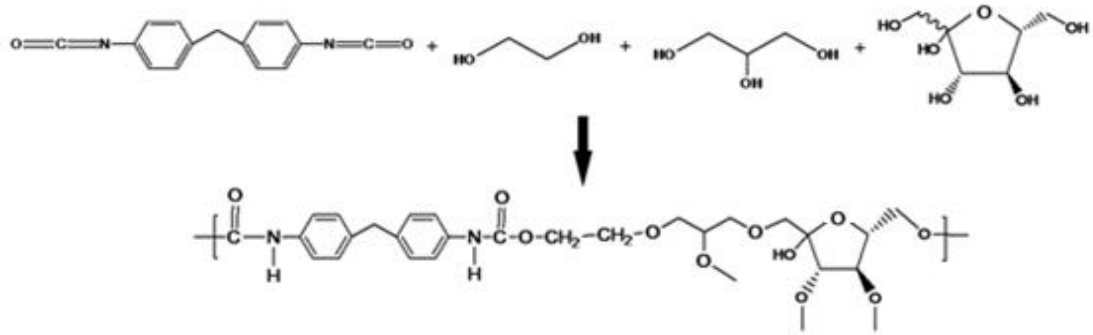
4.1. Poliüretan Yapılarının Karakterizasyonu

Günümüz teknolojileri arasında poliüretan teknolojisi oldukça önemli bir teknoloji olup izolasyon malzemesinden suni derilere, ayakkabı tabanlarından, viskoelastik malzeme ve süngerlere kadar pek çok alanda ticari olarak önem arz etmektedir. Tüm bu sektörlerin hepsinde temel olarak tek bir diizosiyanat yapısı ortaya çıkmaktadır ki o da kolay ulaşılır ve kolay sentezlenebilir bir monomer olarak ön plana çıkan 4,4'-diizosiyanodifenilmetandır. Bu nedenle tez kapsamında hazırlanan sensörlerin uygulanabilir ve teknolojiye aktarılabilir olması için öncelikle farklı -ol kaynakları yanında 4,4'-diizosiyanodifenilmetan kullanılarak poliüretan sentezleri denenmiştir. Gerçekleştirilen tez kapsamında kullanılan sakkarit miktarının polimerik membranların geçirgenlik miktarına etkisi ve sensör yanıtlarının duyarlılık ve doğruluğunun polimer morfolojisi üzerinden yorumlanması sağlanmıştır.

4.1.1. Fruktoz temelli poliüretanların karakterizasyonu

Tez kapsamında farklı sakkarit yapılarının polimer zincir esnekliği, polimer çapraz bağlanma yoğunluğu ve yüzey adezyonu açısından polimer özelliklerine etkisi incelenmiştir. Bu kapsamda fruktoz ve ksiloz olmak üzere iki adet mono sakkarit ve maltoz ve laktoz olmak üzere iki adet disakkarit kullanılmıştır.

Fruktoz kullanılarak hazırlanan poliüretan yapıları ve genel sentez şeması Şekil 4.1’de verilmiştir. İlgili şekil incelendiğinde fruktoz yapısı üzerinde beş farklı –OH grubu olduğu görülmektedir. Bu nedenle fruktoz kullanılarak hazırlanan polimerlerin çapraz bağlanma oranlarının yüksek olduğu ve polimerik yapının buna bağlı olarak oldukça sert bir yapıda olduğu görülmektedir. Bununla birlikte artan –OH grubu sayısı polimer yapısında serbest izosiyanat grubu bulunma olasılığını da ortadan kaldırmaktadır. Bu sayede polimerin biyouyumluluğu artmakta ve ileri sensör uygulamalarında invivo olarak çalışan ve eş zamanlı okuma yapabilen iğne elektrotların tasarımına olanak sağlamaktadır.

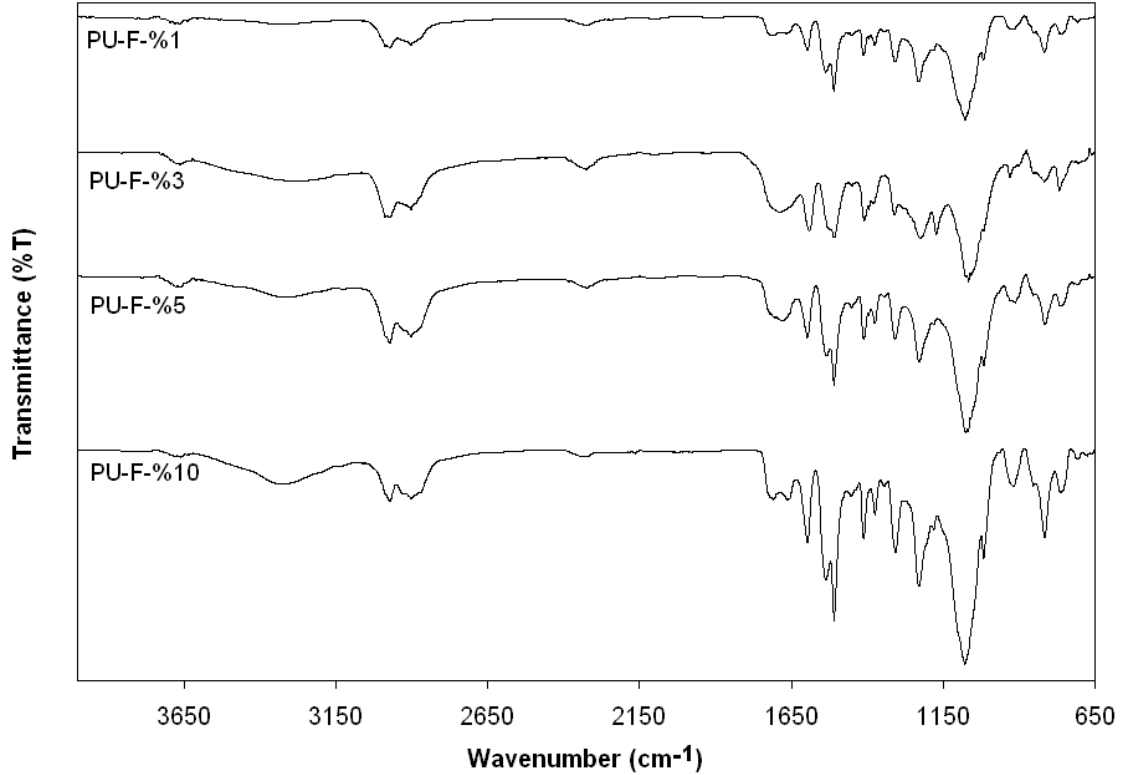


Şekil 4.1. Fruktoz temelli poliüretanların sentez şeması.

Fruktoz ünitesi içeren poliüretan yapılarına ait FTIR spektrumları Şekil 4.2’de verilmiştir. Bu spektrum incelendiğinde yapısal olarak hem aromatik yapıları diizosiyanatlar hem de fruktoz gruplarından kaynaklanan pikleri diol piklerinin yanında sıkça görmekteyiz. Bu nedenle özellikle spektrumun 650-1750 cm^{-1} arasında pek çok pik bulunmaktadır. Yaklaşık 1715 cm^{-1} ’de ikili bir karbonil piki görülmektedir. Bu piklerden 1718 cm^{-1} ’de üretan bağına ait karbonil pikini görüyoruz. Yine üretan bağı C-N titreşimi 1530 ve 1440 cm^{-1} ’de görülmekte ve yapıdaki üretan bağına ispatlamaktadır. 1274 cm^{-1} ’de C-O-C eterik pikini görmekteyiz. Bu pik poliol bağlantı noktasından kaynaklanmaktadır. Özellikle izosiyanat yapısında ise 825 cm^{-1} ’de aromatik C-H gerilme titreşimi ve C=C alifatik karakterli alkenik piki 1220 cm^{-1} ’de görülmektedir. Ayrıca fruktoz ve gliserol grupları üzerinde yer alan, alifatik CH_2 grubu 2800-2900 cm^{-1} ’de üçlü bir pik grubu olarak beklenen yapıyı doğrulamaktadır. Tüm spektrumlarda genel olarak incelendiğinde 2285 cm^{-1} ’deki izosiyanat pikinin bulunmadığı açıkça görülmektedir.

Buradan sentez reaksiyonunun tamamen gerçekleştiği ve yüksek molekül ağırlıklı bir poliüretan yapısının sağlandığı anlaşılmaktadır.

Ayrıca polimer yapısındaki fruktoz miktarı arttıkça polimerlere ait FTIR spektrumlarında, 3322 cm^{-1} 'de bulunan N-H gerilme titreşimi, $2964\text{-}2868\text{ cm}^{-1}$ 'de alifatik C-H gerilme titreşimi, ve 1700 cm^{-1} 'de ise C=O gerilme titreşimi dikkat çekmektedir.



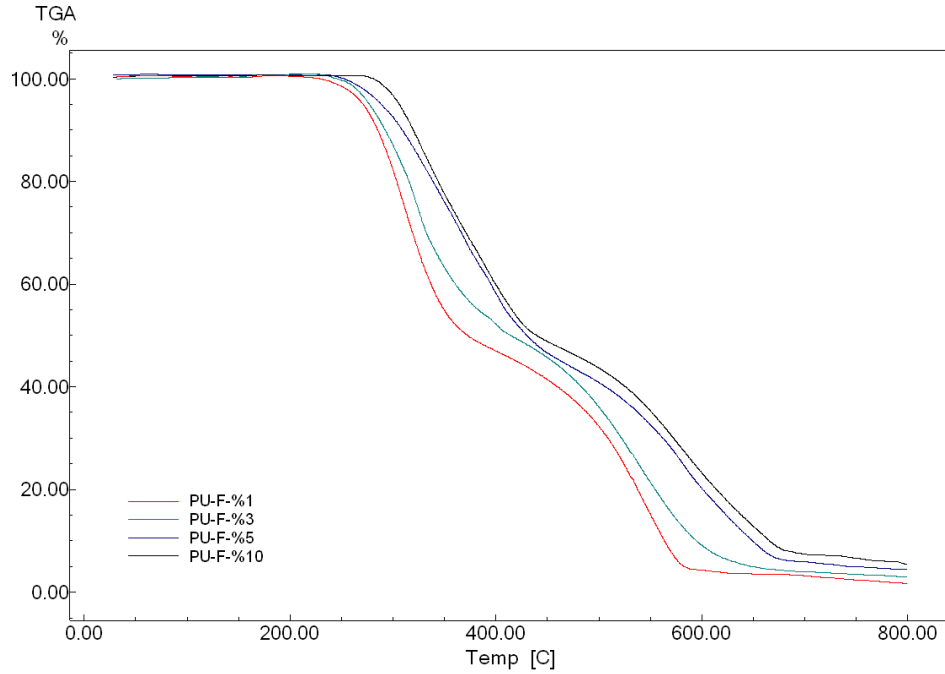
Şekil 4.2. Fruktoz temelli poliüretanlara ait FTIR spektrumları.

Fruktoz bağlayıcı üniteler içeren poliüretanın termal karakterizasyonu ise DTA, TGA ve DSC termogramlarıyla incelenmiştir. Şekil 4.3, 4.4 ve 4.5'de bu termogramlar görülmektedir.

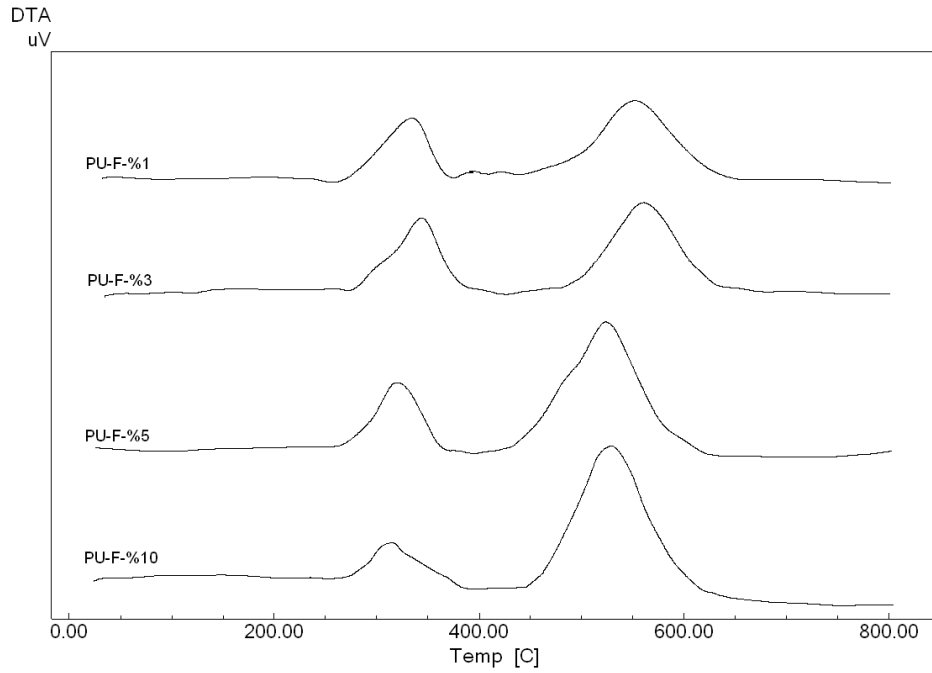
Termogramlar incelendiğinde fruktoz miktarı arttıkça yapıdaki bağlı çapraz bağlı grup arttığından dolayı zincirlerin istiflenme yoğunluğu düşecek ve böylece Tg değeri artacaktır. Ayrıca artan çapraz bağlanma miktarı polimer zincir yapısının sertleşmesine ve polimer zincir hareketliliğini azaltmaktadır. Sonuç olarak daha sert

ve kararlı bağların oluşması polimerin termal kararlılığını arttırmakta ve ısı dayanımını yükseltmektedir. Bu termal özelliğin değişimini hem DTA hem de TGA spektrumlarında açıkça görmekteyiz.

Farklı oranlarda fruktoz katkıları ile elde edilen poliüretanlara ait TGA, DTA ve DSC termogramları 10 °C/dk'lık sabit ısı program dahilinde elde edilmiştir. Şekil 4.3'de fruktoz taşıyan polimerlerin TGA termogramları verilmiştir. Bu termogramlarda polimerlerin termal bozunmaları iki kademede gerçekleşmektedir. Birinci kütle kaybı polimer yapısında bulunan çapraz bağlanma bölgelerinin kırılması ve polimer ağ örgüsünün dağılmasından kaynaklanmaktadır. İkinci temel kütle kaybı ise alifatik karakterli CH₂ bağlarının kırılması ve üretan bağlarının degradasyonundan kaynaklanmaktadır. Ayrıca Şekil 4.4'de fruktoz taşıyan poliüretan yapılarına ait DTA termogramları görülmektedir. Bu termogramlarda TGA eğrilerine benzer olarak iki temel ekzoterm görülmektedir. Bu ekzotermelerden birincisi polimerik yapıdaki çapraz bağ bölgelerinin kırılması için gerekli enerjiyi ikincisi ise polimerin termal degradasyonu sırasında açığa çıkan enerjiyi göstermektedir.



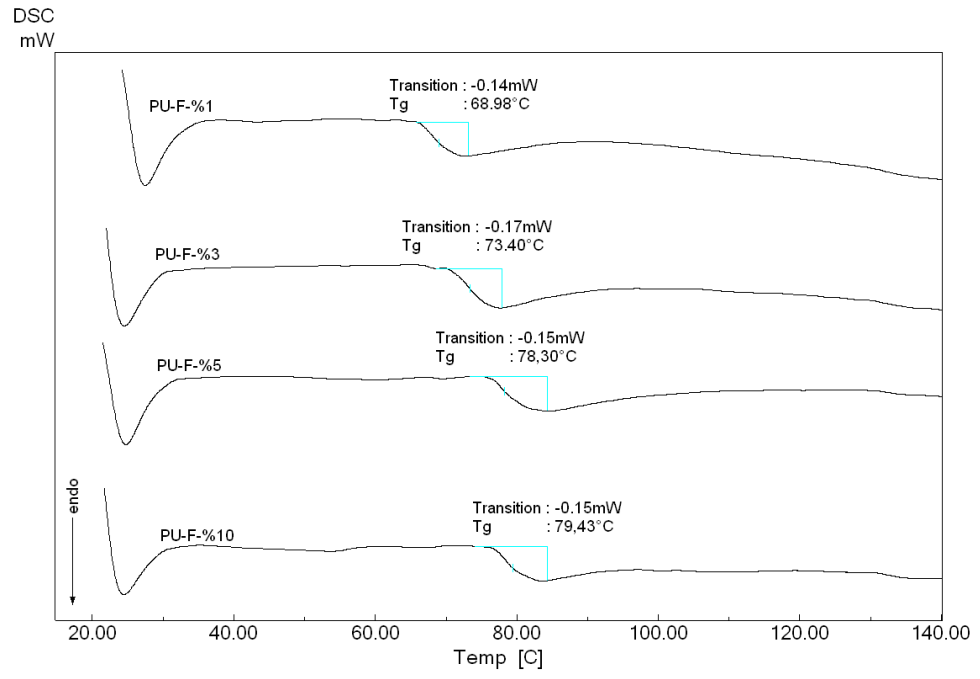
Şekil 4.3. Fruktoz temelli poliüretanlara ait TGA termogramları.



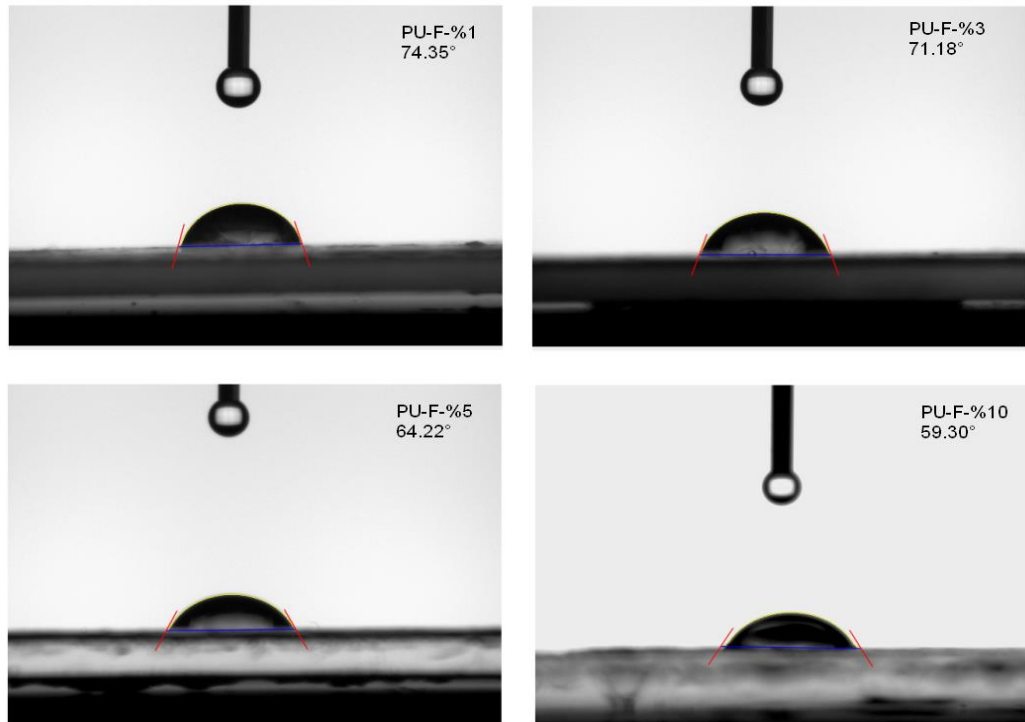
Şekil 4.4. Fruktoz temelli poliüretanlara ait DTA termogramları.

Fruktoz içeren poliüretan yapılarının termal kararlılıkları DTA termogramları ile hava atmosferinde belirlendi ve Şekil 4.4’de verilmiştir. Bu termogramlarda tüm poliüretan yapılarının yaklaşık olarak 250 °C’ye kadar karlılıklarını sürdürdükleri 250-400 °C arasında küçük bir ekzoterm ve 450-600 °C arasında büyük bir ekzoterm verdiği görülmüştür.

Fruktoz içeren poliüretanların DSC termogramlarında ise Tg geçişleri açıkça görülmektedir. %1, %3, %5 ve %10 fruktoz taşıyan poliüretanlara ait Tg değerleri sırası ile 68.98, 73.40, 78.30 ve 79.43 °C’dir. Sakkarit miktarındaki artışa bağlı olarak Tg değeri de artış göstermektedir. Bu olay sakkarit miktarındaki artış ile polimerik filmin sertleşmesi ve daha kırılkan olması sonucu ile uyum içindedir. Tez kapsamında ayrıca elde edilen polimerik filmler için Tg değerindeki artış yapısında gliserol içermeyen poliüretanlardan daha fazladır. Bu sonuç poliüretan yapısında gliserol gruplarının oldukça yoğun olarak çapraz bağlanma sağladığını göstermektedir.



Şekil 4.5. Fruktoz temelli poliüretanlara ait DSC termogramları ve Tg değerleri.

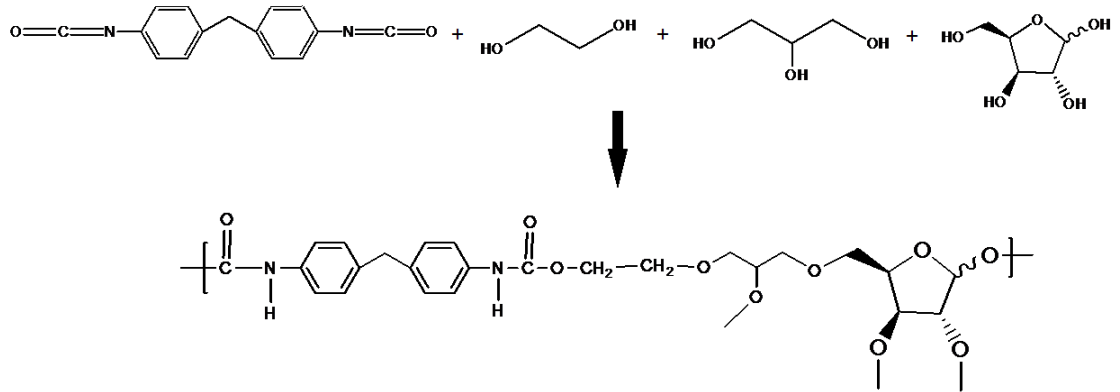


Şekil 4.6. Fruktoz temelli poliüretanlara ilişkin sıvı temas açısı görüntüleri.

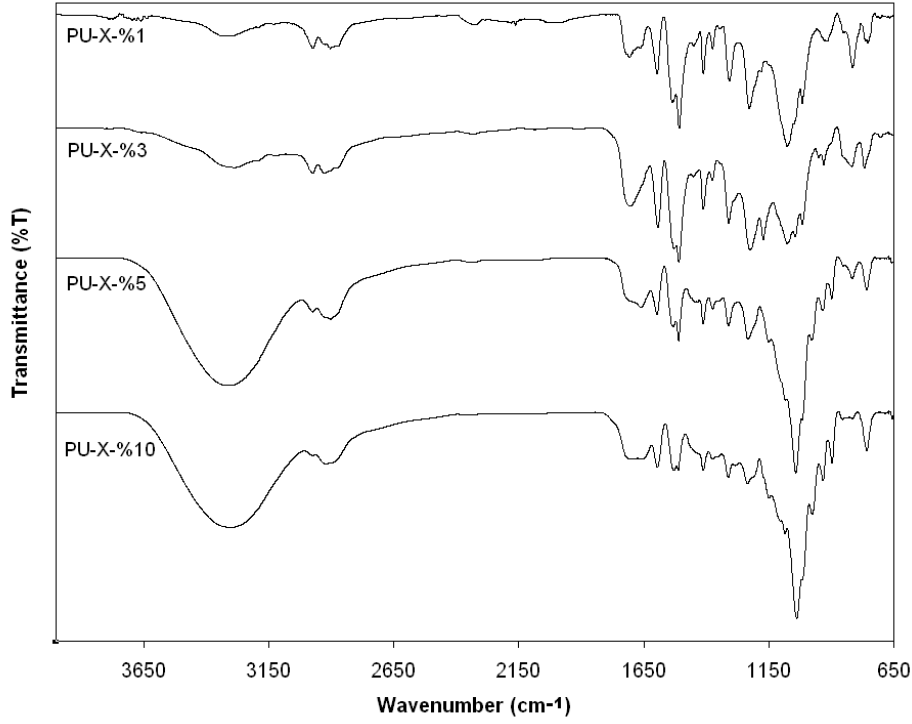
Polimerlerin sıvı temas açıları incelendiğinde Şekil 4.6' da görüldüğü gibi sırasıyla 74,35, 71,18, 64,22 ve 59,30° değerlerinin elde edildiği görülmektedir. Bu değerlerden de anlaşıldığı gibi polimerdeki sakkarit miktarı arttıkça yüzeydeki hidroksil gruplarından kaynaklı hidrofilik karakter baskın gelmekte ve polimerin sıvı temas açısı küçülmektedir.

4.1.2. Ksiloz temelli poliüretanların karakterizasyonu

Bu çalışma kapsamında ksiloz doğal -ol kaynağı kullanılarak poliüretan sentezlerinde monomer olarak kullanılmıştır. Etilen glikol, gliserol yanında ksiloz kullanılarak sentezlenen poliüretan yapıları ve sentez reaksiyonu Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Ksiloz üniteleri üzerinden ağ yapısı gösteren poliüretanlar hazırlanmış ve sensör amaçlı elektrotlarda yüzey modifikasyonu için kullanılmıştır. Sentezlenen poliüretanlar FTIR, ve elementel analiz gibi teknikler ile karakterize edilmiştir. Poliüretan reaksiyonları FTIR spektrometresi ile izlenmiştir. Serbest izosiyanat gruplarının 2265 cm^{-1} dalga boyundaki karakteristik pikinin zamanla azalması gözlenmiş ve pik tamamen yok olduğunda reaksiyon sonlandırılmıştır.



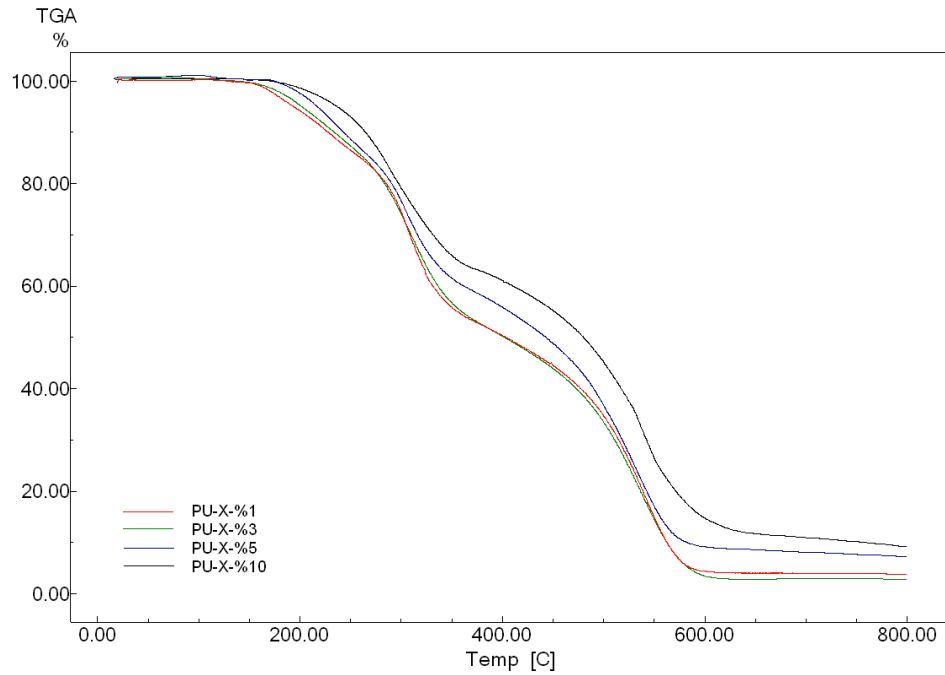
Şekil 4.7. Ksiloz temelli poliüretanların sentez şeması.



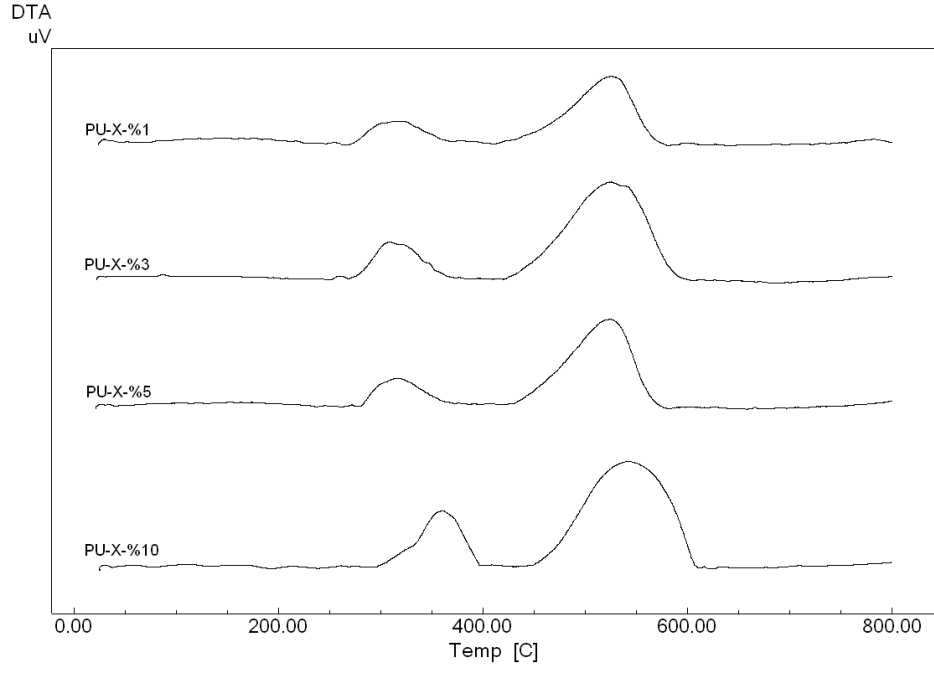
Şekil 4.8. Ksiloz temelli poliüretanlara ait FTIR spektrumları.

Ksiloz içeren polimerlerin FTIR spektrumları Şekil 4.8’de verilmiştir. Bu FTIR spektrumlarında polimer yapısındaki ksiloz gruplarına ait C-O, OH, ve CH bağlarına ait gerilme titreşimleri ile poliüretan yapısına ait C=O, NH ve CN bağları görülmektedir. Şekil incelendiğinde 3320 cm^{-1} ’de N-H gerilme titreşimlerini görmekteyiz. Yine 2954 cm^{-1} ’de üçlü bir pik olarak diizosiyanattan kaynaklanan alifatik C-H gerilme titreşimlerini görmekteyiz. Bu alifatik gerilme titreşimi literatürle kıyaslandığında benzer diizosiyanat taşıyan poliüretanlardan daha şiddetli olarak görülmektedir. Bunun nedeni yapıya katılan etilen glikol ve gliserol molekülleridir. Bu moleküller üzerinde oldukça fazla miktarda alifatik CH grupları bulunmaktadır. Karbonil gruplarına ait gerilme titreşimleri üretan karbonili (1716 cm^{-1}) olarak görülmektedir. 1532 cm^{-1} ’de C-N gerilme titreşimini açıkça görmekteyiz. Ksiloz yapısının bağlanması sırasında oluşan C-O-C eterik gerilme titreşimini 1740 cm^{-1} ’de ve daha serbest olan diolün bağlanmasını ise 1273 cm^{-1} ’de eterik bir gerilme titreşimi olarak açıkça görmekteyiz. Aromatik fenilik grupların CH gerilme titreşimlerini ise 774 ve 825 cm^{-1} ’de görmekteyiz. Tüm bu veriler istenilen yapıların uygun olduğunu bize ispatlamaktadır.

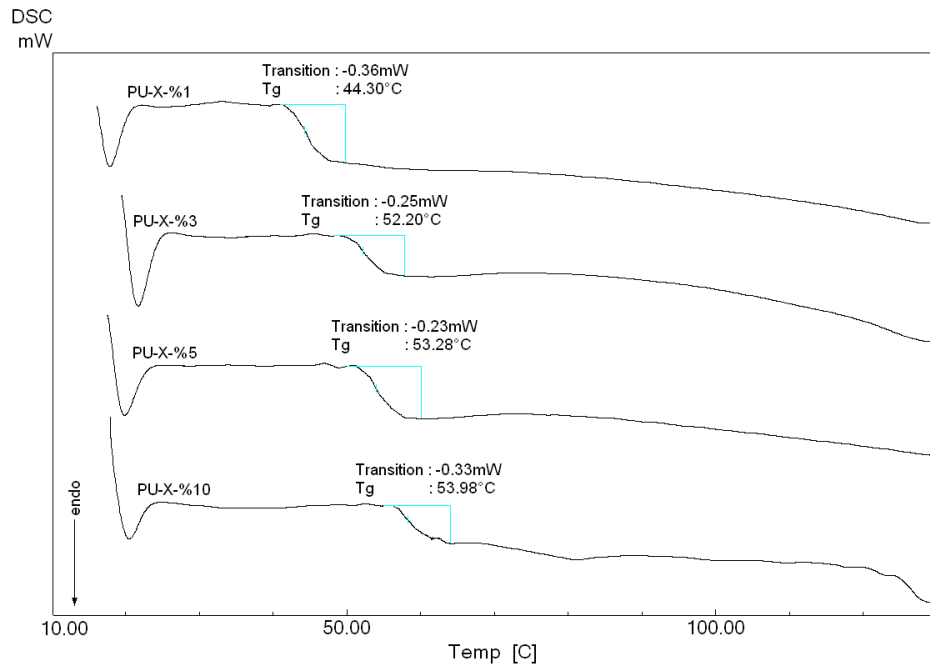
Poliüretan filmlerin hazırlanması sırasında kullanılan sakkaritlerin, filmlerin termal kararlılıklarına etkisi, TGA çalışması ile incelenmiştir (Şekil 4.9). Ksiloz gibi sakkaritler poliüretan yapısı için bir çapraz bağlayıcı ajan görevi gördüğünden dolayı ksiloz miktarı arttıkça polimerin esnekliği kaybolmaktadır. Çapraz bağlanma miktarı arttıkça polimer filmlerin termal kararlılıklarının arttığı bilinmektedir. Ksiloz taşıyan poliüretanların bozulma başlangıç sıcaklıkları ve termal kararlılıkları DTA tekniği ile belirlendi ve elde edilen termogramlar Şekil 4.10'da verilmiştir. Tüm poliüretanlarda olduğu gibi DTA termogramlarında öncelikle poliüretan yapısındaki ksiloz bağlayıcı ünitelerin bozulmasına karşılık gelen 200-400 °C arasında bir bozulma ekzotermi görülür. Daha sonra 410-650 °C aradında polimerin oksidatif termal bozulma piki görülmektedir. Yapısal olarak ksiloz taşıyan poliüretanların termal yararlılığı fruktoz içeren polimerlere göre daha düşüktür. Bunun nedeni yapısal olarak daha düşük oranda çapraz bağlanma ünitesi taşıdığı içindir.



Şekil 4.9. Ksiloz temelli poliüretanlara ait TGA termogramları.

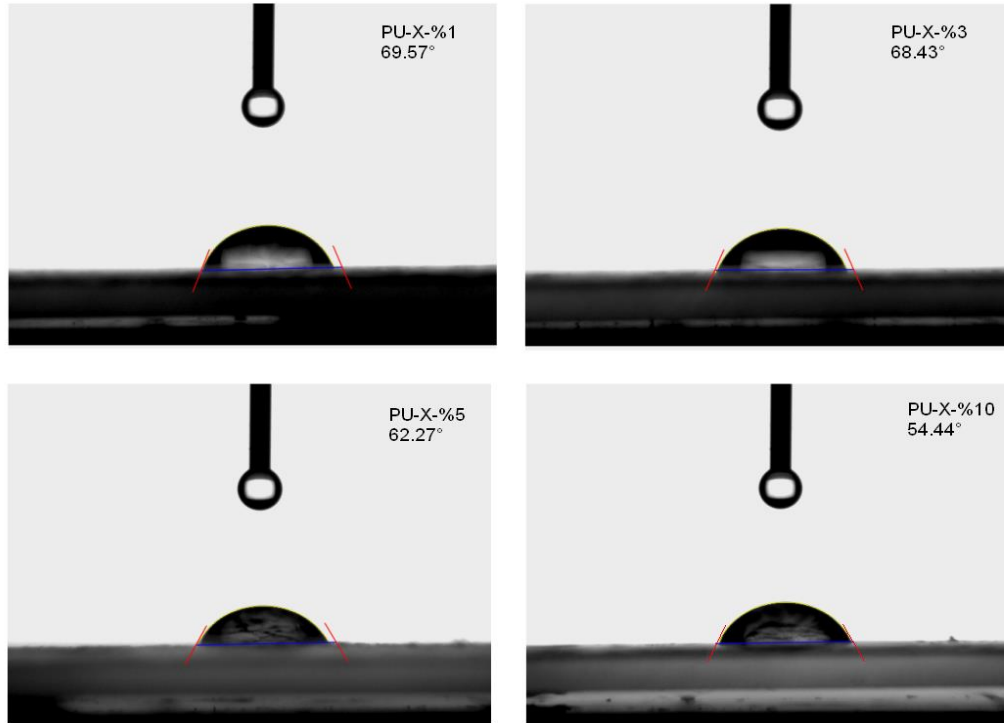


Şekil 4.10. Ksiloz temelli poliüretanlara ait DTA termogramları.



Şekil 4.11. Ksiloz temelli poliüretanlara ait DSC termogramları ve Tg değerleri.

Ksiloz içeren poliüretanların FTIR spektrumlarında genel olarak poliüretan yapısından kaynaklanan C=O gerilme titreşimi, N-H gerilme titreşimi ve ayrıca ksiloz katkısından kaynaklanan C-O-C ve polar karakterli C-O gruplarına ait pikler görülmektedir. Tüm bu pikler polimerin yapısının fazlaca polar olarak kurulduğunu göstermektedir. Bu polariteden kaynaklı olarak polimer zincirleri oldukça sık istiflenmiştir ve polimer zincir hareketliliği kısıtlanmıştır. Ayrıca ksiloz ve gliserol bağları etrafında oluşan çapraz bağlanmalar polimerik yapının rijit karakterini arttırmaktadır. Sonuçta ksiloz yapısından elde edilen polimerlerin termal özellikleri incelendiğinde yaklaşık 40 °C termal bir kazanç ve 15 °C civarında bir Tg artışı söz konusudur. Ancak dört fonksiyonel –OH grubu bulunan ksiloz gruplarının bağlanması polimerik yapıyı sertleştiren bir etki olduğundan Tg değerinin artmasını sağlamıştır ve bu etkiyi Şekil 4.10’da görmekteyiz. Artan ksiloz miktarına bağlı olarak Tg değerindeki değişim logaritmik artan olarak gözlenmiştir. Ksiloz üniteleri taşıyan polimerlere ait Tg değerleri; sırası ile, %1, %3, %5 ve %10 ksiloz içerikleri için 44.30, 52.20, 53.28 ve 53.98 °C olacak şekilde görülmektedir (Şekil 4.11).

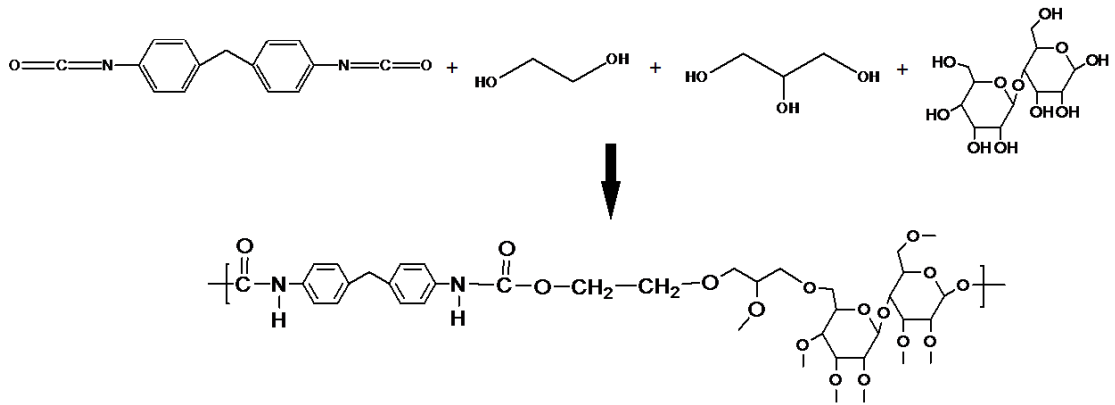


Şekil 4.12. Ksiloz temelli poliüretanlara ilişkin sıvı temas açısı görüntüleri.

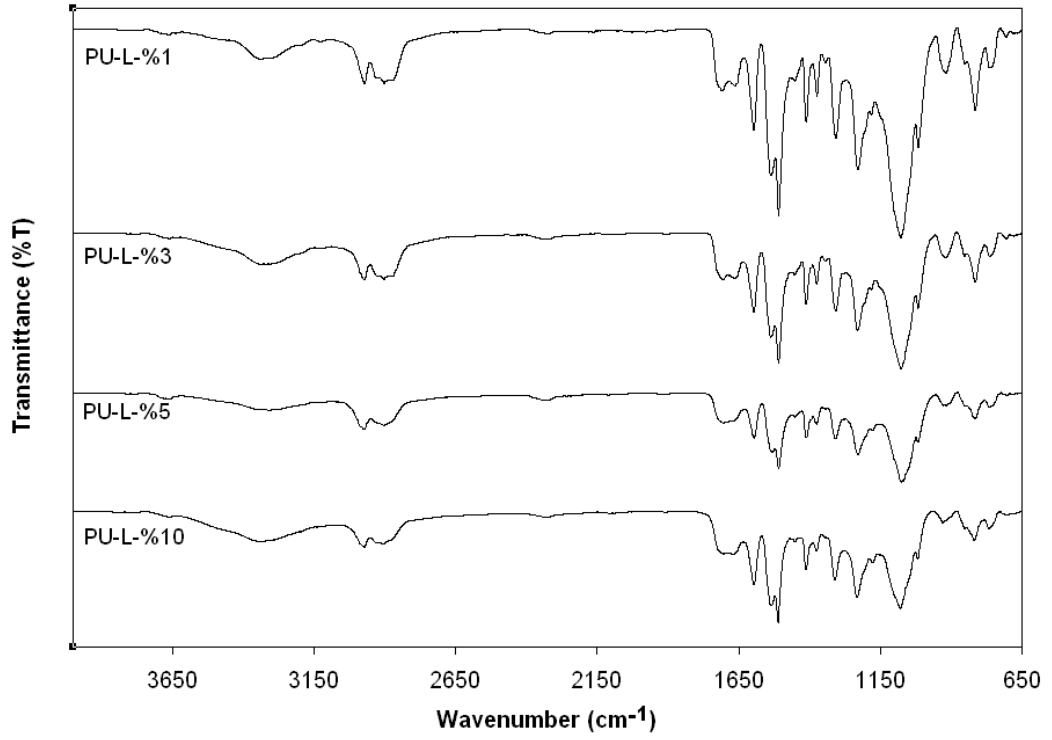
Polimerlerin sıvı temas açıları incelendiğinde Şekil 4.12’de görüldüğü gibi sırasıyla 69,57, 68,43, 62,27 ve 54,44° değerlerinin elde edildiği görülmektedir. Bu değerlerden de anlaşıldığı gibi polimerdeki sakkarit miktarı arttıkça yüzeydeki hidroksil gruplarından kaynaklı hidrofilik karakter baskın gelmekte ve polimerin sıvı temas açısı küçülmektedir.

4.1.3. Laktoz temelli poliüretanların karakterizasyonu

Glukoz ve galaktozdan oluşan laktoz bir disakkarit olup laktozdan elde edilen poliüretanlar yapısal olarak glukoz içeren poliüretanlara benzemekle birlikte daha sert ve kırılındırlar. Sekiz farklı OH grubu taşımakta ve polimerizasyon sırasında oldukça yüksek oranda çapraz bağlanma yapmaktadır (Şekil 4.13). Bu nedenle genellikle çoğu polimerizasyon reaksiyonlarında tüm OH gruplarının reaksiyona girmesi mümkün olmamaktadır. Laktoz kullanılarak gerçekleştirilen poliüretan sentezi en iyi olarak FTIR spektrumları ile takip edilebilir. Laktoz içeren polimerlere ait FTIR sepktrumları Şekil 4.14’de verilmiştir. Bu spektrumlar genel olarak glukoz içeren yapılara benzemekle beraber bazı temel farklılıklar içermektedir.

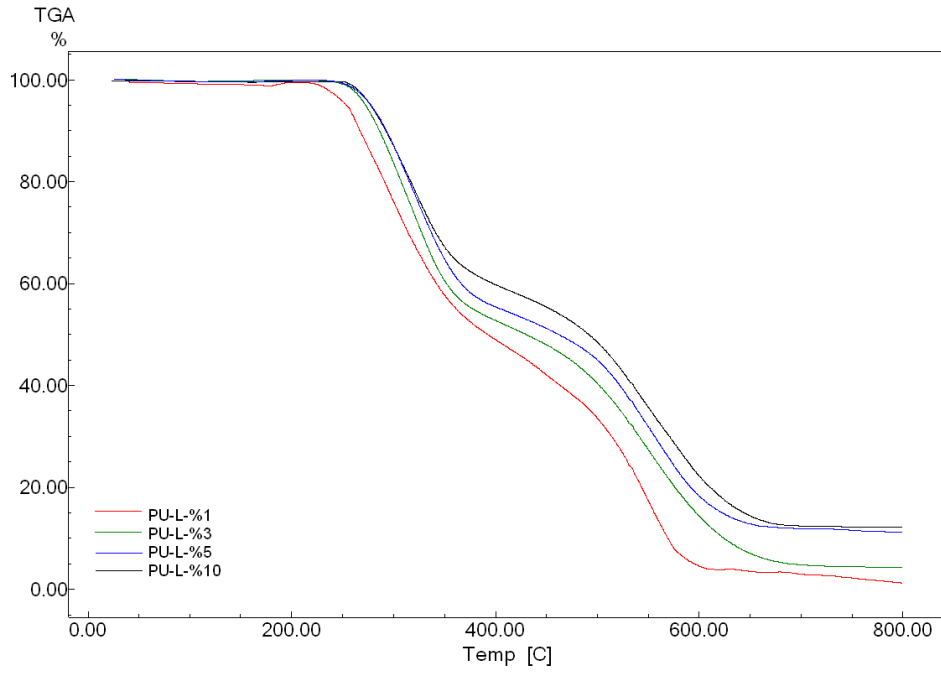


Şekil 4.13. Laktoz temelli poliüretanların sentez şeması.

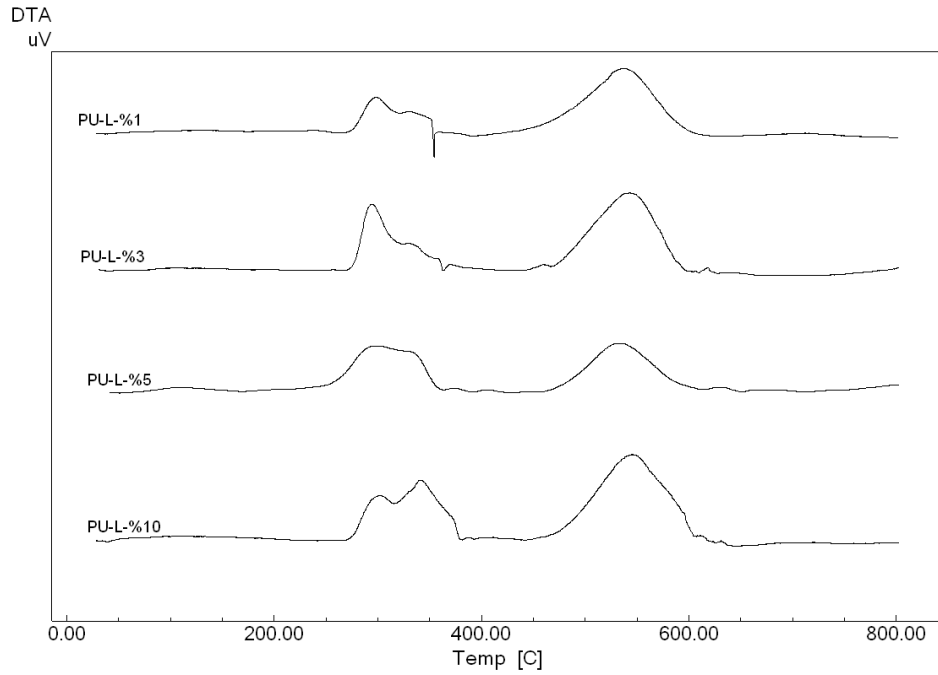


Şekil 4.14. Laktoz temelli poliüretanlara ait FTIR spektrumları.

Laktoz içeren yapılardan elde edilen polimerlerin termal özellikleri DTA, TGA ve DSC ile belirlendi. Şekil 4.15’de TGA spektrumu laktoz içeren poliüretanların genel olarak iki temel bozulma kütle kaybı verdiği görülmektedir. Birinci kütle kaybı yaklaşık 220 °C’de ve ikinci kütle kaybı ise termal bozulma olan 310 °C’de görülmektedir. Artan laktoz miktarına bağlı olarak DTA termogramlarında belirgin bir şekilde iki adet ekzoterm gözlenmiştir (Şekil 4.16).



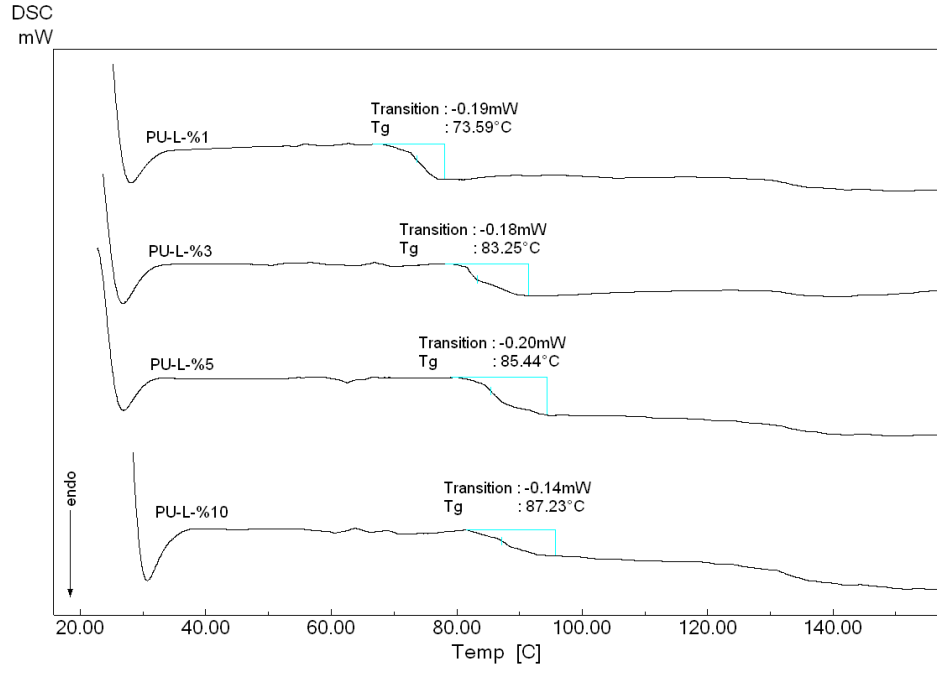
Şekil 4.15. Laktoz temelli poliüretanlara ait TGA termogramları.



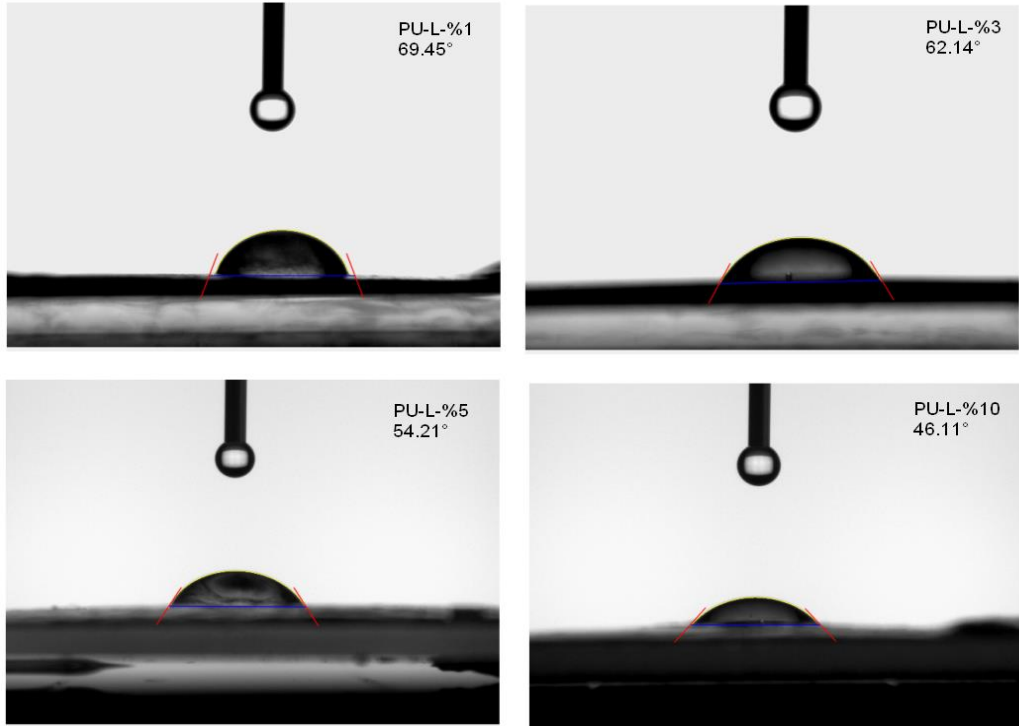
Şekil 4.16. Laktoz temelli poliüretanlara ait DTA termogramları.

Laktoz içeren poliüretanların Tg değerleri yaklaşık olarak 73 °C ve 87 °C arasında olup bu değer artan laktoz miktarı ile yükselmektedir (Şekil 4.17). Bu

değişim laktoz miktarı ile polimerdeki çapraz bağlanma ve ağsı bir yapıyı ispatlamaktadır.



Şekil 4.17. Laktoz temelli poliüretanlara ait DSC termogramları ve Tg değerleri.

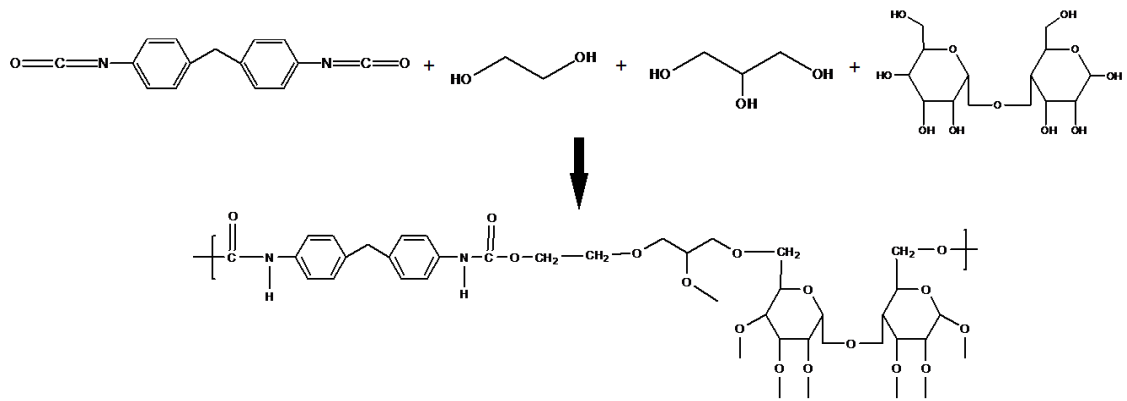


Şekil 4.18. Laktoz temelli poliüretanlara ilişkin sıvı temas açısı görüntüleri.

Polimerlerin sıvı temas açıları incelendiğinde Şekil 4.18' de görüldüğü gibi sırasıyla 69.45, 62,14, 54.21 ve 46,11° değerlerinin elde edildiği görülmektedir. Bu değerlerden de anlaşıldığı gibi polimerdeki sakkarit miktarı arttıkça yüzeydeki hidroksil gruplarından kaynaklı hidrofilik karakter baskın gelmekte ve polimerin sıvı temas açısı küçülmektedir.

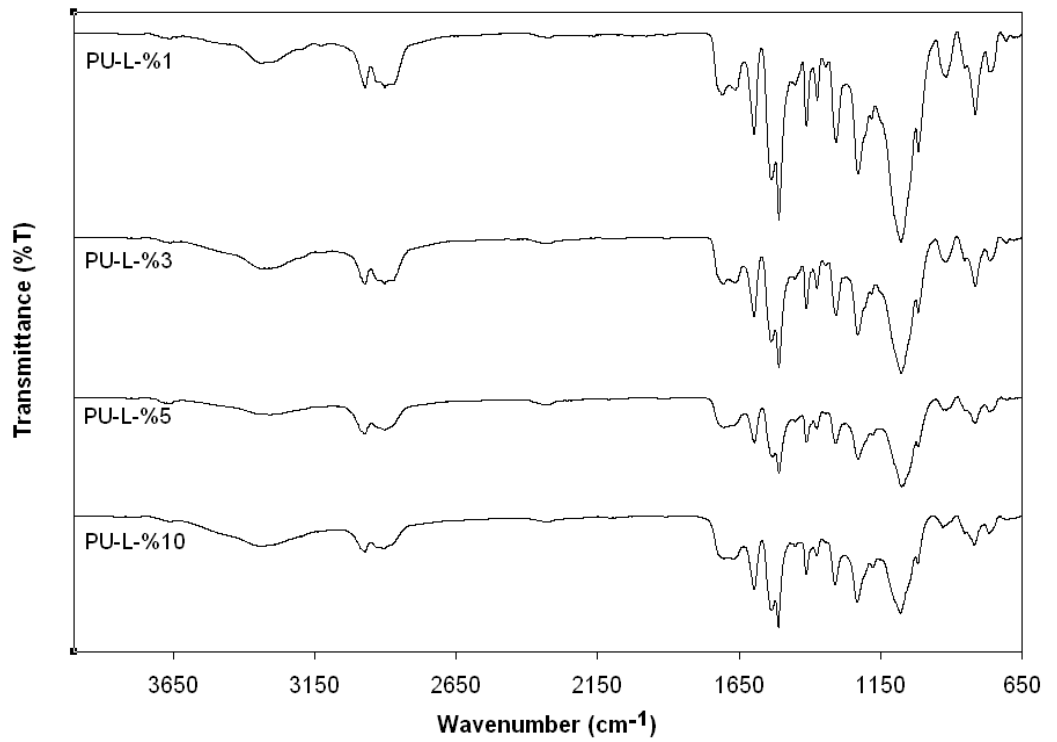
4.1.4. Maltoz temelli poliüretanların karakterizasyonu

Maltoz $C_{12}H_{22}O_{11}$ moleküler formüllüne sahip bir disakkarittir. malt şekeri veya di-glikoz olarak da bilinir. Sistematik ismi α -D-Glukopiranozil-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-Glukopiranoz'dur. Diğer karbonhidratlar gibi maltozun da hidrojen-oksijen oranı 2:1'dir. Glikozidik bağ ile bağlanmış iki α -glikoz molekülünden oluşur, bu bağ birinci glikozun 1. karbon atomuyla ikincinin 4. karbon atomu arasındadır. İkinci glikoz grubu üzerinde bir aldehit olduğu için maltoz indirgeyici şeker olarak tanımlanır. Birinci glikozun indirgeyici grubu ise glikozidik bağı oluşturmakta kullanılmıştır. Poliüretan yapısına katılınca aşırı çapraz bağlanma etkisi göstermiştir. Maltoz kullanılarak sentezlenen poliüretan filmler esnek ve yapışkandırlar. Tg değerleri diğer monosakkaritlerden hazırlanan poliüretanlara göre oldukça yüksektir. Bunun nedeni Maltoz birim hücresindeki iki glukoz yapısının zincirler arası etkileşimlere engel olmasıdır (Şekil 4.19).

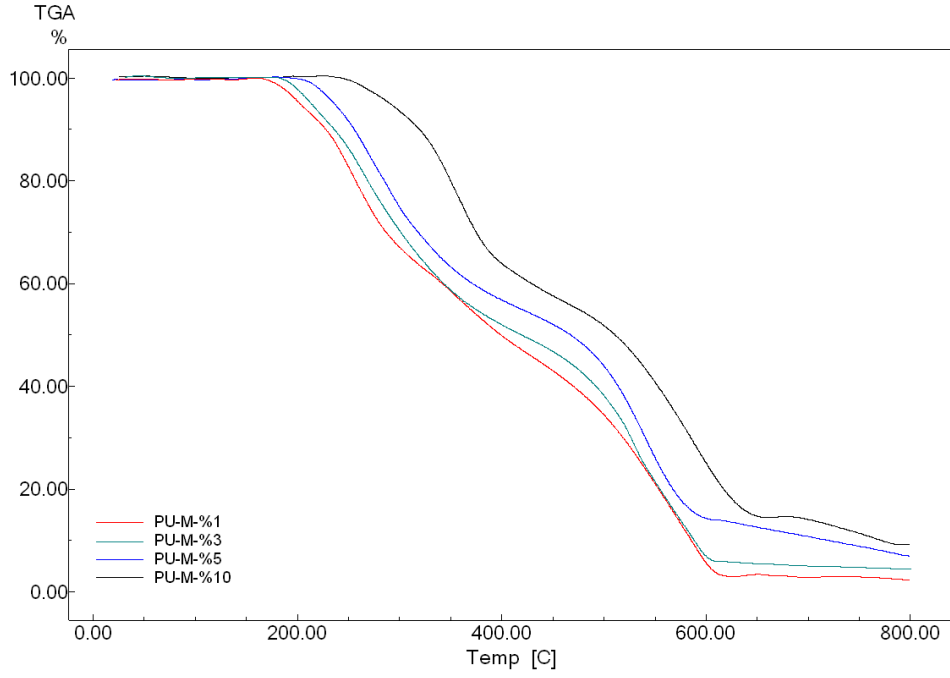


Şekil 4.19. Maltoz temelli poliüretanların sentez şeması.

Farklı oranlarda Maltoz kullanılarak sentezlenen poliüretanlara ait FTIR spektrumları Şekil 4.20’de verilmiştir. Burada $3290-3500\text{ cm}^{-1}$ OH ve NH, 2870 cm^{-1} –CH, 1724 cm^{-1} ’de karbonil fonksiyonel gruplarını, $1600-1650\text{ cm}^{-1}$ ’de –NH deformasyon pikini ve aromatik C=C titreşimlerini görmekteyiz. 1530 , $1320-1440$, 1222 ve 1064 cm^{-1} ’de sırası ile N-O, -C-H deformasyon, aromatik halkaya bağlı üretan bağı ve –C-O gerilme titreşimlerini görmekteyiz. Benzer titreşimler farklı oranlarda Maltoz içeren tüm poliüretanların FTIR spektrumlarında bulunmaktadır. 2270 cm^{-1} ’de bulunan izosiyanat pikinin kaybolması ve bu piklerin oluşması bize poliüretan yapısını ispatlamaktadır.

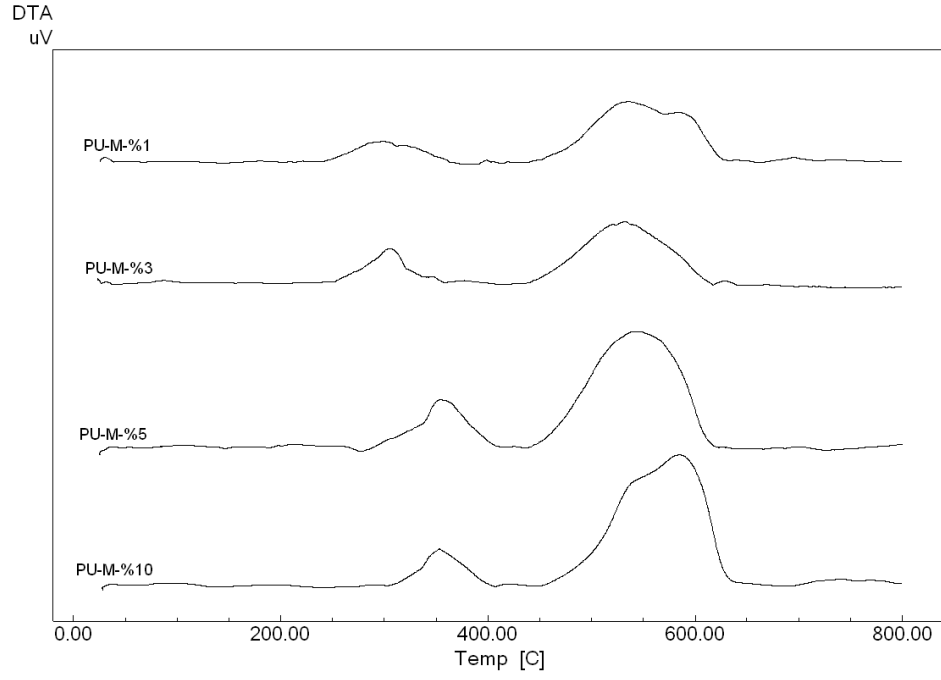


Şekil 4.20. Maltoz temelli poliüretanlara ait FTIR spektrumları.

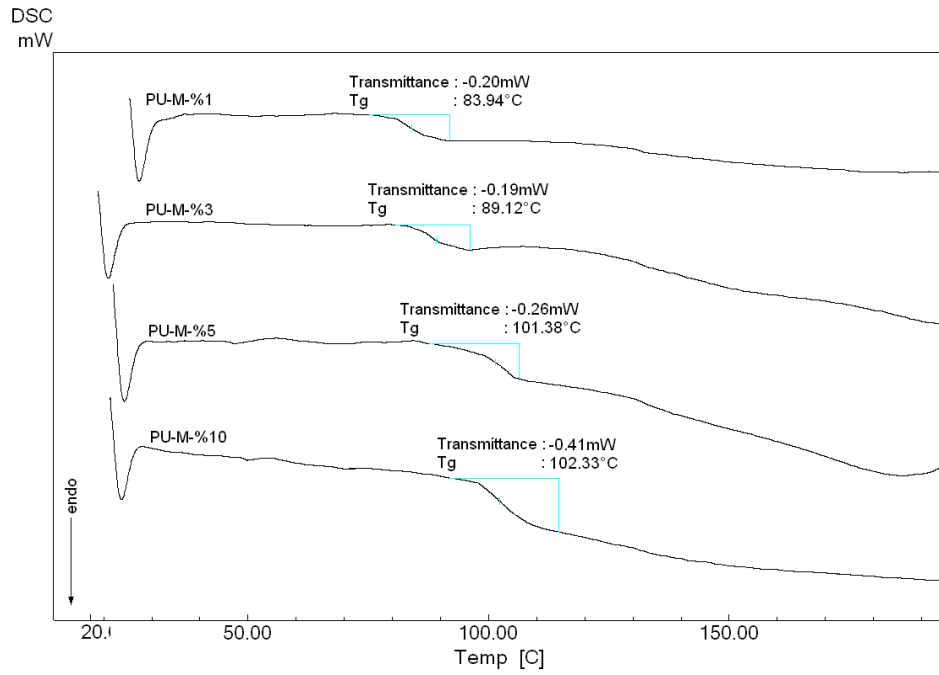


Şekil 4.21. Maltoz temelli poliüretanlara ait TGA termogramları.

Maltoz temelli poliüretanlara ait TGA termogramları Şekil 4.21’de verilmektedir. Bu termogramlarda iki temel kütle kaybı görülmektedir. Bunlardan birincisi 200-400 °C’de diğeri 400-570 °C’de görülmektedir. Şekil 4.22’de görüldüğü gibi Maltoz miktarındaki artış ilk bozulma sıcaklığının düşmesine neden olmaktadır. Bu sonuç ilk kütle kaybının poliüretan yapısına bağlanan sakkarit grupları ile ilgili olduğunu göstermektedir. Bu durum DTA termogramında da benzer olarak görülmektedir. Termogramda iki temel ekzoterm görülmektedir (Şekil 4.22). Birinci ekzoterm diğeri poliüretan yapılarından farklı olarak daha düşük görülmektedir. Bunun nedeni polimer zincirleri arasındaki çapraz bağların çoluğu ve buna bağlı olarak polimerlerin termal kararlılıklarının oldukça yüksek olmasıdır. Öyleki birinci ekzoterm çok yüksek değerde görülür ve bu yüksek enerjide polimerik yapıyı direkt olarak etkilemektedir.



Şekil 4.22. Maltoz temelli poliüretanlara ait DTA termogramları.



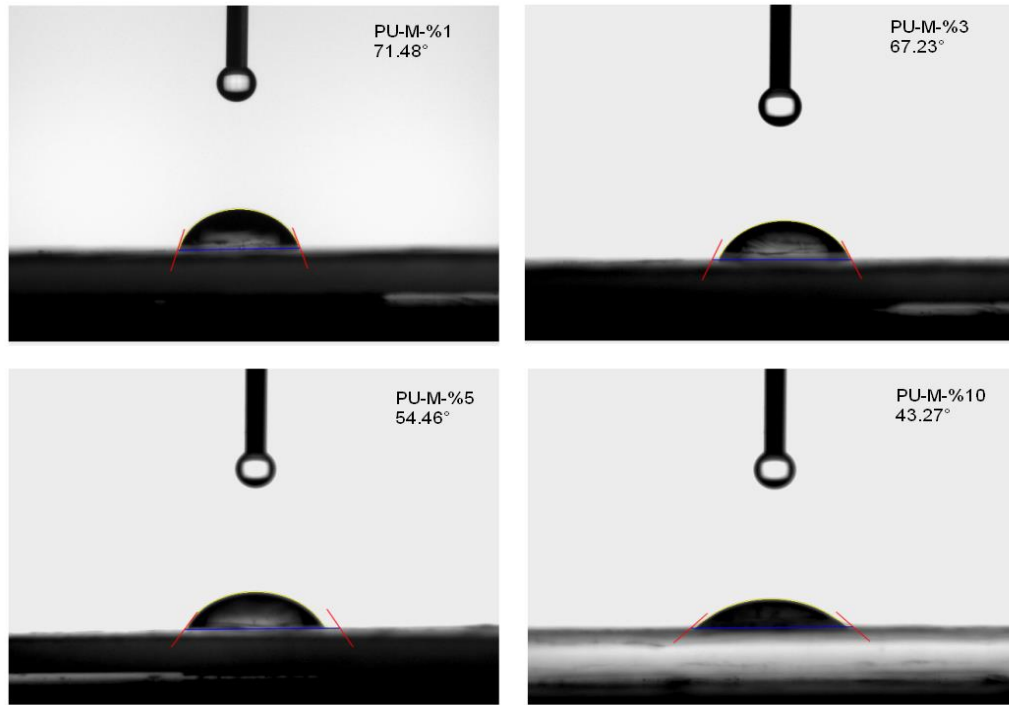
Şekil 4.23. Maltoz temelli poliüretanlara ait DSC termogramları ve Tg değerleri.

Maltoz yapısındaki sekiz farklı hidroksil grubundan kaynaklı olarak sonuç polimer yüzeyinde çok fazla aktif hidroksil grubu bulunur. Bu hidroksil grupları

polimer zincirleri arasında yoğun bir hidrojen bağı oluşumuna yol açar. Polimer zincirleri arasında görülen bu aşırı etkileşim DSC termogramında Tg değişiminde de görülmektedir. Maltoz miktarı arttıkça artan çapraz bağlanmaya ve hidrojen bağı oluşumuna bağlı olarak polimer yapısını sertleştirir ve polimerin Tg değeri yükselir (Şekil 4.23).

Tez kapsamında ayrıca elde edilen polimerik filmler için sıvı temas açıları ölçülerek filmin hidrofilik özelliği hakkında bilgi elde edilmiştir. İlgili ölçümler Şekil 4.24’de verilmiştir. Poliüretanın yapısında bağlanmış olan sakkarit miktarı arttıkça sıvı temas açısı da artmaktadır. Bu bulgu literatür ile uyum içindedir. Maltoz taşıyan polimerlerin sıvı temas açısı değerleri %1, %3, %5 ve %10 için sırası ile 71.48, 67.23, 54.46 ve 43.27°’dir.

Polimerlerin sıvı temas açıları incelendiğinde Şekil 4.24’de görüldüğü gibi sırasıyla 71,48, 67.23, 54.46 ve 43,27° değerlerinin elde edildiği görülmektedir. Bu değerlerden de anlaşıldığı gibi polimerdeki sakkarit miktarı arttıkça yüzeydeki hidroksil gruplarından kaynaklı hidrofilik karakter baskın gelmekte ve polimerin sıvı temas açısı küçülmektedir.



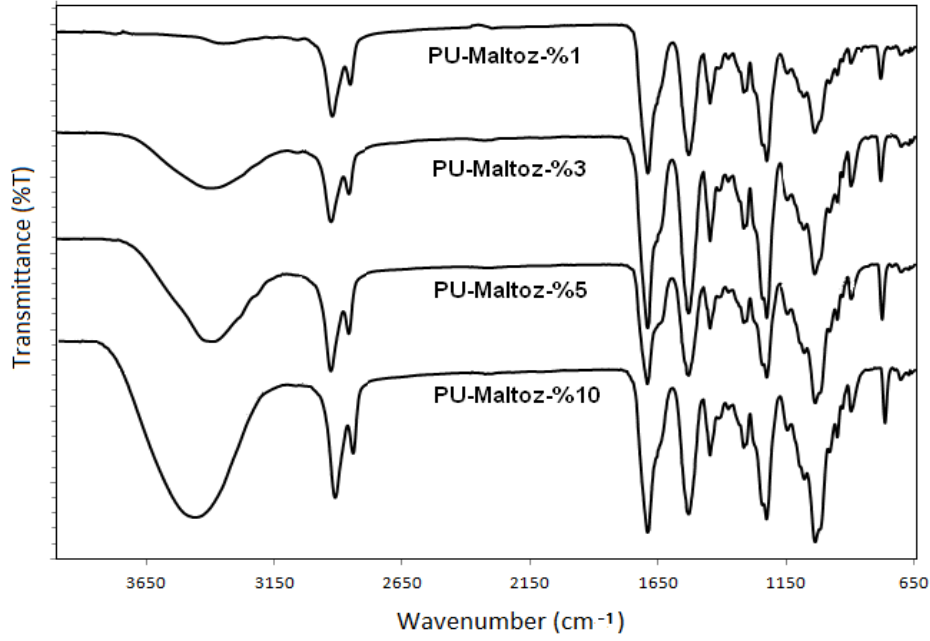
Şekil 4.24. Maltoz temelli poliüretanlara ilişkin sıvı temas açısı görüntüleri.

4.1.5. Gliserol içermeyen maltoz temelli poliüretanların karakterizasyonu

Tez kapsamında maltoz, ve laktoz disakkarit olarak kullanılmıştır. Bu sentezlerde sakkaritler -ol kaynağı olarak kullanılan etilen glikol içine % 1, 3, 5 ve 10 oranlarında katkılanarak hem polimerin biyouyumluluğunda artış hem de biyobozunurluğunun uygun olmasını amaçlanmıştır. Ancak tez kapsamında gerçekleştirilen sentezlerde genellikle polimerik yapıya mekanik mukavement ve uzun süre kullanım olanağı sağlamak amacı ile gliserol katkılanmıştır. Çalışmanın bu kısmında ise gliserol kullanmadan direkt olarak etilen glikol ve maltoz kullanılmış ve yapısal bu çeşitliliğin sensör morfolojisi ve sensör yanıtlarına etkisi yorumlanmıştır. Bu kapsamda hazırlanan poliüretanlar ve karakterizasyonları aşağıda verilmiştir

Maltoz temelli poliüretanın FTIR spektrumu Şekil 4.25’de gösterilmiştir. Poliüretanların spektrumunda 3439 cm^{-1} ’de —OH piki görülmektedir. 2884 cm^{-1} ’de —CH_2 , 1720 cm^{-1} ’de —COO gerilmeleri görülmektedir. Polimer spektrumunda 1694 cm^{-1} NHCOO gerilmesinden, 3319 cm^{-1} ’de —NH gerilmesinden, 1537 cm^{-1} ’de N—H bükülmesinden dolayı oluşan pikler görülmektedir.

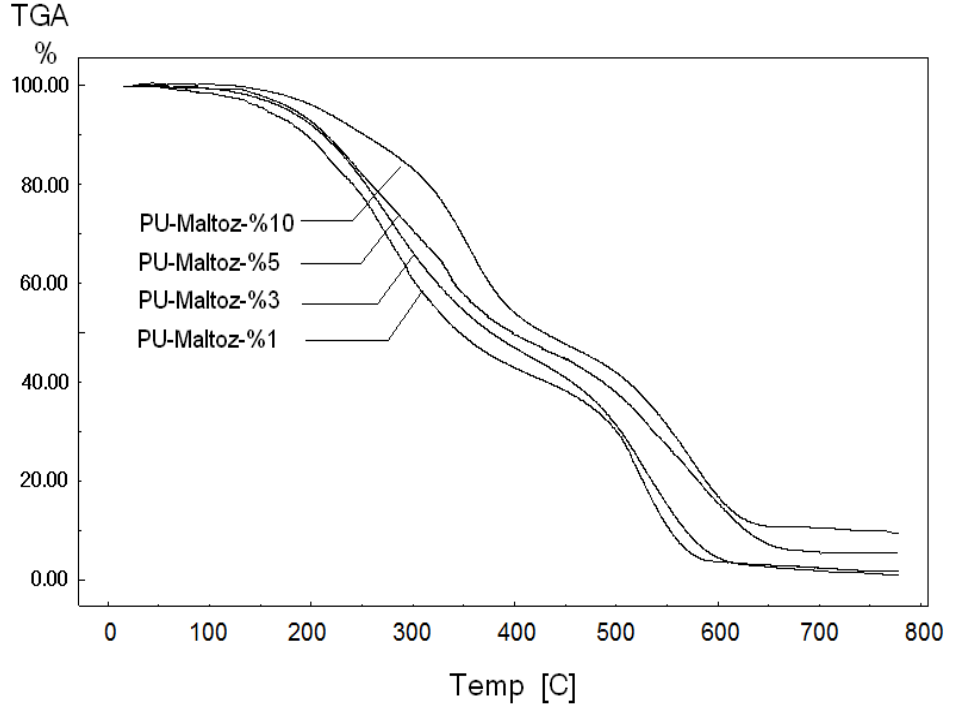
Bir disakkarit olan maltoz poliüretan yapısında kullanıldığında bir monosakkarit olan glukozaya göre daha fazla —OH grubu içerdiği için artan maltoz oranlarında monomer stokiyometrisi (—NCO ile —OH oranı) bozulmakta ve çok fazla miktarda serbest —OH grubu taşıyan polimerler elde edilmektedir. Bu etki Şekil 4.25’de ki FTIR spektrumlarında açıkça görülmektedir. Maltoz miktarı arttıkça —OH grubuna ait $3400\text{—}3500\text{ cm}^{-1}$ ’deki pik şiddeti ve genişliği artmaktadır.



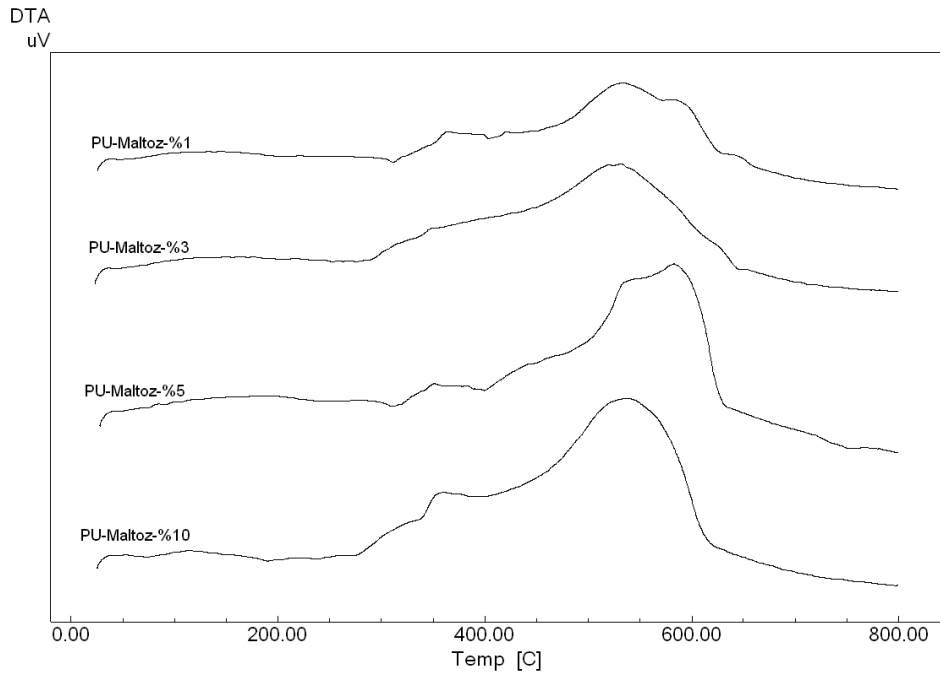
Şekil 4.25. Gliserol içermeyen maltoz temelli poliüretanlara ait FTIR spektrumları.

Maltoz temelli poliüretanlara ait TGA termogramları Şekil 4.26’da verilmektedir. Bu termogramlarda iki temel kütle kaybı görülmektedir. Bunlardan birincisi 200-400 °C’de diğeri 400-570 °C’de görülmektedir. Şekil 4.26’da görüldüğü gibi maltoz miktarındaki artış ilk bozulma sıcaklığının düşmesine neden olmaktadır. Bu sonuç ilk kütle kaybının poliüretan yapısına bağlanan sakkarit grupları ile ilgili olduğunu göstermektedir. Bu TGA termogramları DTA termogramları ile uyumludur ve Şekil 4.27’de verilen DTA termogramları incelendiğinde iki temel bozulma piki mevcuttur.

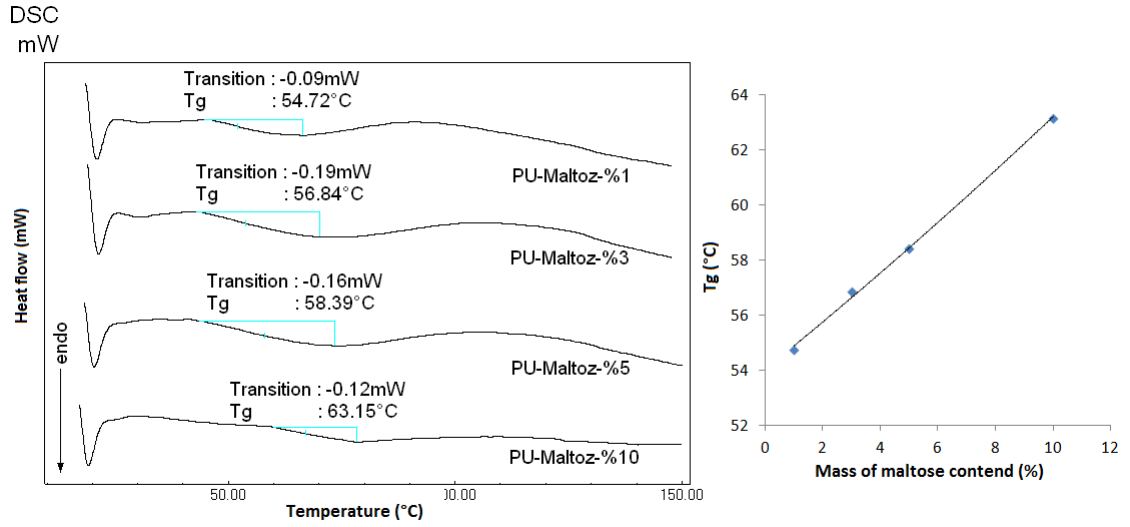
Maltoz üniteleri taşıyan polimer filmlerin camsı geçiş sıcaklıkları (T_g) DSC ile belirlenmiştir. Şekil 4.28’de poliüretan filmlerin DSC termogramları görülmektedir. Buna göre filmlerin T_g değerleri 54 ve 63 °C arasında değişmektedir. DSC sonuçlarından maltoz oranı arttıkça poliüretan filmlerin daha yüksek T_g değerine sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca gliserol içermeyen maltoz temelli poliüretanların T_g değerleri %1, %3, %5 ve %10 maltoz içeren polimerler için sırasıyla 54.72, 56.84, 58.39 ve 63.15’ dir.



Şekil 4.26. Gliserol içermeyen maltos temelli poliüretanlara ait TGA termogramları.

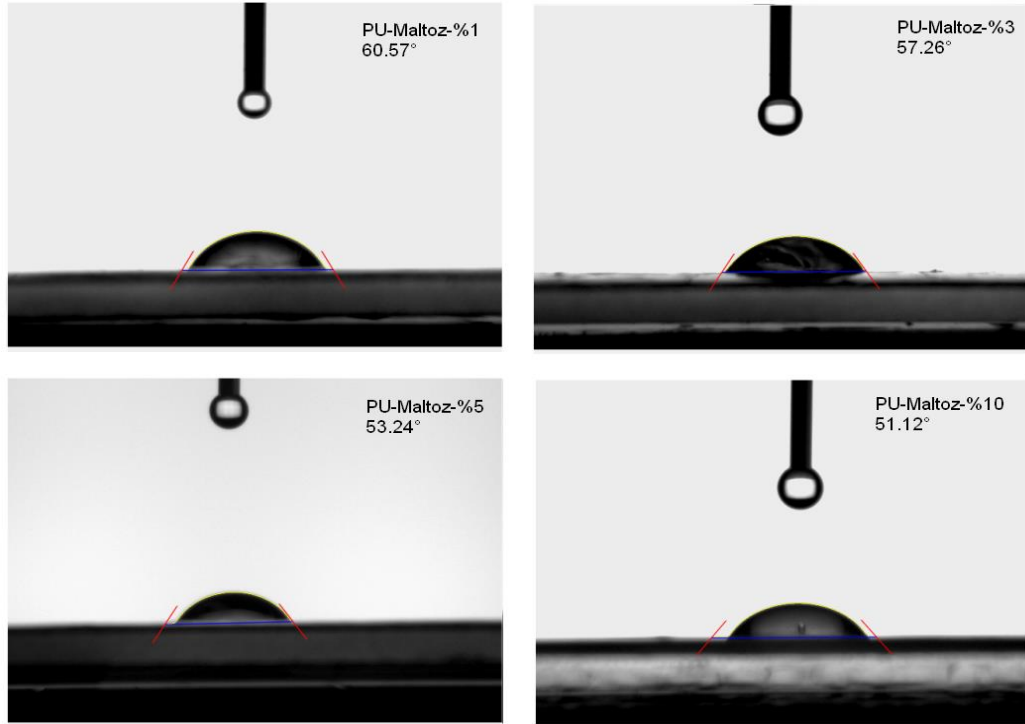


Şekil 4.27. Gliserol içermeyen maltos temelli poliüretanlara ait DTA termogramları.



Şekil 4.28. Gliserol içermeyen maltos temelli poliüretanlara ait DSC termogramları ve T_g değerleri.

Polimerlerin sıvı temas açıları incelendiğinde Şekil 4.29’da görüldüğü gibi sırasıyla 60.57, 57.26, 53.24 ve 51.12° değerlerinin elde edildiği görülmektedir. Bu değerlerden de anlaşıldığı gibi polimerdeki sakkarit miktarı arttıkça yüzeydeki hidroksil gruplarından kaynaklı hidrofilik karakter baskın gelmekte ve polimerin sıvı temas açısı küçülmektedir.

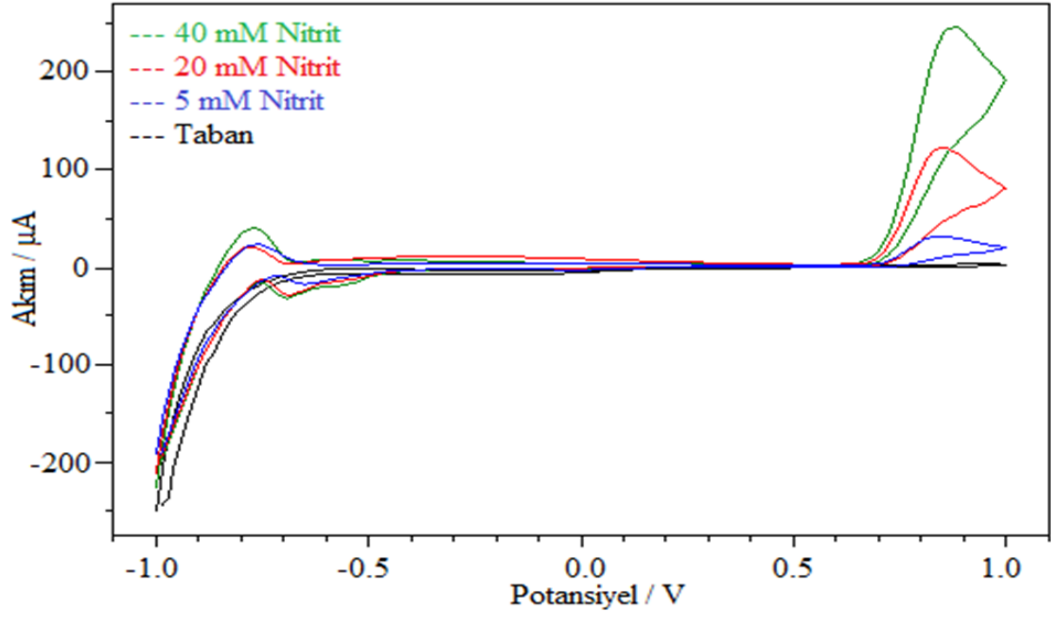


Şekil 4.29. Gliserol içermeyen maltoz temelli poliüretanlara ilişkin sıvı temas açısı görüntüleri.

4.2. Potansiyel Belirleme Çalışmaları

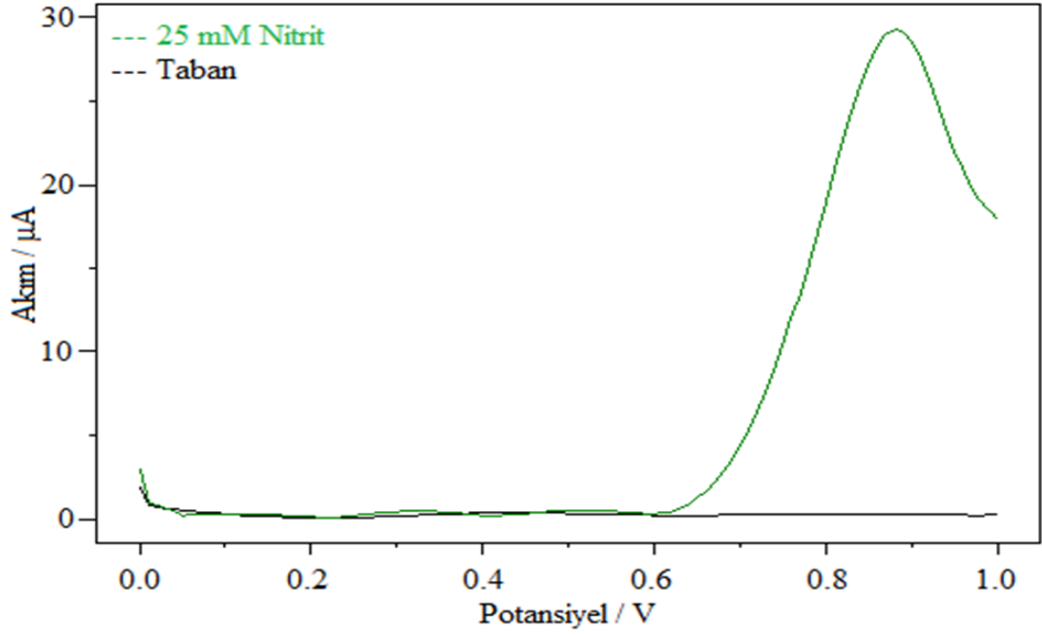
4.2.1. Nitrit için yükseltgenme potansiyelinin belirlenmesi

Çalışmanın temelini oluşturan nitrit ölçümünün, hangi potansiyelde ölçüleceğine karar vermek için CV ve DPV ile ölçümler gerçekleştirildi. Çıplak platin elektrot ile 5, 20 ve 40 mM nitrit için alınan CV eğrileri Şekil 4.30'da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde -1 V - +1 V potansiyel aralığında yapılan ölçümlerde, artan nitrit derişime bağlı olarak platin elektrot yüzeyinde +0,86 V ile +0,88 V arasındaki potansiyellerde nitritin nitrata yükseltgendiği görülmüştür. Bu yükseltgenme 40 mM'lık nitrit derişimi için +0,88 V, 20 mM'lık nitrit derişimi için +0,87 V ve 5 mM'lık nitrit derişimi için +0,86 V'luk potansiyelde gerçekleşmiştir. Yükseltgenme potansiyeli belirlenirken, taban akıma göre en fazla akım değişiminin olduğu potansiyel seçilmiştir.



Şekil 4.30. Nitrit için yükseltgenme potansiyelinin belirlenmesi amacıyla farklı derişimler için alınan CV eğrileri [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C].

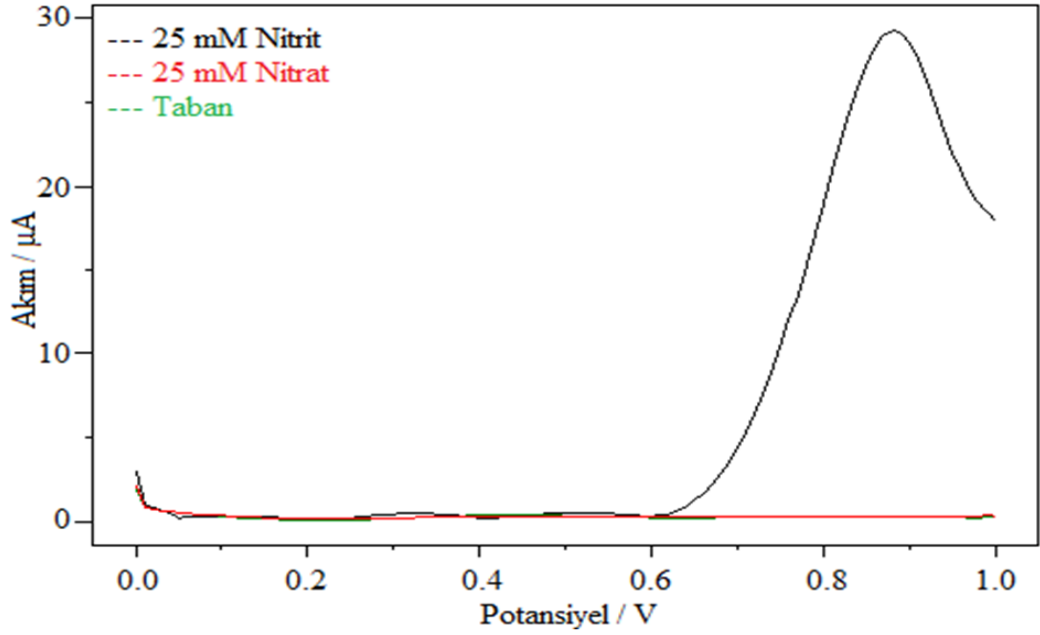
CV ile belirlenen nitritin yükseltgenme potansiyeli için bir de çalışmanın yapılacağı DPV tekniği ile ölçüm alındı. Şekil 4.31’de DPV ile 25 mM nitrit için alınan eğri görölmektedir. Eğri incelendiğinde taban akıma göre en fazla akım değışiminin olduğı potansiyel yani nitritin nitrata yükseltgenme potansiyelinin +0,87 V olduğı görölmüşür.



Şekil 4.31. Nitrit için yükseltgenme potansiyelinin belirlenmesi amacıyla alınan DPV eğrisi [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C].

4.2.2. Nitrat için potansiyel taraması

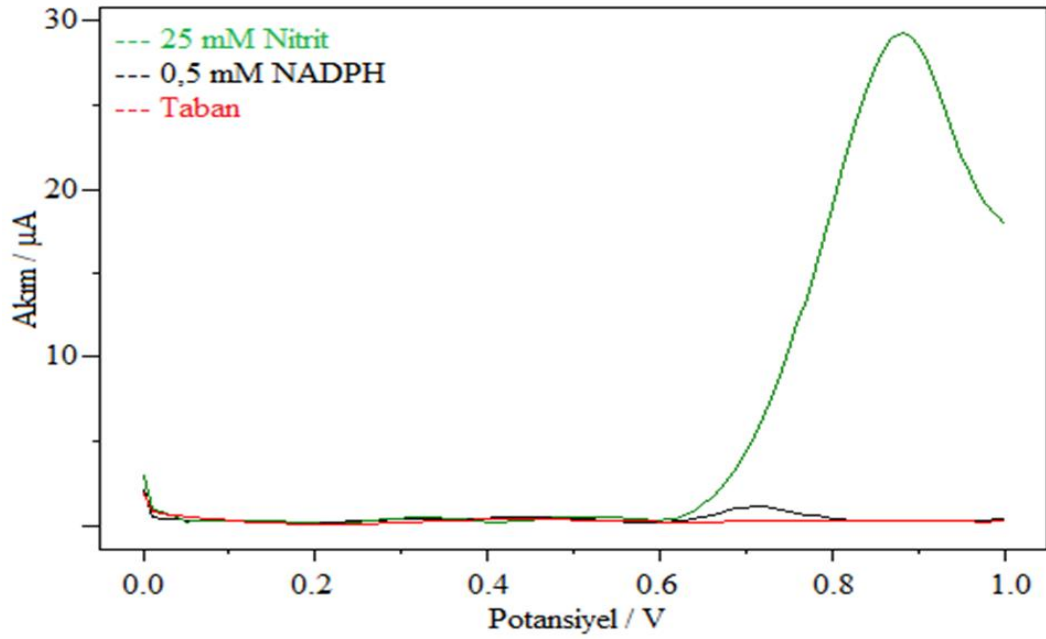
Nitrit için yükseltgenme potansiyeli belirlendikten sonra nitrat için potansiyel taraması yapıldı. Nitritin yükseltgendiği potansiyelde nitratında yükseltgenip yükseltgenmediği incelendi. 25 mM nitrat için 0 V - +1 V aralığında DPV ile yapılan tarama Şekil 4.32’de görülmektedir. Eğri incelendiğinde nitratın bu potansiyeller arasında herhangi bir yükseltgenmeye uğramadığı görülmektedir. Şekil 4.32’de görüldüğü gibi 25 mM nitrat için yapılan ölçüm, 25 mM nitrit için yapılan ölçümle ve taban akımıyla karşılaştırıldığında nitrat için alınan yanıt taban akımıyla aynıdır. Sonuç olarak nitrat, nitritin yükseltgendiği +0,87 V civarında herhangi bir yükseltgenmeye uğramadığı için ölçüm sonuçlarını etkilemeyecektir.



Şekil 4.32. Nitrat için DPV tekniği ile potansiyel taraması [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C].

4.2.3. Koenzim (NADPH) için potansiyel taraması

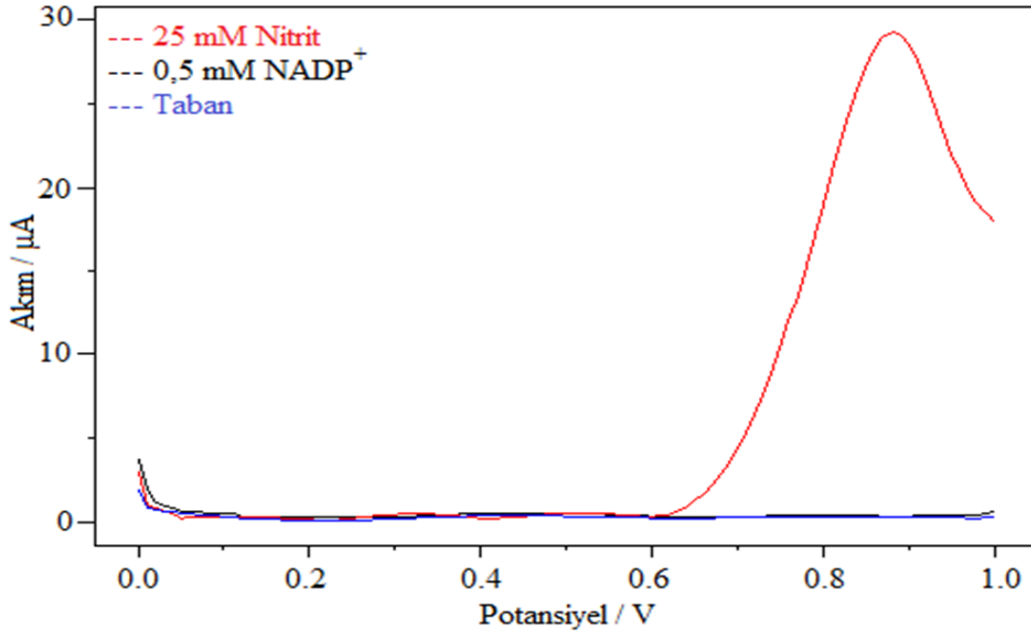
Biyosensörün biyoaktif tabakasında bulunan NR enziminin koenzimi olan ve ölçüm ortamında bulunan NADPH için potansiyel taraması yapıldı. 0,5 mM NADPH için 0 V - +1 V aralığında DPV ile yapılan tarama Şekil 4.33’de görülmektedir. Yapılan potansiyel taraması sonucunda NADPH’nın +0,71 V’luk potansiyelde yükseltgendiği görülmüştür. Şekil 4.33’de verilen 25 mM nitrit ve 0,5 mM NADPH için alınan DPV eğrileri incelendiğinde, koenzim için alınan yanıtın nitrit yanıtı yanında çok küçük olduğu görülmektedir. Biyosensör ölçümlerinde 0,25 mM NADPH kullanıldığı için bu yanıt daha da düşecektir. Sonuç olarak ölçüm ortamında bulunan ve +0,71 V’luk potansiyelde yükseltgenen NADPH’nın, +0,87 V potansiyelde yükseltgenen nitrit sonucunu etkilemeyeceği açıktır.



Şekil 4.33. Koenzim (NADPH) için DPV tekniği ile potansiyel taraması [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C].

4.2.4. NADP^+ için potansiyel taraması

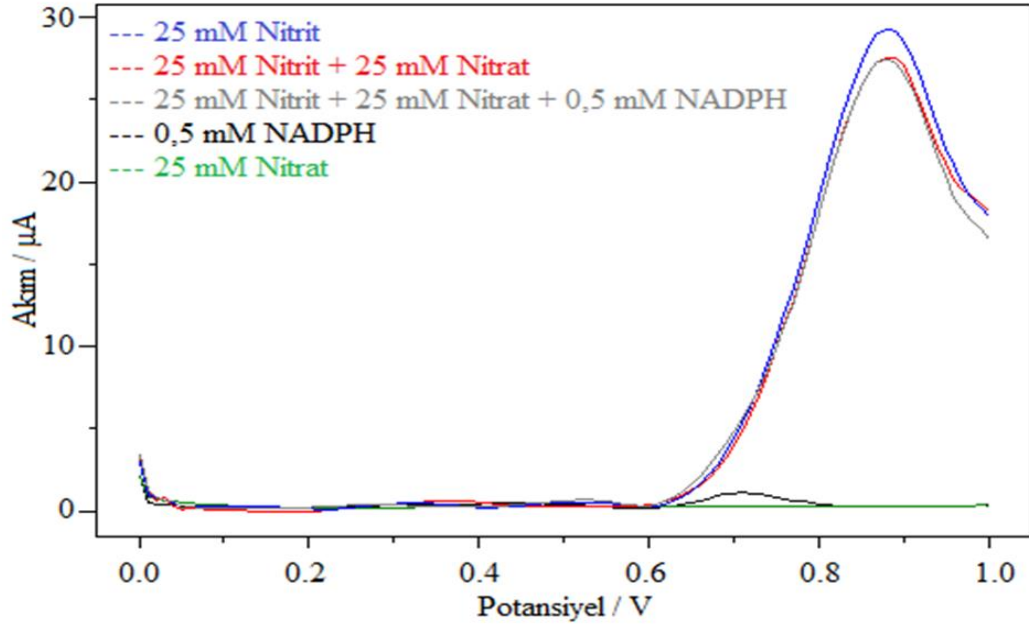
NR enziminin reaksiyonu sonucunda nitrat nitrite indirgenirken koenzim NADPH'da enzimatik reaksiyon sonucu NADP^+ ye yükseltgenmektedir. Ölçüm ortamında başlangıçta bulunmayan, enzimatik reaksiyon sonucunda açığa çıkan NADP^+ 'nin, nitrit için çalışılacak +0,87 V'luk potansiyelde herhangi bir yanıt verip vermediği incelenmiştir. Şekil 4.34'de 0,5 mM NADP^+ için 0 V - +1 V aralığında DPV ile yapılan tarama gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi 0,5 mM NADP^+ için alınan ölçüm, 25 mM nitrit için alınan ölçümle ve taban akımıyla karşılaştırıldığında 0,5 mM NADP^+ için alınan yanıtın taban akımıyla aynı olduğu görülmektedir. Sonuç olarak NADP^+ , nitritin yükseltgendiği +0,87 V civarında herhangi bir yükseltgenmeye uğramadığı için ölçüm sonuçlarını etkilemeyecektir.



Şekil 4.34. NADP⁺ için DPV tekniği ile potansiyel taraması [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].

4.2.5. Ölçüm çözeltisinde bulunan nitrat ve koenzimin nitrit yanıtına etkisi

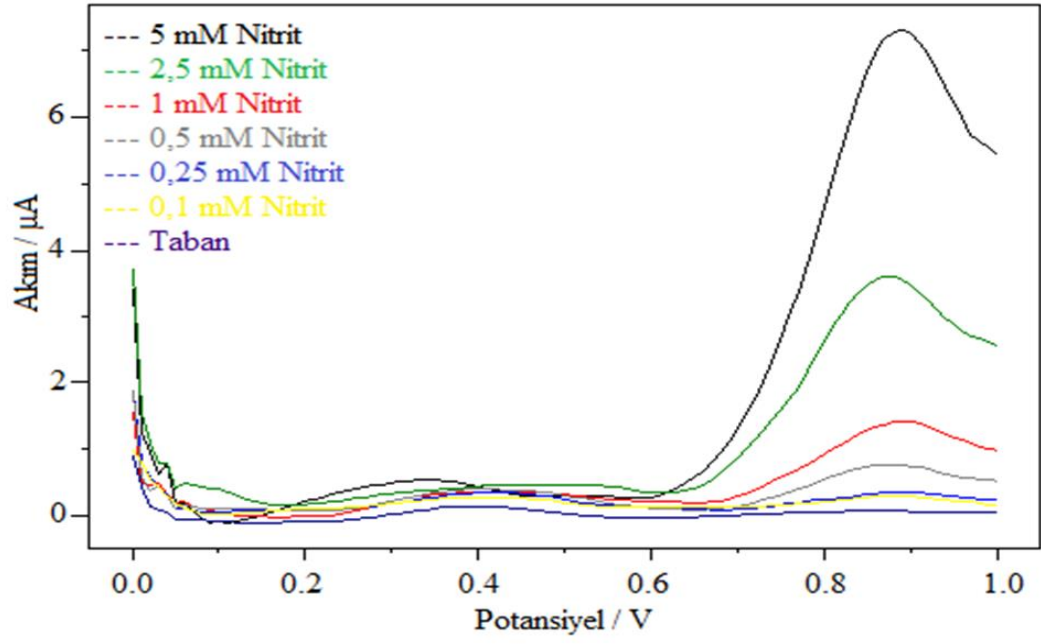
Ölçüm ortamında bulunacak nitrat ve koenzimin nitrit yanıtı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Şekil 4.35’de ortamda nitrat ve koenzim varken ölçümü alınan 25 mM’lık nitritin DPV eğrileri görülmektedir. Eğriler incelendiğinde ortamda nitrit ve nitrat varken alınan +0,87 V’da ki ölçüm sonucu sadece nitrit varken alınan ölçüm sonucuna göre % 3 düşüş göstermiştir. Bu düşüşün nedeni ortamda nitrat varken nitritin elektrot yüzeyine ulaşmasını sterik olarak engellediğinden dolayıdır. Ortamda nitrit, nitrat ve koenzim varken alınan +0,87 V’da ki ölçüm sonucu nitrit ve nitrat varken alınan ölçüm sonucuyla karşılaştırıldığında ise alınan yanıtlarda % 0,1’lik bir düşüş görülmüştür. Sonuç olarak ortamda bulunabilecek nitrat ve koenzimin azda olsa nitrit için alınan yanıtı etkilediği görülmüştür.



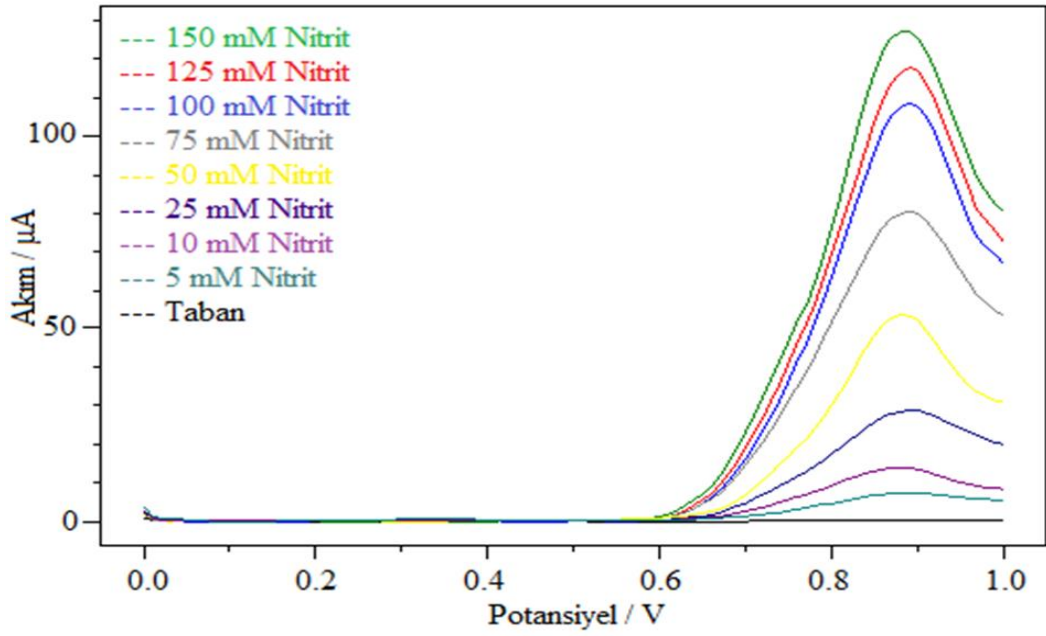
Şekil 4.35. Ölçüm çözeltisinde bulunan nitrat ve koenzimin nitrit yanıtına etkisi [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C].

4.3. Çıplak Platin Elektrot ile Nitrit Tayin Aralığının Belirlenmesi

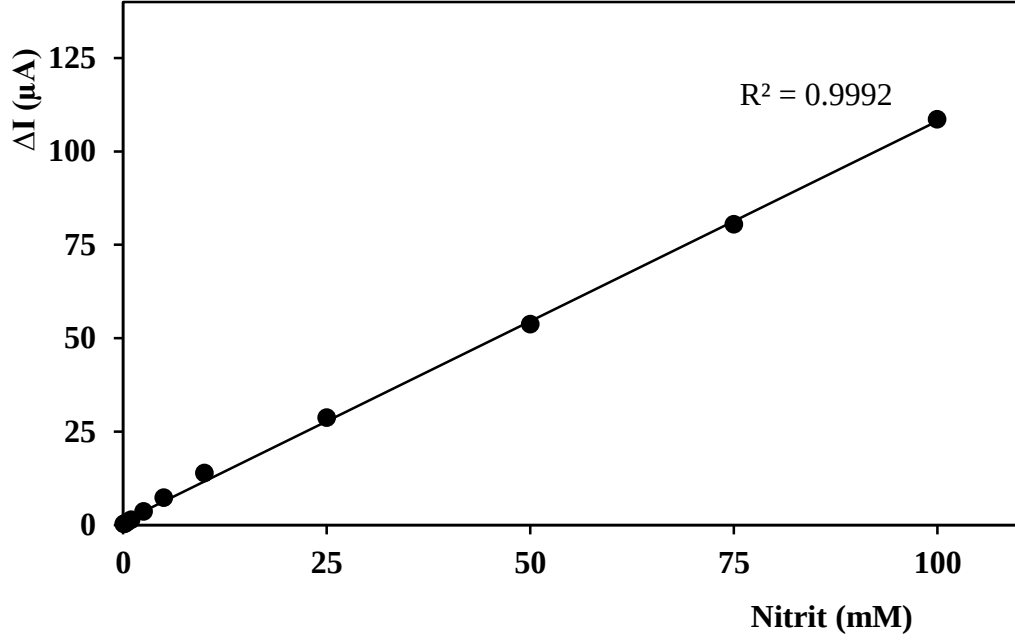
Çıplak platin elektrotla hangi derişim aralığında nitrit tayini yapılacağını belirlenmesi amacıyla 0,1 mM ile 150 mM arasında gerçekleştirilen DPV ölçüm sonuçları Şekil 4.36 ve Şekil 4.37’de gösterilmiştir. DPV eğrilerine bakıldığında artan nitrit derişimine bağlı olarak +0,87 V’luk potansiyelde taban akıma göre meydana gelen artışlar görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi çıplak platin elektrotla okunan en düşük nitrit derişimi 0,1 mM’dır. 0,1 mM’ın altındaki nitrit derişimlerin de okuma yapılamamıştır. Ayrıca 100 mM’ın üstündeki nitrit derişimlerinde doğrusallıktan sapma gözlenmiştir. 0,1 mM – 100 mM aralığında ki nitrit derişimlerine karşılık akımdaki değişimler grafiğe geçirildiğinde Şekil 4.38’deki doğrusal grafik elde edilmiştir. Grafiğin R^2 değeri 0,9992 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.36. Çıplak platin elektrotla 0,1 mM – 5 mM aralığındaki nitrit derişimleri için alınan DPV eğrileri [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



Şekil 4.37. Çıplak platin elektrotla 5 mM – 150 mM aralığındaki nitrit derişimleri için alınan DPV eğrileri [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



Şekil 4.38. 0,1 mM – 100 mM aralığındaki nitrit derişimlerine karşılık akımdaki değışimleri gösteren doğrusal grafik [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; çıplak platin elektrot; DPV].

4.4. Platin Elektrodun Çeşitli Polimerlerle Kaplanması

Enzimin platin elektrot yüzeyine tutuklanmasını sağlayacak olan polimerler ile elektrotların kaplanması ve nitrit ölçümleri gerçekleştirildi. Bu amaç doğrultusunda fruktoz, maltoz, laktoz, ksiloz ve gliserol içermeyen maltoz temelli 5 farklı polimer serisi kullanılarak elektrotlar polimerler ile kaplandı. Elektrotlar polimer ile kaplanırken maliyeti yüksek olan NR enziminin aşırı sarfiyatını önlemek amacıyla polimer kaplaması enzimsiz olarak yapıldı.

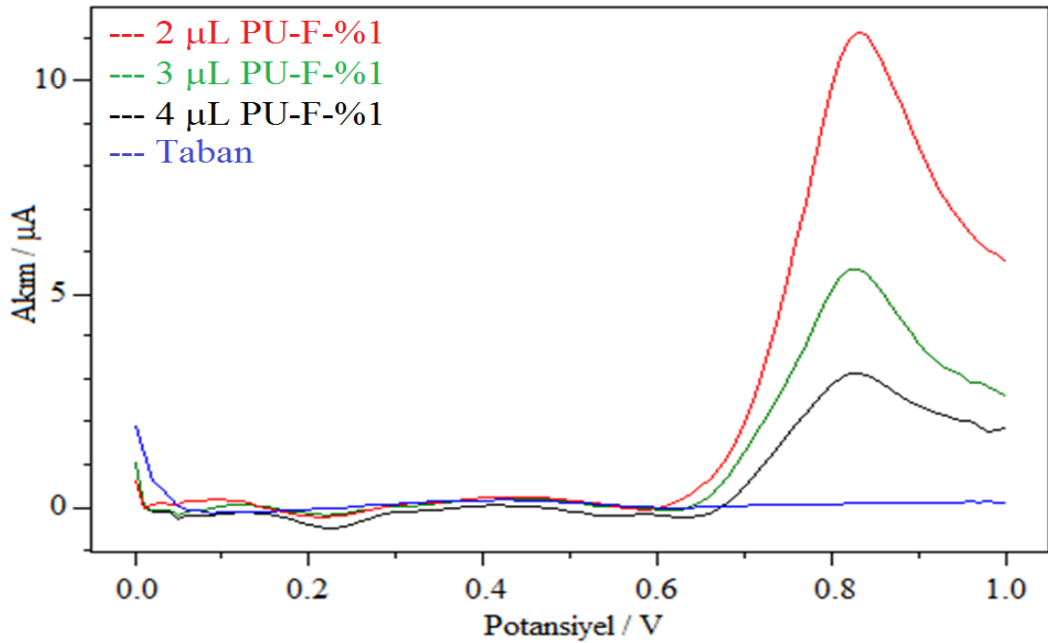
4.4.1. Platin elektrodun fruktoz temelli polimer serisiyle kaplanması

Bu amaç doğrultusunda, temizlenmiş çıplak platin elektrotlar fruktoz temelli PU-F-%1, PU-F-%3, PU-F-%5 ve PU-F-%10 polimerleri ile kaplanmıştır.

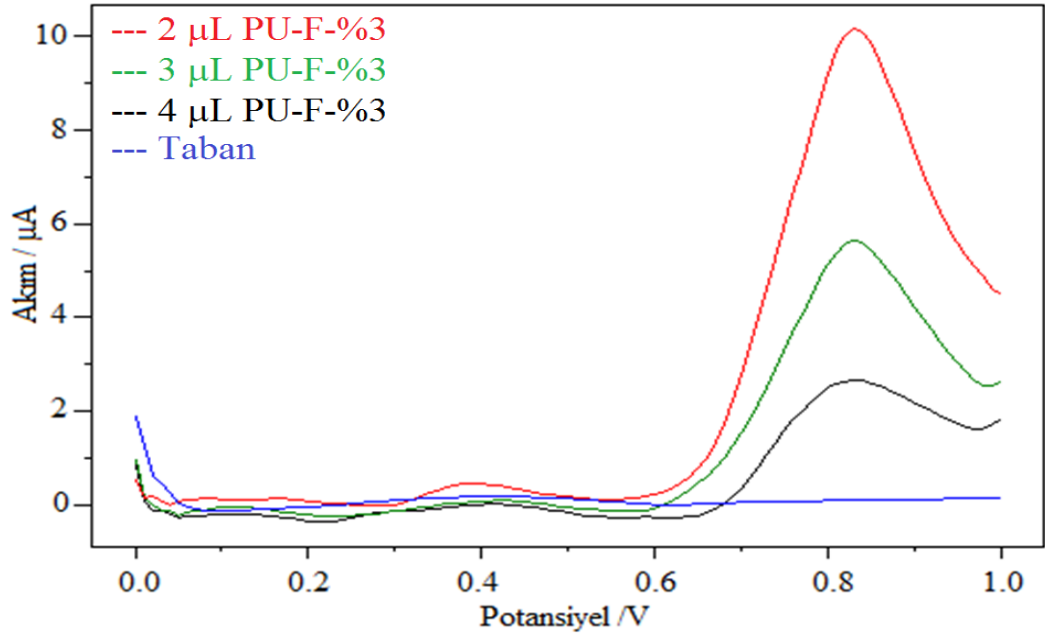
Fruktoz temelli her bir polimer serisi için temizlenmiş çıplak platin elektrot yüzeyi 2, 3 ve 4 μL polimer ile kaplanmış ve 25 mM'lık nitrit çözeltisi için ölçümler

gerçekleştirilmiştir. PU-F-%1 polimeri için elde edilen DPV eğrileri Şekil 4.39’da, PU-F-%3 polimeri için elde edilen DPV eğrileri Şekil 4.40’da, PU-F-%5 polimeri için elde edilen DPV eğrileri Şekil 4.41’de ve PU-F-%10 polimeri için elde edilen DPV eğrileri Şekil 4.42’de verilmiştir.

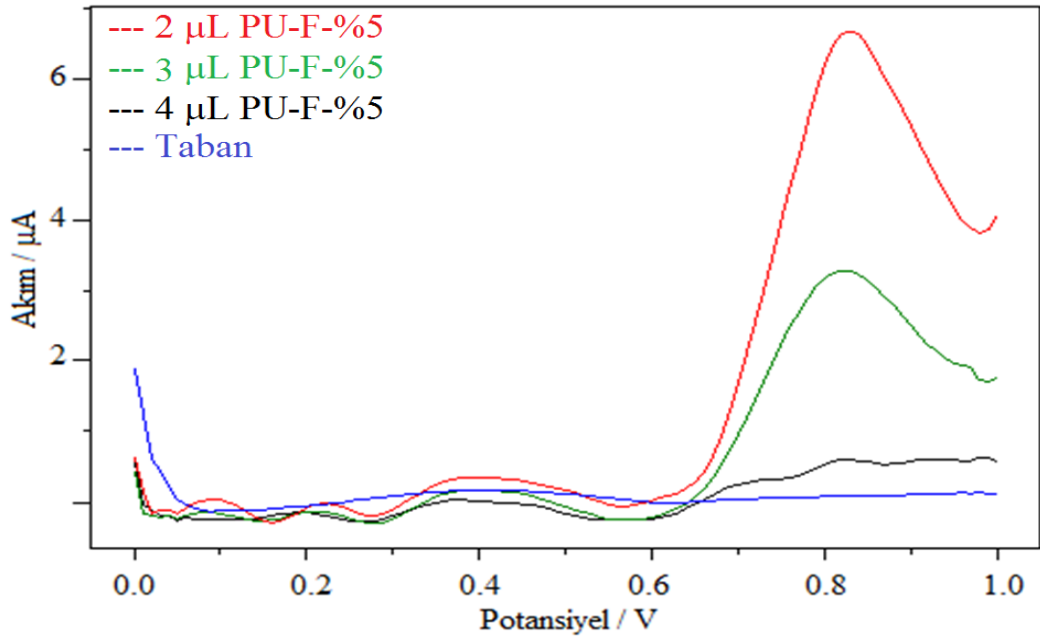
PU-F-%1 polimeri ile yapılan ölçümler incelendiğinde en yüksek yanıtın 2 μL polimer damlatılarak hazırlanan platin elektrot ile alındığı görülmektedir. 25 mM nitrit için çıplak platin elektrotla gerçekleştirilen elektrokimyasal ölçümde akımda 28,7 μA ’lık bir değişim meydana gelmişken, elektrot 2 μL PU-F-%1 polimeri ile kaplanıp ölçüm alındığında bu yanıt 11,1 μA ’e düşmüştür. Aynı şekilde 3 farklı hacimde PU-F-%3 polimeri ile yapılan ölçümlerde en yüksek yanıt 2 μL PU-F-%3 polimeri ile alınmıştır. Bu ölçüm için akımda meydana gelen değişim 10,2 μA olarak bulunmuştur. PU-F-%5 ve PU-F-%10 polimeri için yapılan ölçümlerde 2 μL polimer için akımda meydana gelen değişimler sırasıyla 6,7 μA ve 1,9 μA olarak bulunmuştur.



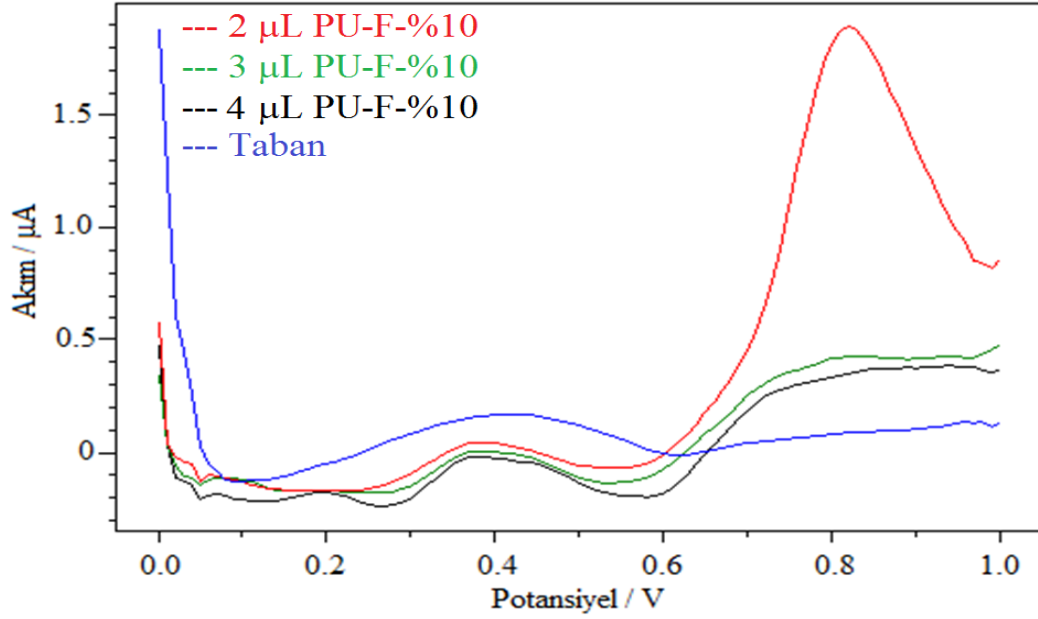
Şekil 4.39. Platin elektrodun PU-F-%1 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; DPV].



Şekil 4.40. Platin elektrodun PU-F-%3 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; DPV].



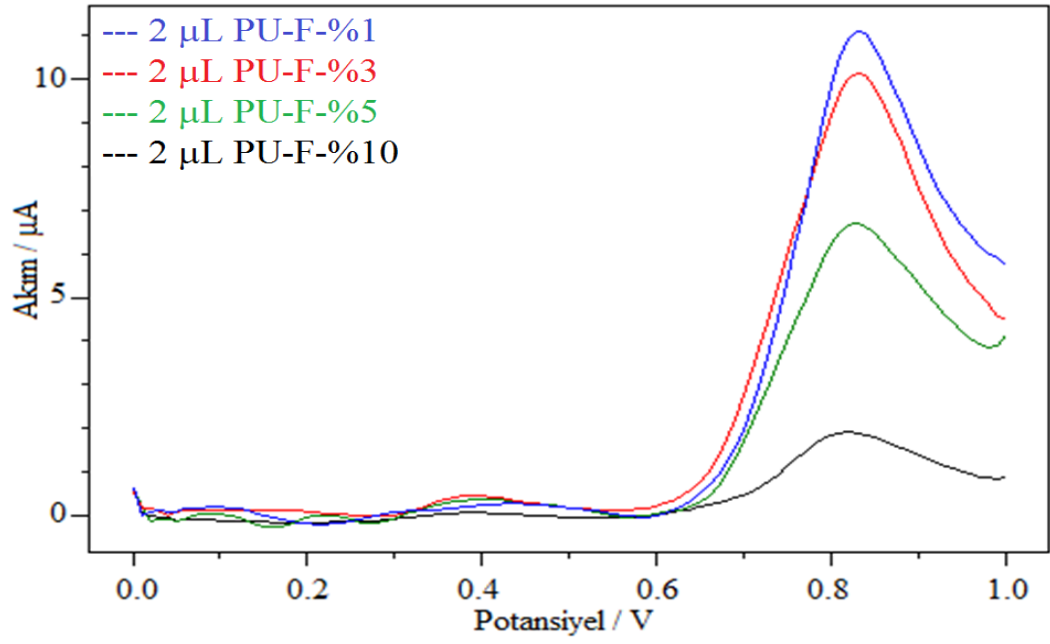
Şekil 4.41. Platin elektrodun PU-F-%5 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; DPV].



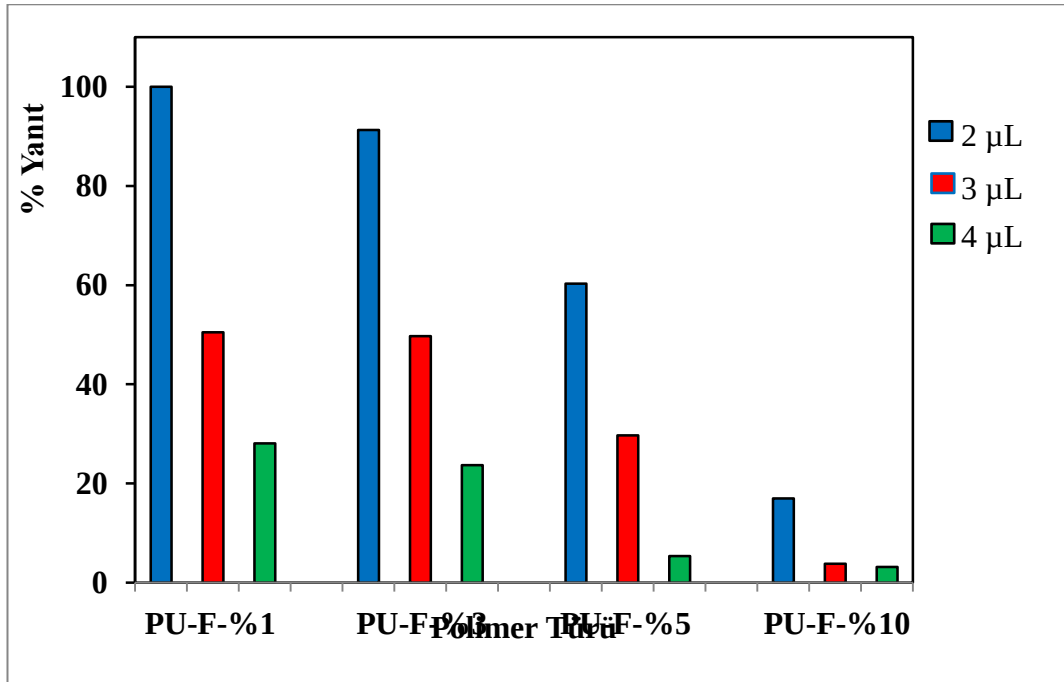
Şekil 4.42. Platin elektrodun PU-F-%10 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; DPV].

4.4.1.1. Fruktöz temelli polimerler için elde edilen yanıtların karşılaştırılması

PU-F-%1, PU-F-%3, PU-F-%5 ve PU-F-%10 polimerleriyle hazırlanan elektrotlar için yapılan ölçümler incelendiğinde, 4 polimer türü için de en yüksek yanıtlar 2 μ L polimer damlatılarak hazırlanan elektrotlarla alınmıştır. 2 μ L polimer damlatılarak hazırlanan elektrotlar ile elde edilen DPV eğrileri Şekil 4.43'de verilmiştir. 4 farklı polimer türü ile 3 farklı hacimde gerçekleştirilen 25 mM nitrit ölçümleri için en yüksek yanıt 2 μ L PU-F-%1 polimeriyle hazırlanan elektrot ile alındığı görülmüştür. En yüksek yanıtın alındığı bu elektrot için elde edilen akım farkı 100 kabul edilip, diğer polimerlerle hazırlanan elektrotlar için elde edilen akım farkları buna göre oranlandığında elde edilen sonuçlar Şekil 4.44'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde 2 μ L PU-F-%3 için elde edilen yanıtta en yüksek yanıtla göre % 9'luk, 2 μ L PU-F-%5 için % 40'luk, 2 μ L PU-F-%10 için ise % 83'lük bir düşüş görülmektedir. Polimer içerisindeki fruktoz miktarı arttıkça yanıtlarda gözlenen düşüş polimer yapısı içerisindeki artan çapraz bağ sayısından kaynaklanmaktadır. Sonuç olarak biyosensör hazırlanırken en yüksek yanıtın alındığı 2 μ L PU-F-%1 polimerinin kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.43. PU-F-%1, PU-F-%3, PU-F-%5 ve PU-F-%10 polimerleri için alınan en yüksek yanıtlar [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C; DPV].



Şekil 4.44. PU-F-%1, PU-F-%3, PU-F-%5 ve PU-F-%10 polimerleri için alınan bütün yanıtların karşılaştırılması.

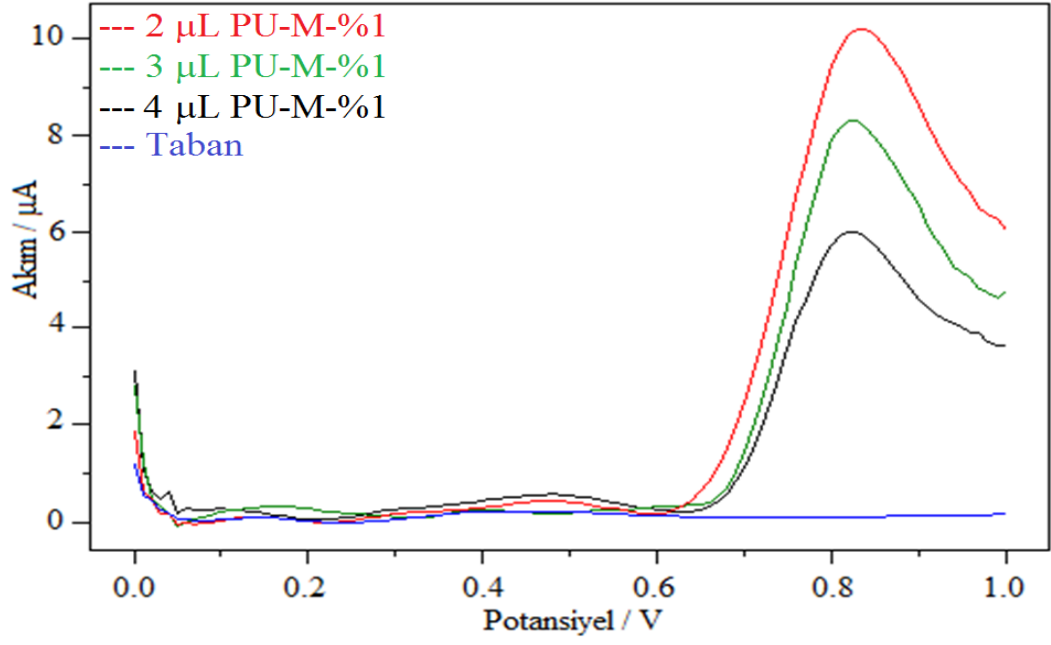
4.4.2. Platin elektrodun maltoz temelli polimer serisiyle kaplanması

Bu amaç doğrultusunda temizlenmiş çıplak platin elektrotlar PU-M-%1, PU-M-%3, PU-M-%5 ve PU-M-%10 polimerleri ile kaplanmıştır.

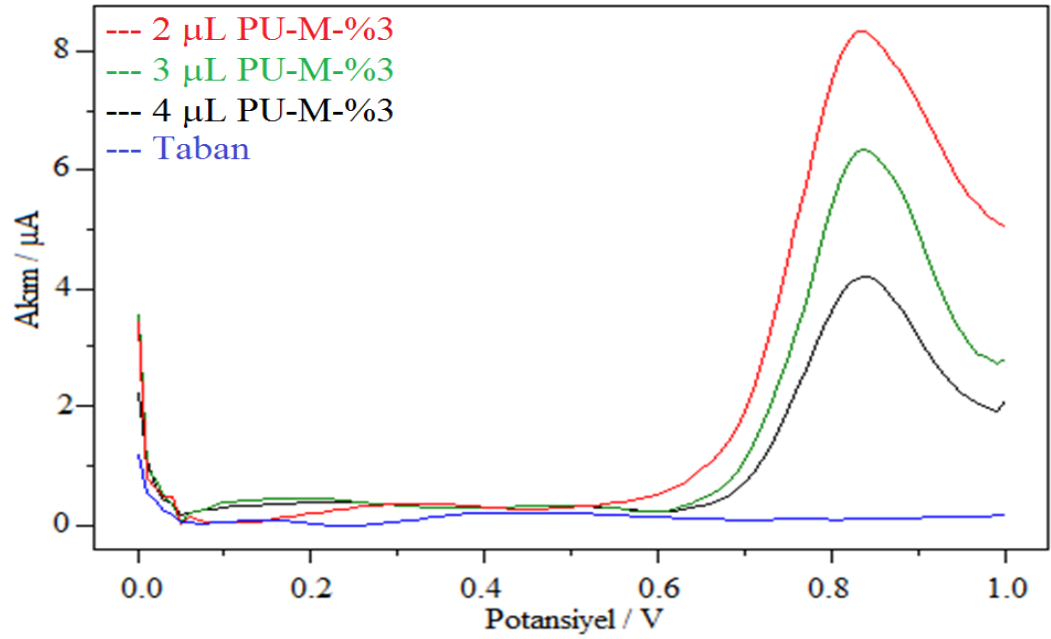
Temizlenmiş çıplak platin elektrot yüzeyleri 2, 3 ve 4 μ L maltoz temelli polimer serisi ile kaplanmış ve her biri için 25 mM'lık nitrit çözeltisi ile ölçümler gerçekleştirilmiştir. PU-M-%1 polimeri için elde edilen DPV eğrileri Şekil 4.45'de, PU-M-%3 polimeri için elde edilen DPV eğrileri Şekil 4.46'da, PU-M-%5 polimeri için elde edilen DPV eğrileri Şekil 4.47'de ve PU-M-%10 polimeri için elde edilen DPV eğrileri Şekil 4.48'de verilmiştir.

Farklı hacimlerdeki maltoz temelli polimer serisi için yapılan ölçümler incelendiğinde 2 μ L PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan elektrotla en yüksek yanıtın alındığı görülmektedir. 25 mM nitrit için çıplak platin elektrotla gerçekleştirilen elektrokimyasal ölçümde akımda 28,7 μ A'lık bir değişim meydana gelmişken, elektrot 2 μ L PU-M-%1 polimeri ile kaplanıp ölçüm alındığında bu yanıt 10,2 μ A'e düşmüştür. Aynı şekilde 3 farklı hacimde PU-M-%3 polimeri ile yapılan ölçümlerde en yüksek yanıt 2 μ L PU-M-%3 polimeri ile alınmıştır. Bu ölçüm için akımda meydana gelen değişim 8,3 μ A olarak bulunmuştur. PU-M-%5 ve PU-M-%10 polimeri için yapılan 25 mM'lık nitrit ölçümlerinde 2 μ L polimer için akımda meydana gelen değişimler sırasıyla 7,7 μ A ve 3,3 μ A olarak bulunmuştur.

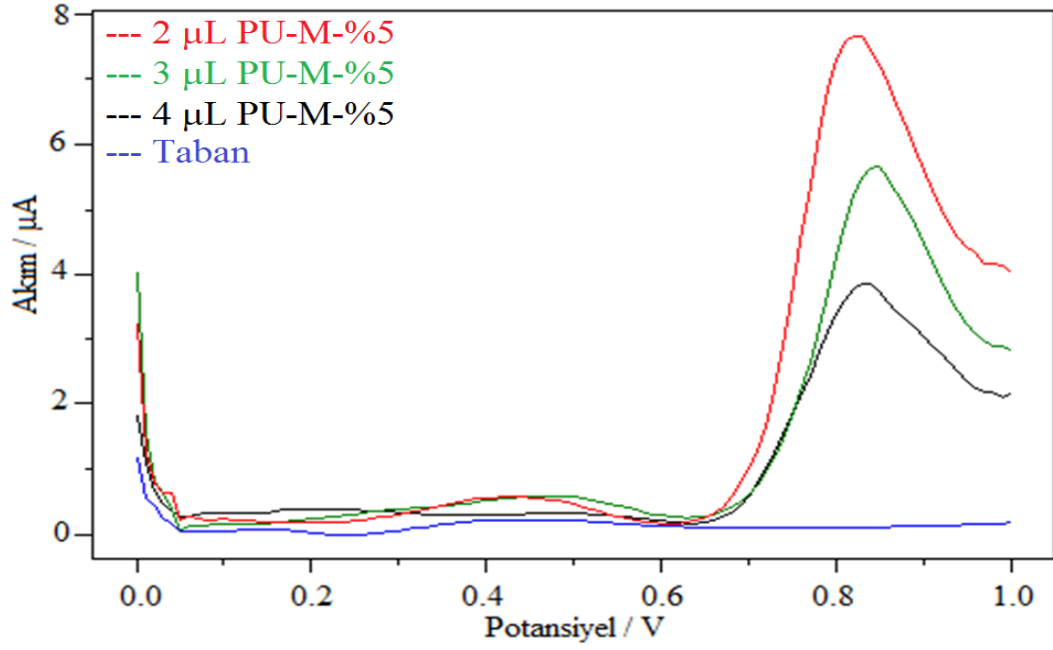
Dört farklı polimer türü için sonuçlar incelendiğinde platin elektrot yüzeyine damlatılan polimer miktarı arttıkça alınan yanıtlardaki düşüşler görülmektedir. En düşük yanıtlar 4 μ L polimer damlatılarak elde edilen elektrotlarla alınmıştır. Hem polimer miktarı hem de sakkarit oranı arttıkça yanıtlarda meydana gelen düşme difüzyon tabakasının kalınlaşmasından, gözenek boyutunun azalmasından ve artan çapraz bağ sayısından kaynaklanmıştır.



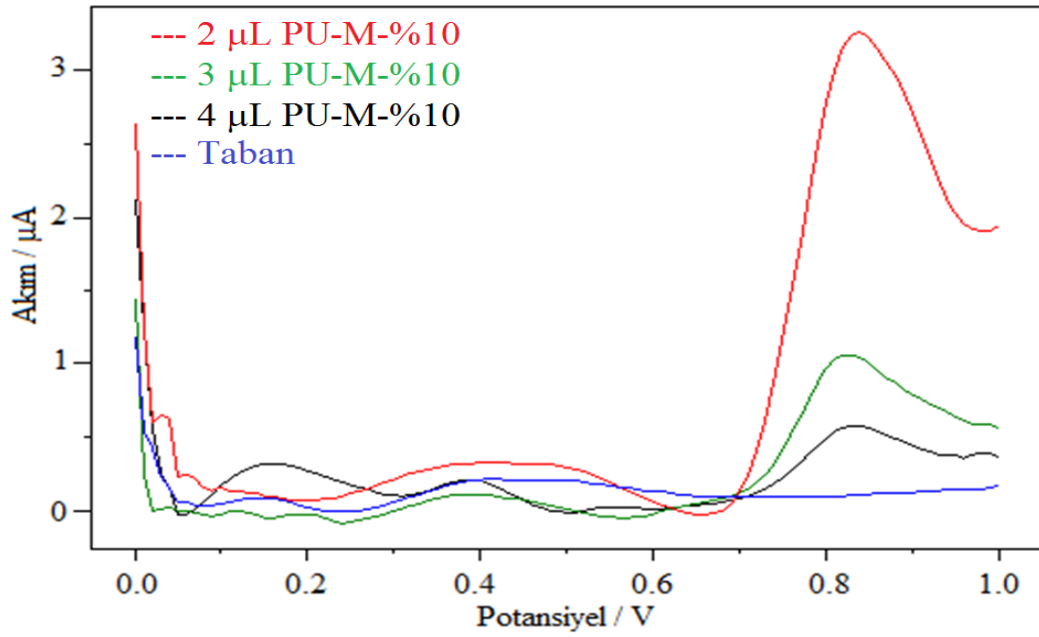
Şekil 4.45. Platin elektrodun PU-M-%1 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; DPV].



Şekil 4.46. Platin elektrodun PU-M-%3 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; DPV].



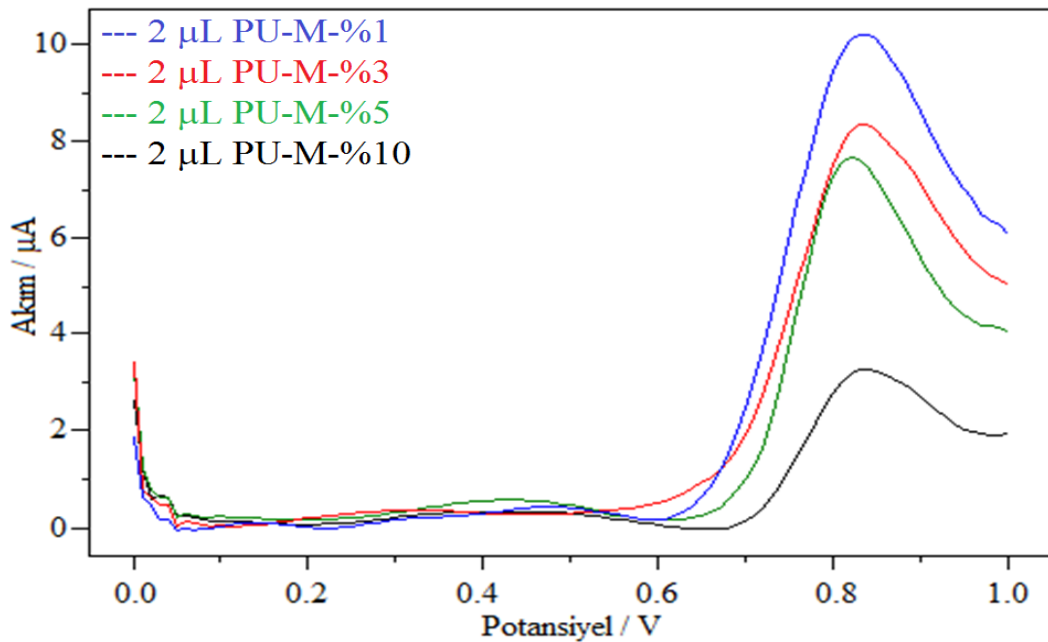
Şekil 4.47. Platin elektrodun PU-M-%5 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; DPV].



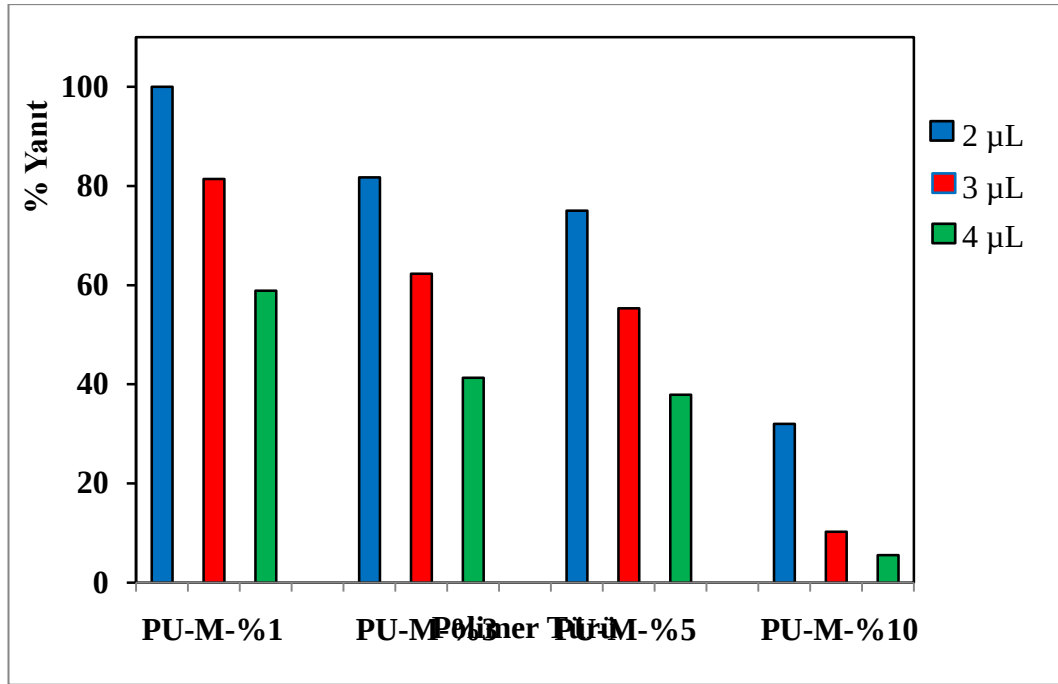
Şekil 4.48. Platin elektrodun PU-M-%10 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; DPV].

4.4.2.1. Maltoz temelli polimerler için elde edilen yanıtların karşılaştırılması

4 farklı maltoz türü (PU-M-%1, PU-M-%3, PU-M-%5, PU-M-%10) ile 3 farklı hacimde hazırlanan elektrotlar için yapılan ölçümler incelendiğinde, en yüksek yanıtlar 2 μ L polimer damlatılarak hazırlanan elektrotlarla alınmıştır. 2 μ L polimer damlatılarak hazırlanan elektrotlar ile 25 mM nitrit ölçümleri için elde edilen DPV eğrileri Şekil 4.49’da verilmiştir. Grafik incelendiğinde en yüksek yanıtın 2 μ L PU-M-%1 polimeriyle hazırlanan elektrot ile alındığı görülmüştür. En yüksek yanıtın alındığı bu elektrot için elde edilen akım farkı 100 kabul edilip, diğer polimerlerle hazırlanan elektrotlar için elde edilen akım farkları buna göre oranlandığında elde edilen sonuçlar Şekil 4.50’de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde 2 μ L PU-M-%3 için elde edilen yanıtta en yüksek yanıtla göre % 18’lik, 2 μ L PU-M-%5 için % 25’lik, 2 μ L PU-M-%10 için ise % 68’lik bir düşüş görülmektedir. Sonuçlar incelendiğinde polimer miktarının artışıyla kalınlaşan tabakanın substrat ve koenzim geçişine izin vermediği görülmektedir. Ayrıca polimer içerisindeki maltoz miktarı arttıkça artan çapraz bağ sayısı yine madde geçişine izin vermemektedir ve biyosensör yanıtlarında düşüşler gözlenmektedir. Sonuç olarak maltoz serisinden biyosensör hazırlanırken en yüksek yanıtın alındığı 2 μ L PU-M-%1 polimerinin kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.49. PU-M-%1, PU-M-%3, PU-M-%5 ve PU-M-%10 polimerleri için alınan en yüksek yanıtlar [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C; DPV].



Şekil 4.50. PU-M-%1, PU-M-%3, PU-M-%5 ve PU-M-%10 polimerleri için alınan bütün yanıtların karşılaştırılması.

4.4.3. Platin elektrodun laktoz temelli polimer serisiyle kaplanması

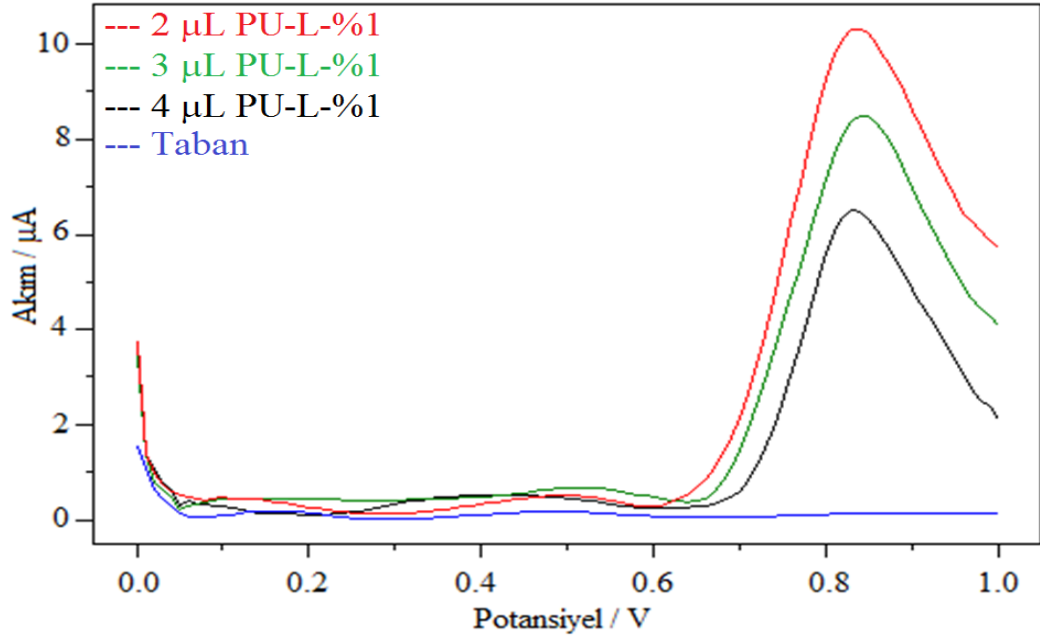
Bu amaç doğrultusunda platin elektrotlar PU-L-%1, PU-L-%3, PU-L-%5 ve PU-L-%10 polimerleri ile kaplanmıştır.

Platin elektrot yüzeyleri 3 farklı hacimde (2, 3 ve 4 µL) laktoz temelli polimer serileri ile kaplanmış ve her biri için 25 mM'lık nitrit çözeltisi ile ölçümler gerçekleştirilmiştir. PU-L-%1 polimeri için elde edilen DPV eğrileri Şekil 4.51'de, PU-L-%3 polimeri için elde edilen DPV eğrileri Şekil 4.52'de, PU-L-%5 polimeri için elde edilen DPV eğrileri Şekil 4.53'de ve PU-L-%10 polimeri için elde edilen DPV eğrileri Şekil 4.54'de verilmiştir.

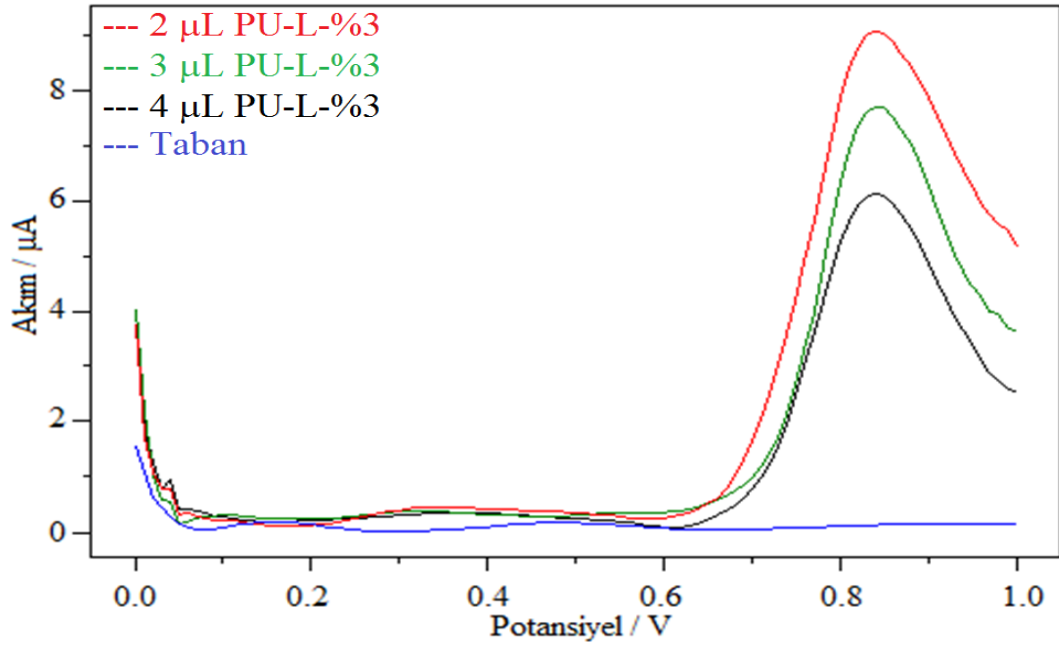
Laktoz temelli polimer serisi için yapılan ölçümler incelendiğinde 2 µL PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan elektrotla en yüksek yanıtın alındığı görülmektedir. 25 mM nitrit için çıplak platin elektrotla gerçekleştirilen elektrokimyasal ölçümde akımda 28,7 µA'lık bir değişim meydana gelmişken, elektrot 2 µL PU-L-%1 polimeri ile kaplanıp ölçüm alındığında bu yanıt 10,3 µA'e düşmüştür. Aynı şekilde PU-L-%3 polimeri ile yapılan ölçümlerde en yüksek yanıt 2 µL PU-L-%3 polimeri

ile alınmıştır. Bu ölçüm için akımda meydana gelen değişim 9,1 μA olarak bulunmuştur. PU-L-%5 ve PU-L-%10 polimeri için yapılan 25 mM'lık nitrit ölçümlerinde 2 μL polimer için akımda meydana gelen değişimler sırasıyla 8,0 μA ve 3,6 μA olarak bulunmuştur.

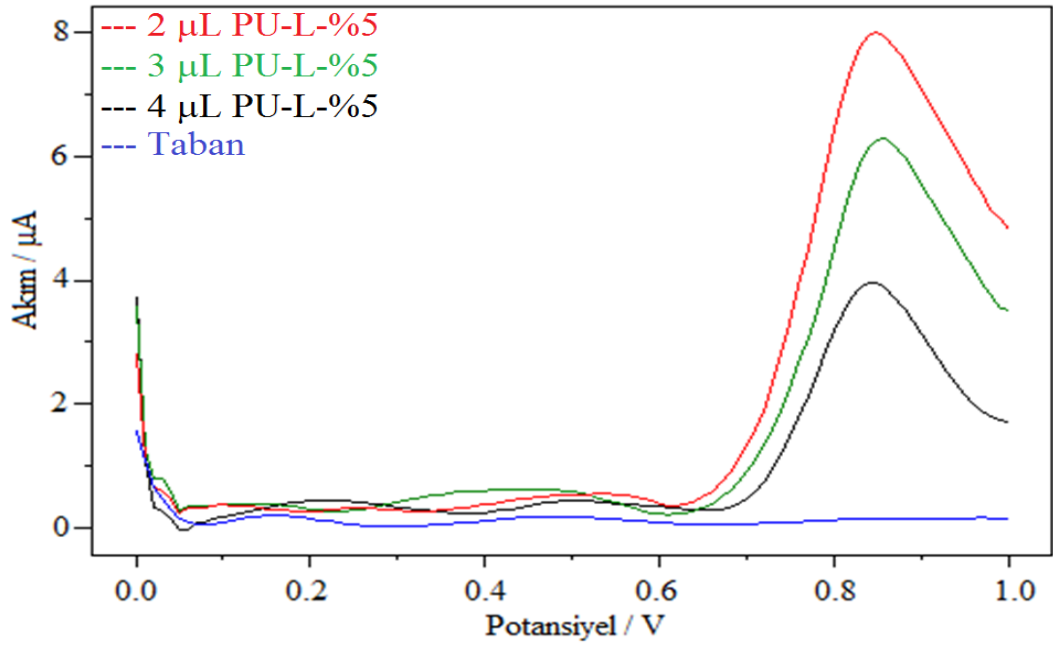
Laktoz temelli polimer serisi için sonuçlar incelendiğinde platin elektrot yüzeyine damlatılan polimer miktarı arttıkça alınan yanıtlardaki düşüşler görülmektedir. En düşük yanıtlar 4 μL , daha sonrada 3 μL polimer damlatılarak elde edilen elektrotlarla alınmıştır. Hem polimer miktarı hem de sakkarit oranı arttıkça yanıtlarda meydana gelen düşme difüzyon tabakasının kalınlaşmasından, gözenek boyutunun azalmasından ve artan çapraz bağ sayısından kaynaklanmıştır.



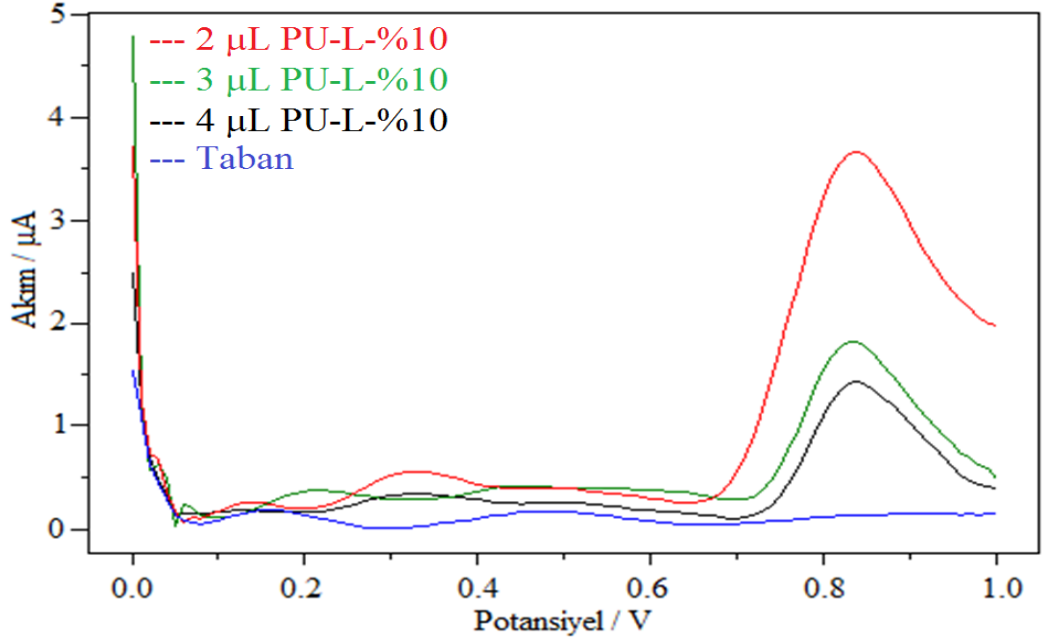
Şekil 4.51. Platin elektrodun PU-L-%1 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; DPV].



Şekil 4.52. Platin elektrodun PU-L-%3 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; DPV].



Şekil 4.53. Platin elektrodun PU-L-%5 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; DPV].

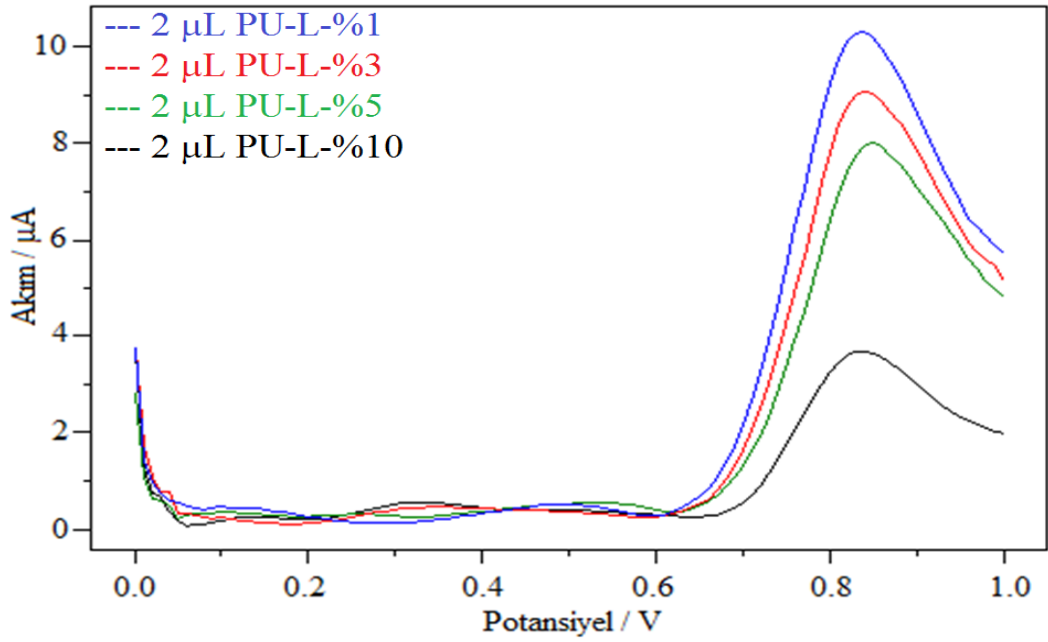


Şekil 4.54. Platin elektrodun PU-L-%10 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; DPV].

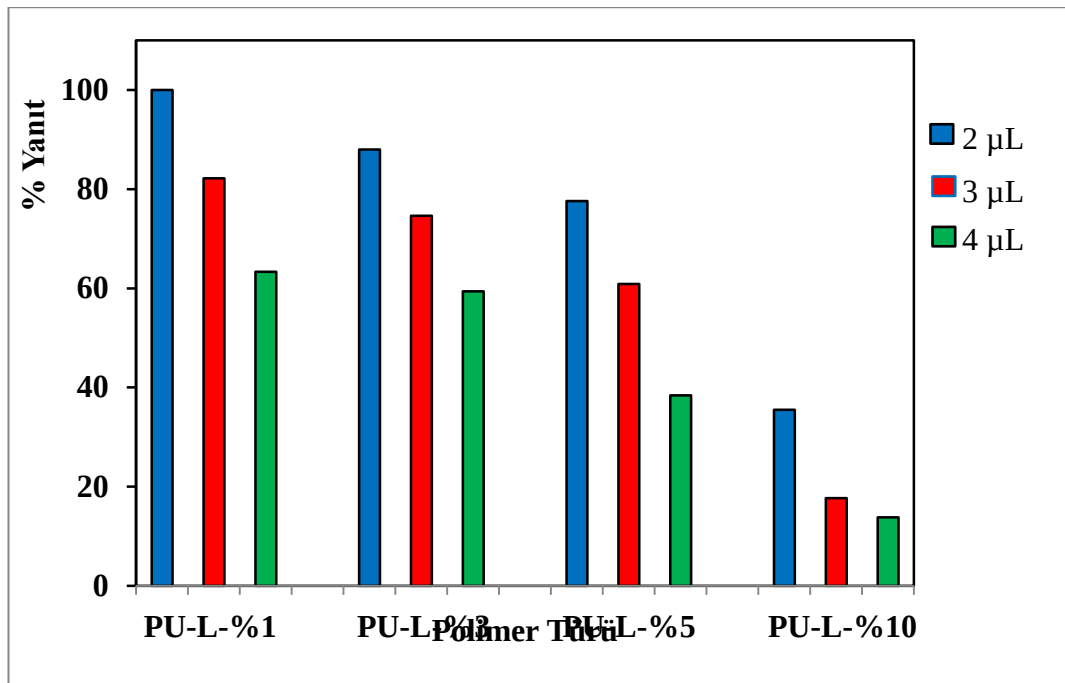
4.4.3.1. Laktoz temelli polimerler için elde edilen yanıtların karşılaştırılması

PU-L-%1, PU-L-%3, PU-L-%5 ve PU-L-%10 polimerleriyle hazırlanan elektrotlar için yapılan ölçümler incelendiğinde, 4 polimer türü için de en yüksek yanıtlar 2 µL polimer damlatılarak hazırlanan elektrotlarla alınmıştır. 2 µL polimer damlatılarak hazırlanan elektrotlar ile elde edilen DPV eğrileri Şekil 4.55’de verilmiştir. 4 farklı polimer türü ile 3 farklı hacimde gerçekleştirilen 25 mM nitrit ölçümleri için en yüksek yanıt 2 µL PU-L-%1 polimeriyle hazırlanan elektrot ile alındığı görülmüştür. En yüksek yanıtın alındığı bu elektrot için elde edilen akım farkı 100 kabul edilip, diğer polimerlerle hazırlanan elektrotlar için elde edilen akım farkları buna göre oranlandığında elde edilen sonuçlar Şekil 4.56’da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde 2 µL PU-L-%3 için elde edilen yanıtta en yüksek yanıtı göre % 12’lik, 2 µL PU-L-%5 için % 22’lik, 2 µL PU-L-%10 için ise % 64’lük bir düşüş görülmektedir. Polimer içerisindeki artan laktoz miktarı daha ağırsı bir yapı elde edilmesine ve böylece madde geçişinin engellenmesine neden olmuştur. Artan polimer miktarıda platin elektrot yüzeyinde daha kalın bir difüzyon bariyeri oluşmasına ve böylece elektrot yüzeyine ulaşan nitrit miktarında da düşüşe sebebiyet

vermiştir. Sonuç olarak laktoz serisinden biyosensör hazırlanırken en yüksek yanıtın alındığı 2 μL PU-L-%1 polimerinin kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.55. PU-L-%1, PU-L-%3, PU-L-%5 ve PU-L-%10 polimerleri için alınan en yüksek yanıtlar [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; DPV].



Şekil 4.56. PU-L-%1, PU-L-%3, PU-L-%5 ve PU-L-%10 polimerleri için alınan bütün yanıtların karşılaştırılması.

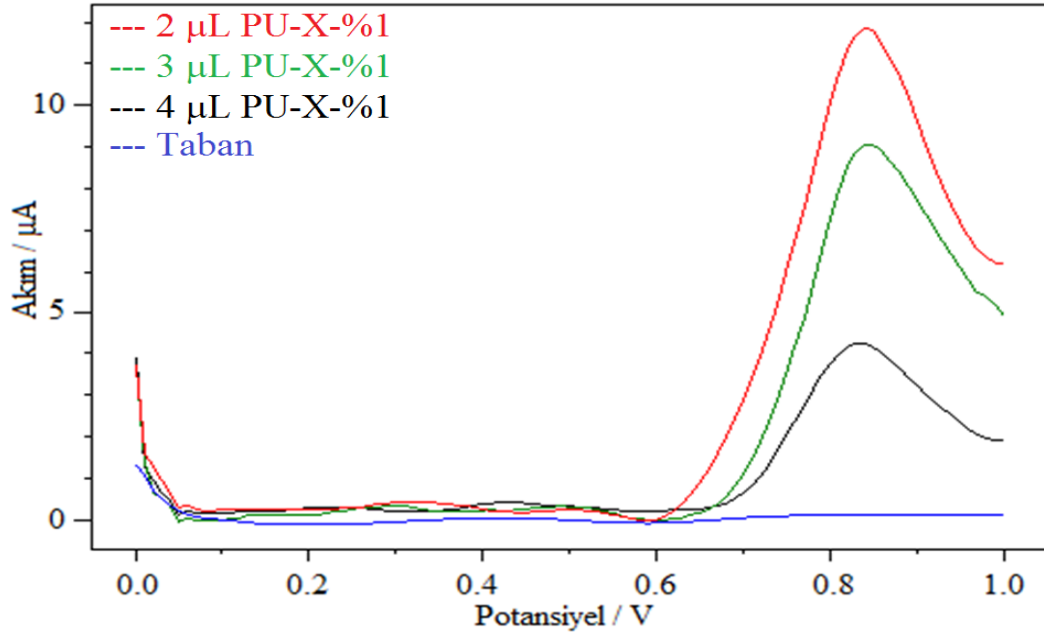
4.4.4. Platin elektrodun ksiloz temelli polimer serisiyle kaplanması

Bu amaç doğrultusunda platin elektrotlar PU-X-%1, PU-X-%3, PU-X-%5 ve PU-X-%10 polimerleri ile kaplanmıştır.

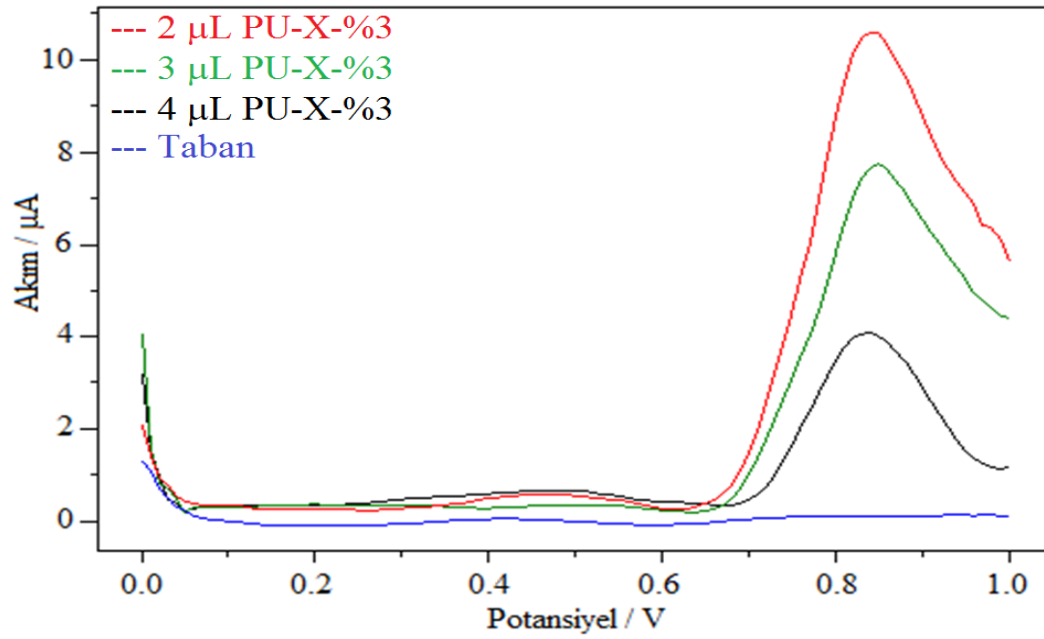
2, 3 ve 4 μL laktoz temelli polimer serileri ile kaplanmış platin elektrotların her biri için 25 mM'lık nitrit çözeltisi ile ölçümler gerçekleştirilmiştir. PU-X-%1 polimeri için elde edilen DPV eğrileri Şekil 4.57'de, PU-X-%3 polimeri için elde edilen DPV eğrileri Şekil 4.58'de, PU-X-%5 polimeri için elde edilen DPV eğrileri Şekil 4.59'da ve PU-X-%10 polimeri için elde edilen DPV eğrileri Şekil 4.60'da verilmiştir.

Ölçüm sonuçları incelendiğinde 2 μL PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan elektrotla en yüksek yanıtın alındığı görülmektedir. 25 mM nitrit için çıplak platin elektrotla gerçekleştirilen elektrokimyasal ölçümde akımda 28,7 μA 'lık bir değişim meydana gelmişken, elektrot 2 μL PU-X-%1 polimeri ile kaplanıp ölçüm alındığında bu yanıt 11,8 μA 'e düşmüştür. Aynı şekilde PU-X-%3 polimeri ile yapılan ölçümlerde en yüksek yanıt 2 μL PU-X-%3 polimeri ile alınmıştır. Bu ölçüm için akımda meydana gelen değişim 10,6 μA olarak bulunmuştur. PU-X-%5 ve PU-X-%10 polimeri için yapılan 25 mM'lık nitrit ölçümlerinde 2 μL polimer için akımda meydana gelen değişimler sırasıyla 9,8 μA ve 6,6 μA olarak bulunmuştur.

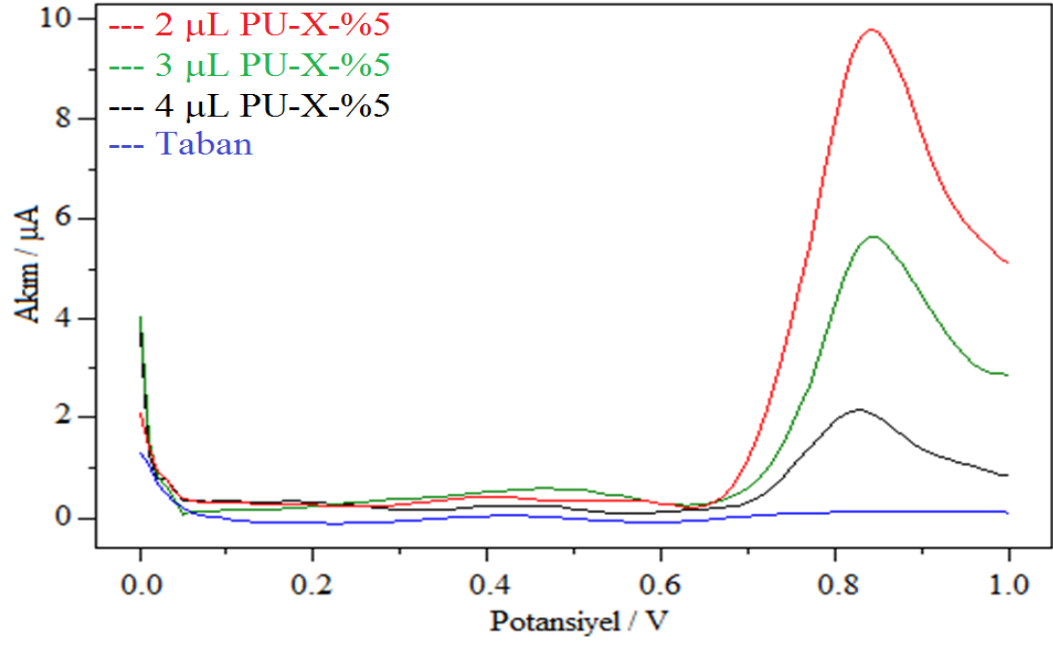
Şekiller incelendiğinde platin elektrot yüzeyine damlatılan ksiloz temelli polimer miktarı arttıkça alınan yanıtlardaki düşüşler görülmektedir. En düşük yanıtlar 4 μL , daha sonrada 3 μL polimer damlatılarak elde edilen elektrotlarla alınmıştır. En yüksek yanıtlar ise 2 μL ksiloz temelli polimer damlatılarak hazırlanan elektrotlar ile alınmıştır. Hem polimer miktarı hem de sakkarit oranı arttıkça yanıtlarda meydana gelen düşme difüzyon tabakasının kalınlaşmasından, gözenek boyutunun azalmasından ve artan çapraz bağ sayısından kaynaklanmıştır.



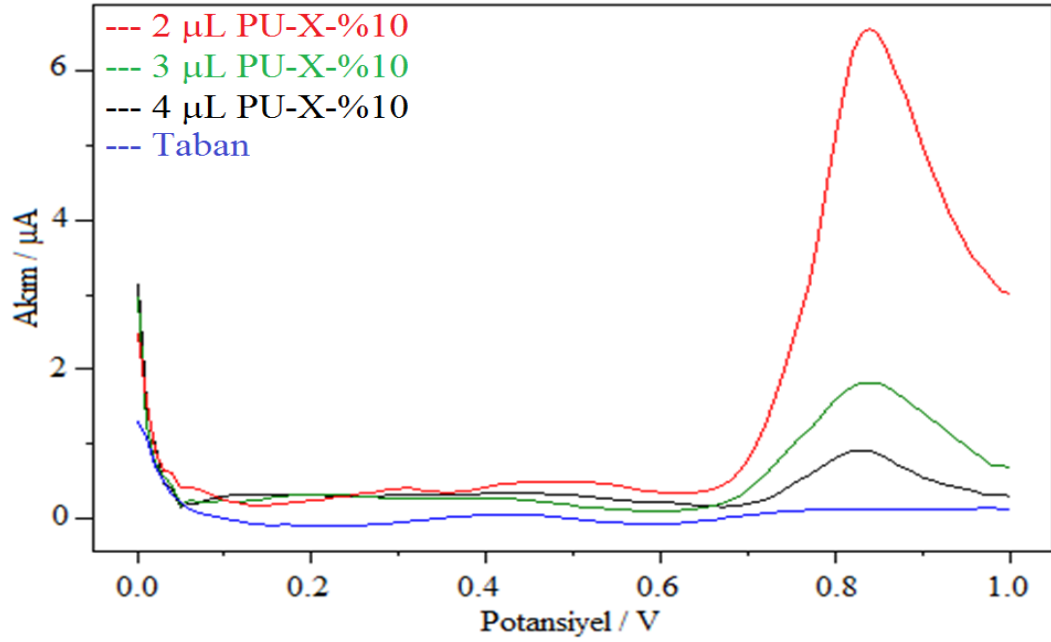
Şekil 4.57. Platin elektrodun PU-X-%1 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; DPV].



Şekil 4.58. Platin elektrodun PU-X-%3 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; DPV].



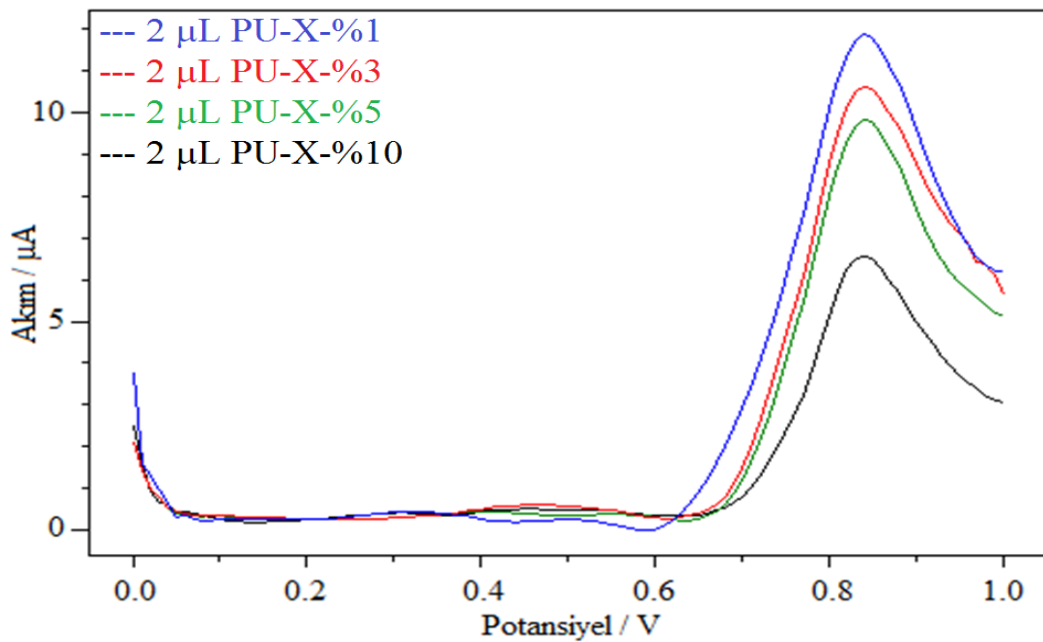
Şekil 4.59. Platin elektrodun PU-X-%5 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; DPV].



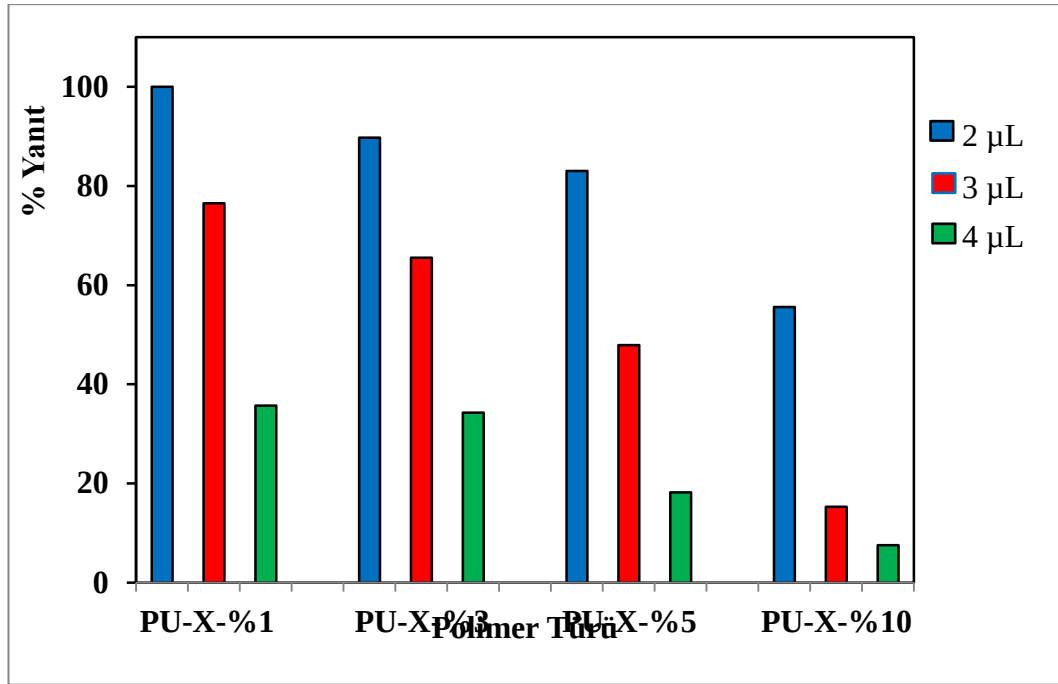
Şekil 4.60. Platin elektrodun PU-X-%10 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; DPV].

4.4.4.1. Ksiloz temelli polimerler için elde edilen yanıtların karşılaştırılması

4 farklı ksiloz türü (PU-X-%1, PU-X-%3, PU-X-%5, PU-X-%10) ile 3 farklı hacimde hazırlanan elektrotlar için yapılan ölçümler incelendiğinde, en yüksek yanıtlar 2 μ L polimer damlatılarak hazırlanan elektrotlarla alınmıştır. 2 μ L polimer damlatılarak hazırlanan elektrotlar ile 25 mM nitrit ölçümleri için elde edilen DPV eğrileri Şekil 4.61’de verilmiştir. Grafik incelendiğinde en yüksek yanıtın 2 μ L PU-X-%1 polimeriyle hazırlanan elektrot ile alındığı görülmüştür. En yüksek yanıtın alındığı bu elektrot için elde edilen akım farkı 100 kabul edilip, diğer polimerlerle hazırlanan elektrotlar için elde edilen akım farkları buna göre oralandığında elde edilen sonuçlar Şekil 4.62’de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde 2 μ L PU-X-%3 için elde edilen yanıtta en yüksek yanıtı göre % 10’luk, 2 μ L PU-X-%5 için % 17’lik, 2 μ L PU-X-%10 için ise % 44’lük bir düşüş görülmektedir. Sonuç olarak ksiloz serisinden biyosensör hazırlanırken en yüksek yanıtın alındığı 2 μ L PU-X-%1 polimerinin kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.61. PU-X-%1, PU-X-%3, PU-X-%5 ve PU-X-%10 polimerleri için alınan en yüksek yanıtlar [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C; DPV].



Şekil 4.62. PU-X-%1, PU-X-%3, PU-X-%5 ve PU-X-%10 polimerleri için alınan bütün yanıtların karşılaştırılması.

4.4.5. Platin elektrodun gliserol içermeyen maltoz temelli polimer serisiyle kaplanması

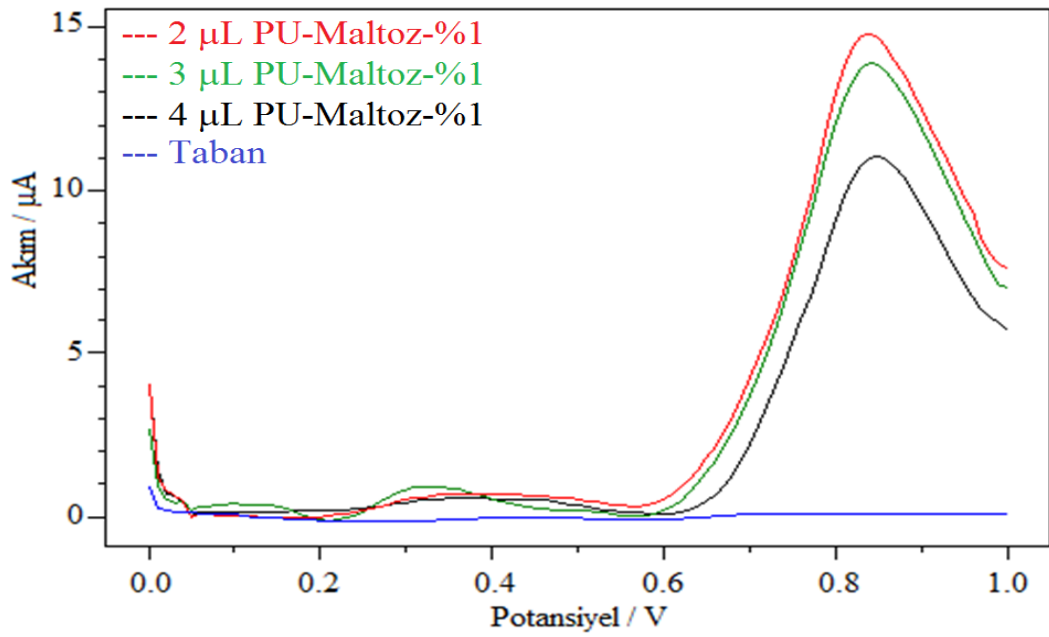
Bu amaç doğrultusunda temizlenmiş platin elektrotlar gliserol içermeyen maltoz temelli polimer serisi (PU-Maltoz-%1, PU-Maltoz-%3, PU-Maltoz-%5 ve PU-Maltoz-%10) ile kaplanmıştır.

Platin elektrotlar 2, 3 ve 4 µL gliserol içermeyen maltoz temelli polimer serileri ile kaplanmış ve her biri için 25 mM'lık nitrit çözeltisi ile ölçümler gerçekleştirilmiştir. PU-Maltoz-%1 polimeri için elde edilen DPV eğrileri Şekil 4.63'de, PU-Maltoz-%3 polimeri için elde edilen DPV eğrileri Şekil 4.64'de, PU-Maltoz-%5 polimeri için elde edilen DPV eğrileri Şekil 4.65'de ve PU-Maltoz-%10 polimeri için elde edilen DPV eğrileri Şekil 4.66'da verilmiştir.

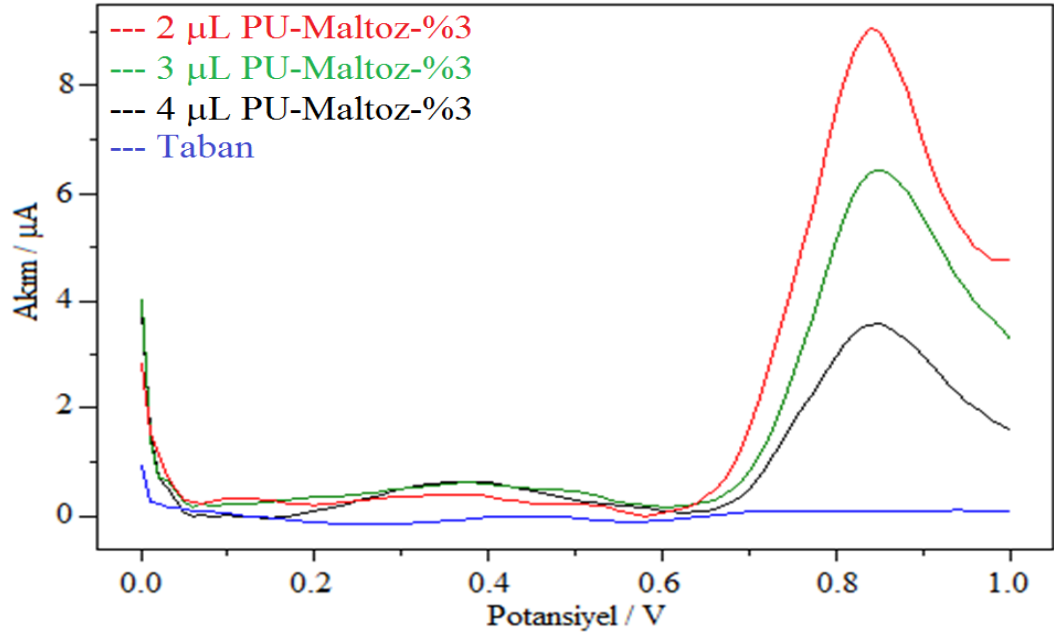
Elde edilen ölçüm sonuçları incelendiğinde 2 µL PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan elektrotla en yüksek yanıtın alındığı görülmektedir. 25 mM nitrit için çıplak platin elektrotla gerçekleştirilen elektrokimyasal ölçümde akımda 28,7 µA'lık bir değişim meydana gelmişken, elektrot 2 µL PU-Maltoz-%1 polimeri ile kaplanıp ölçüm alındığında bu yanıt 14,8 µA'e düşmüştür. Aynı şekilde PU-Maltoz-%3

polimeri ile yapılan ölçümlerde en yüksek yanıt 2 μL PU-Maltoz-%3 polimeri ile alınmıştır. Bu ölçüm için akımda meydana gelen değişim 9,0 μA olarak bulunmuştur. PU-Maltoz-%5 ve PU-Maltoz-%10 polimeri için yapılan 25 mM'lık nitrit ölçümlerinde 2 μL polimer için akımda meydana gelen değişimler sırasıyla 5,3 μA ve 4,5 μA olarak bulunmuştur.

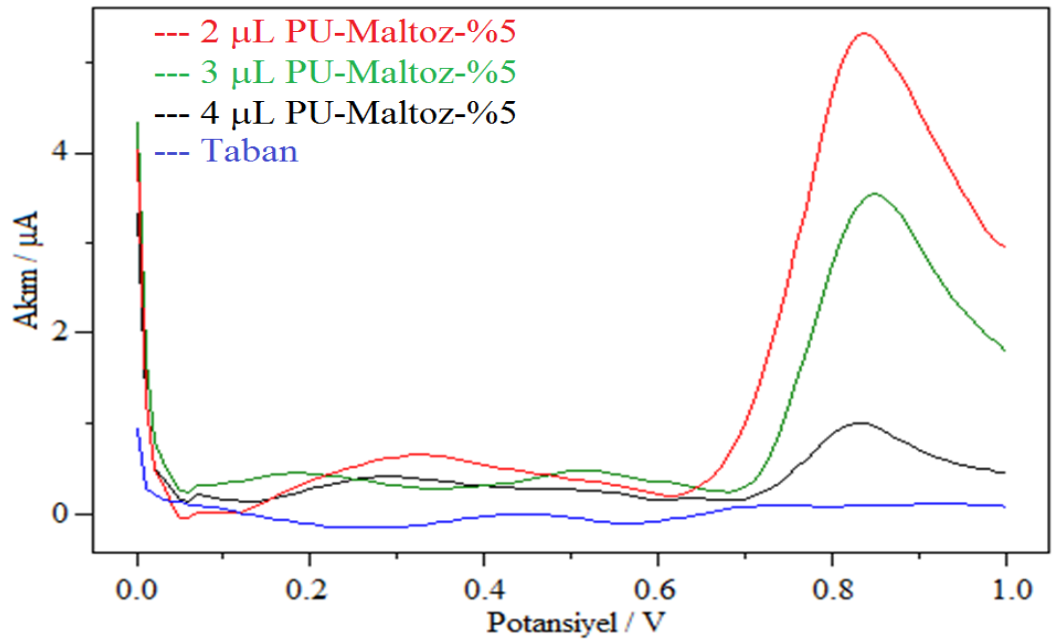
Ölçüm sonuçları incelendiğinde platin elektrot yüzeyine damlatılan gliserol içermeyen maltoz temelli polimer miktarı arttıkça alınan yanıtlardaki düşüşler görülmektedir. En düşük yanıtlar 4 μL , daha sonrada 3 μL polimer damlatılarak elde edilen elektrotlarla alınmıştır. En yüksek yanıtlar ise 2 μL ksiloz temelli polimer damlatılarak hazırlanan elektrotlar ile alınmıştır. Hem polimer miktarı hem de sakkarit oranı arttıkça yanıtlarda meydana gelen düşme difüzyon tabakasının kalınlaşmasından, gözenek boyutunun azalmasından ve artan çapraz bağ sayısından kaynaklanmıştır.



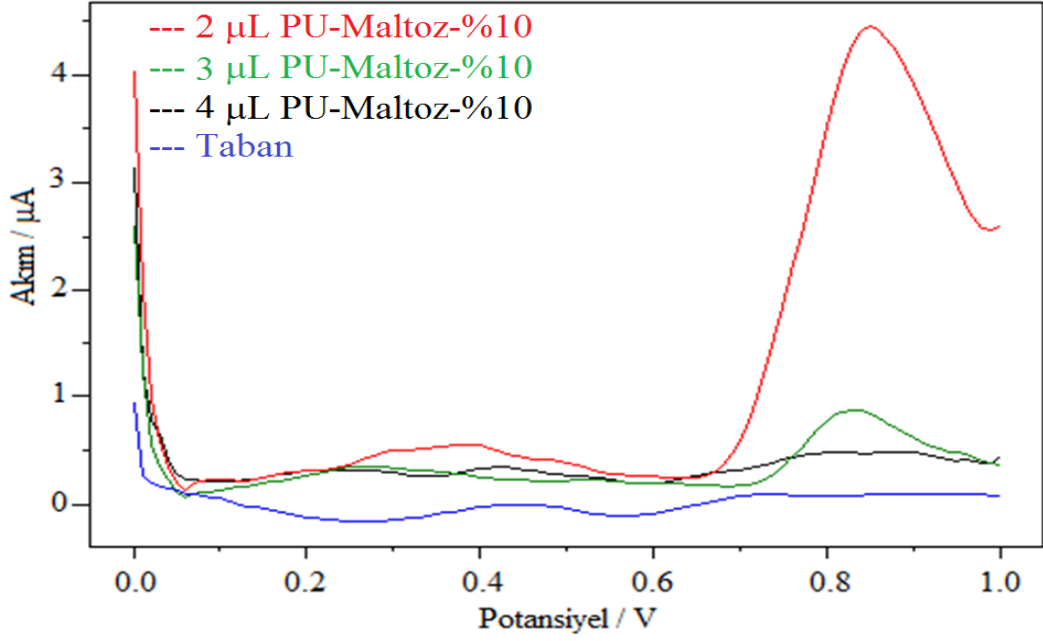
Şekil 4.63. Platin elektrodun PU-Maltoz-%1 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; DPV].



Şekil 4.64. Platin elektrodun PU-Maltos-%3 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; DPV].



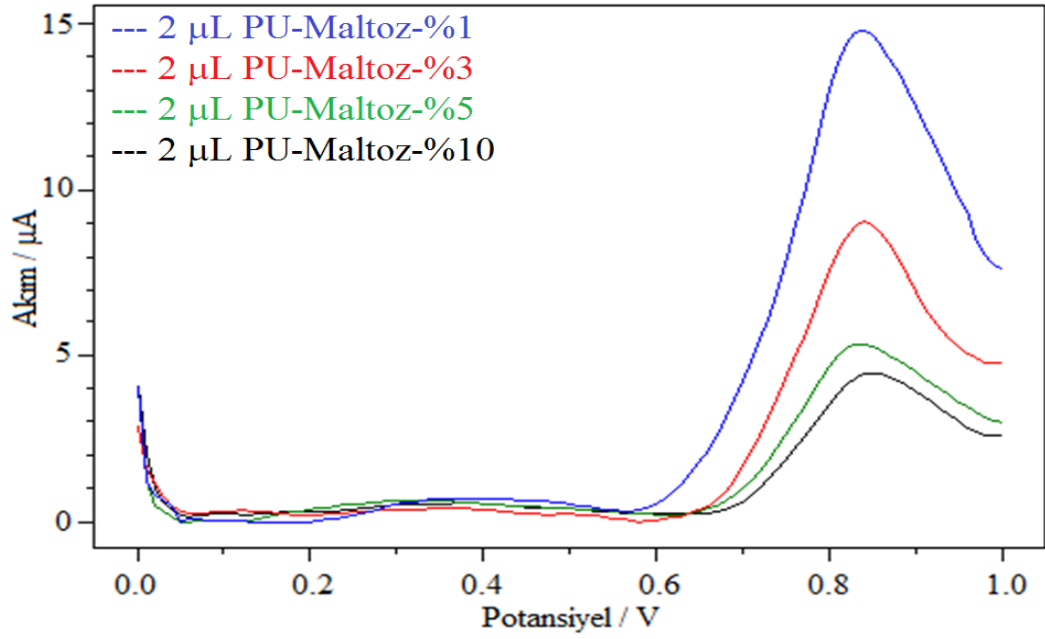
Şekil 4.65. Platin elektrodun PU-Maltos-%5 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; DPV].



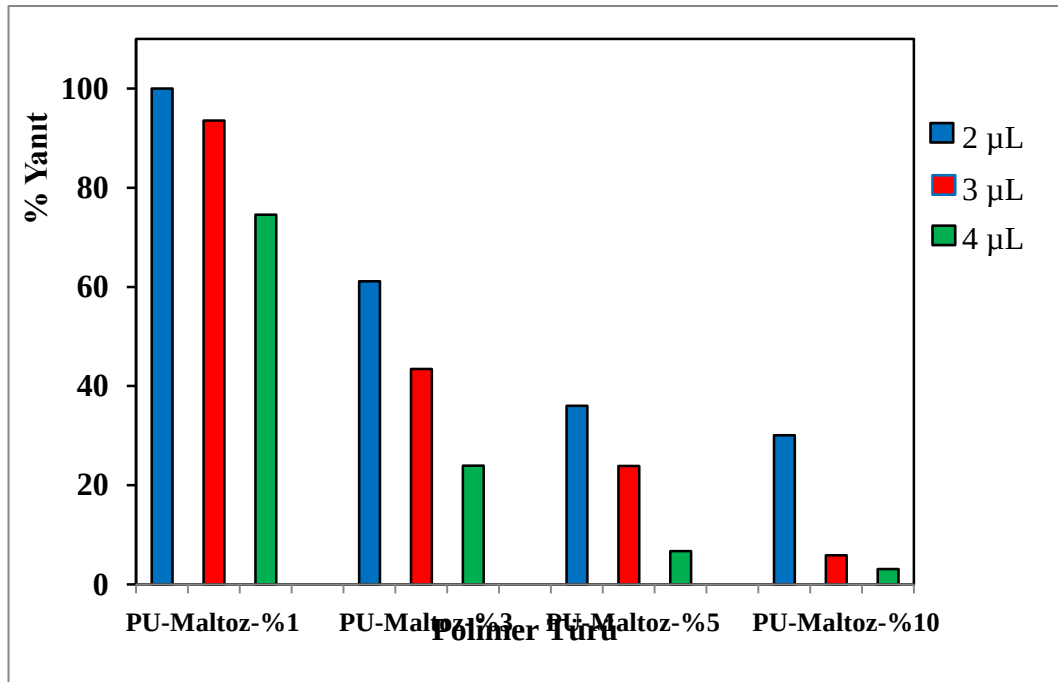
Şekil 4.66. Platin elektrodun PU-Maltoz-%10 polimeri ile kaplanması ve nitrit ölçümü [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; DPV].

4.4.5.1. Gliserol içermeyen maltoz temelli polimerler için elde edilen yanıtların karşılaştırılması

4 farklı yüzdede hazırlanan gliserol içermeyen maltoz temelli polimerler (PU-Maltoz-%1, PU-Maltoz-%3, PU-Maltoz-%5, PU-Maltoz-%10) ile 3 farklı hacimde hazırlanan elektrotlar için yapılan ölçümler incelendiğinde, en yüksek yanıtlar 2 μ L polimer damlatılarak hazırlanan elektrotlarla alınmıştır. 2 μ L polimer damlatılarak hazırlanan elektrotlar ile 25 mM nitrit ölçümleri için elde edilen DPV eğrileri Şekil 4.67’de verilmiştir. Grafik incelendiğinde en yüksek yanıtın 2 μ L PU-Maltoz-%1 polimeriyle hazırlanan elektrot ile alındığı görülmüştür. En yüksek yanıtın alındığı bu elektrot için elde edilen akım farkı 100 kabul edilip, diğer polimerlerle hazırlanan elektrotlar için elde edilen akım farkları buna göre oranlandığında elde edilen sonuçlar Şekil 4.68’de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde 2 μ L PU-Maltoz-%3 için elde edilen yanıtta en yüksek yanıtla göre % 39’luk, 2 μ L PU-Maltoz-%5 için % 64’lük, 2 μ L PU-Maltoz-%10 için ise % 70’lik bir düşüş görülmektedir. Sonuç olarak gliserol içermeyen maltoz serisinden biyosensör hazırlanırken en yüksek yanıtın alındığı 2 μ L PU-Maltoz-%1 polimerinin kullanılmasına karar verilmiştir.



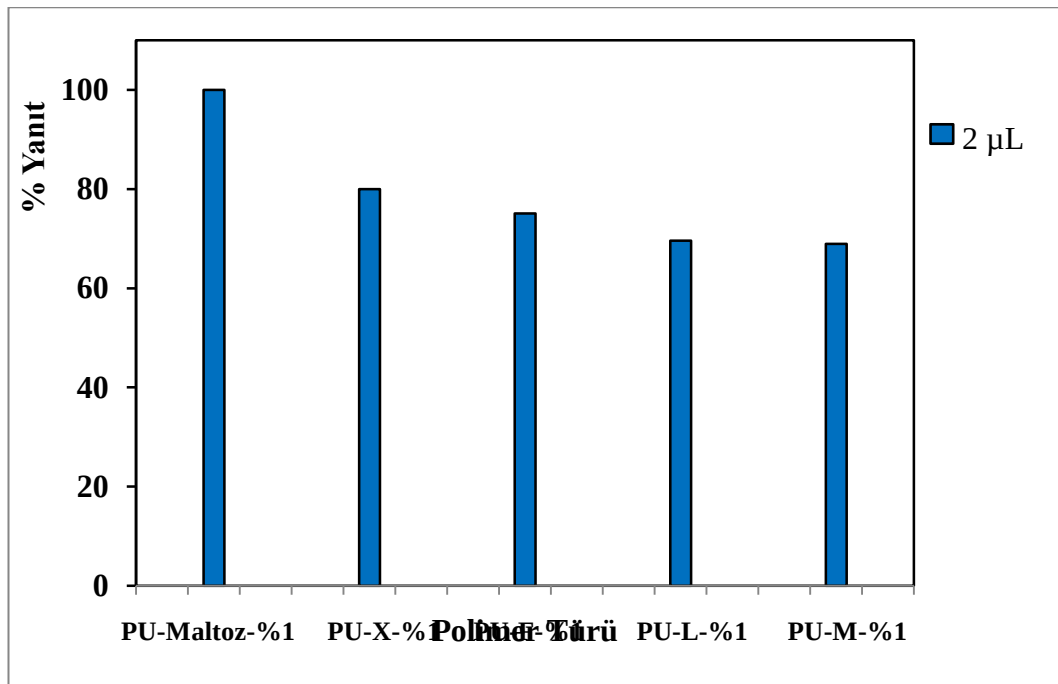
Şekil 4.67. PU-Maltoz-%1, PU-Maltoz-%3, PU-Maltoz-%5 ve PU-Maltoz-%10 polimerleri için alınan en yüksek yanıtlar [100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C; DPV].



Şekil 4.68. PU-Maltoz-%1, PU-Maltoz-%3, PU-Maltoz-%5 ve PU-Maltoz-%10 polimerleri için alınan bütün yanıtların karşılaştırılması.

4.4.6. En yüksek yanıtların alındığı polimerlerin karşılaştırılması

5 farklı polimer türü (PU-Maltoz-%1, PU-X-%1, PU-F-%1, PU-L-%1 ve PU-M-%1) için bütün sonuçlar incelendiğinde en yüksek yanıtların 2 μ L polimer kaplanarak hazırlanan elektrotlar ile alındığı gözlenmiştir. Bunun nedeni polimer miktarı azaldıkça hem biyoaktif tabaka incelmıştır hem de gözenek boyutları artmıştır. 5 polimer türü için 2 μ L polimer kaplanarak hazırlanan elektrotlar ile 25 mM nitrit için gerçekleştirilen ölçüm sonuçları incelendiğinde en yüksek yanıtın PU-Maltoz-%1 polimeri ile alındığı gözlenmiştir. En yüksek yanıtın alındığı bu polimer türü için elde edilen akım farkı 100 kabul edilip, diğer polimerlerle hazırlanan elektrotlar için elde edilen akım farkları buna göre oranlandığında elde edilen sonuçlar Şekil 4.69’da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde elde edilen en yüksek yanıt oranla PU-X-%1 polimeri ile alınan yanıtta % 20’lik, PU-F-%1 polimeri ile alınan yanıtta % 24’lük, PU-L-%1 polimeri ile alınan yanıtta % 30’luk ve PU-M-%1 polimeri ile alınan yanıtta % 31’lik bir düşüş gözlenmiştir.



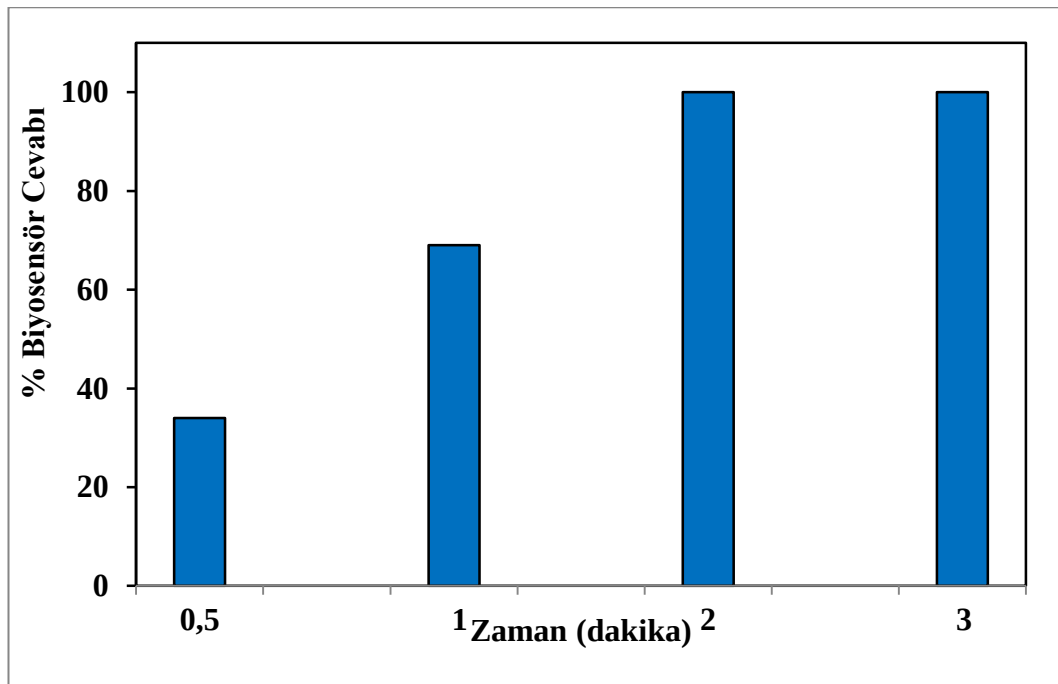
Şekil 4.69. PU-Maltoz-%1, PU-X-%1, PU-F-%1, PU-L-%1 ve PU-M-%1 polimerleri için alınan en yüksek yanıtların karşılaştırılması.

4.5. PU-F-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörün Optimizasyon Çalışmaları

PU-F-%1 biyosensörünün optimizasyonuna ilişkin çalışmalarda çeşitli parametrelerin biyosensör cevabına olan etkisi incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda hazırlama koşullarının ve çalışma koşullarının optimizasyonuna yönelik olarak yanıt süresinin, enzim miktarının, koenzim miktarının, pH ve sıcaklığın biyosensör cevabına etkisi araştırılmıştır.

4.5.1. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün nitrat ölçümü için yanıt süresinin belirlenmesi

PU-F-%1 polimeri kaplanarak hazırlanan ve biyoaktif tabakasında 0,5 U NR enzimi içeren biyosensör ile 5 mM'lık nitrat tayini için en yüksek akım farkının olduğu süreyi tespit etmek amacıyla ölçümler alındı. Ölçüm sonuçları Şekil 4.70'de verilmiştir.

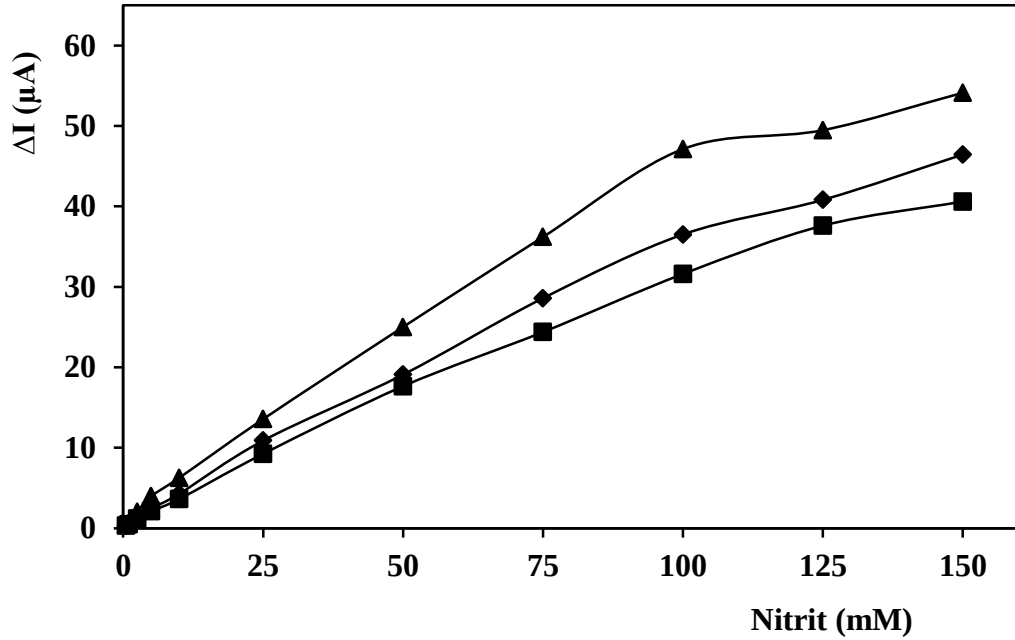


Şekil 4.70. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün nitrat ölçümü için yanıt süresinin belirlenmesi [0,5 U NR; 2 µL PU-F-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C; +0,87 V; DPV].

Yapılan ölçümler sonucunda 4 farklı zaman için elde edilen sonuçlar kıyaslandığında, 0,5. dakikada biyosensörle % 34'lük bir yanıt alınırken, 1. dakikada alınan biyosensör cevabı % 69'dur. En yüksek biyosensör cevabının 2. ve 3. dakikalarda alındığı görülmektedir.

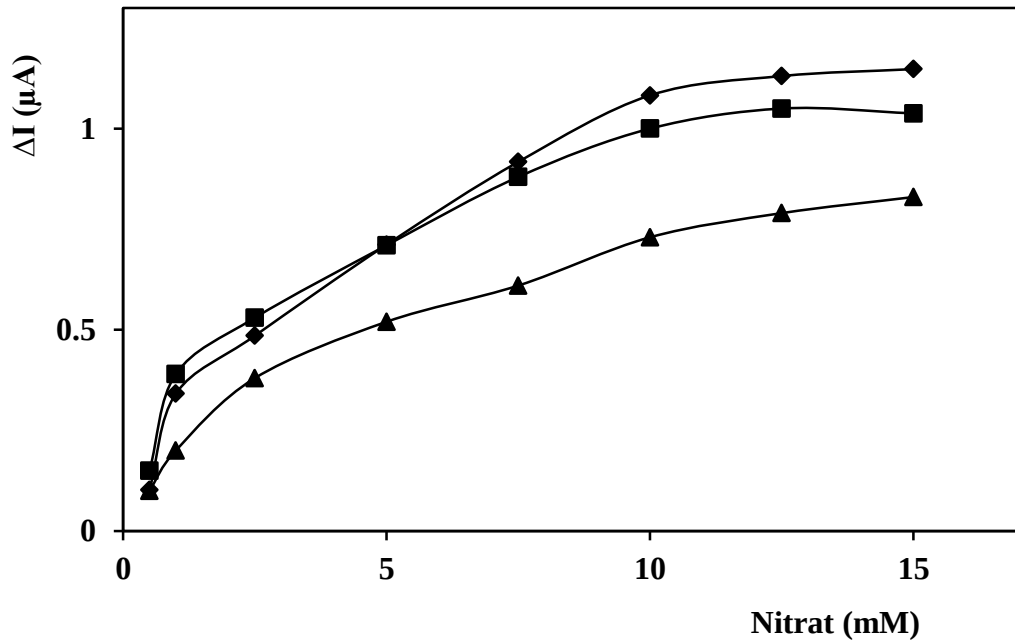
4.5.2. Enzim miktarının PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi

Çalışmanın bu kısmında polimer miktarı ve ölçüm şartları sabit tutularak farklı miktarlarda enzim içeren biyosensörlerle nitrit ve nitrat ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu hazırlanan farklı biyosensörler ile nitrit ve nitrat ölçümleri yapıp, akımdaki değişimlere karşılık grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.71'de 0,25 U; 0,5 U ve 1 U NR enzimi içeren biyosensörlerle gerçekleştirilen nitrit ölçümleri görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi nitrit serisi için en yüksek yanıt 0,25 U NR enzimi bulunan elektrot ile alınmıştır. 0,5 U ve 1 U NR enzimiyle hazırlanan biyosensörler için alınan nitrit yanıtlarına bakıldığında yanıtlarda düşüşler gözlenmiştir.



Şekil 4.71. Nitrit ölçümü için enzim miktarının PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi [2 μ L PU-F-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C; +0,87 V; DPV; ▲ 0,25 U; ◆ 0,5 U; ■ 1 U].

Şekil 4.72’de 0,25 U; 0,5 U ve 1 U NR enzimi içeren biyosensörlerle gerçekleştirilen nitrat ölçümleri görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi nitrat serisiyle yapılan ölçümlerde en düşük biyosensör yanıtları biyoaktif tabakasında 0,25 U NR enzimi içeren biyosensörlerle alınmıştır. 0,5 U NR enzimi içeren biyosensörle yapılan ölçümler incelendiğinde 0,25 U enzim içeren biyosensöre göre daha yüksek yanıtlar elde edilmiştir. 1 U NR enzimi içeren biyosensörle yapılan ölçümde ise 0,5 U’ye göre iki kat artan enzim miktarına rağmen biyosensör yanıtlarda düşük derişimler de bir artış görölse de yüksek derişimler de bir düşüş görölmüştür.

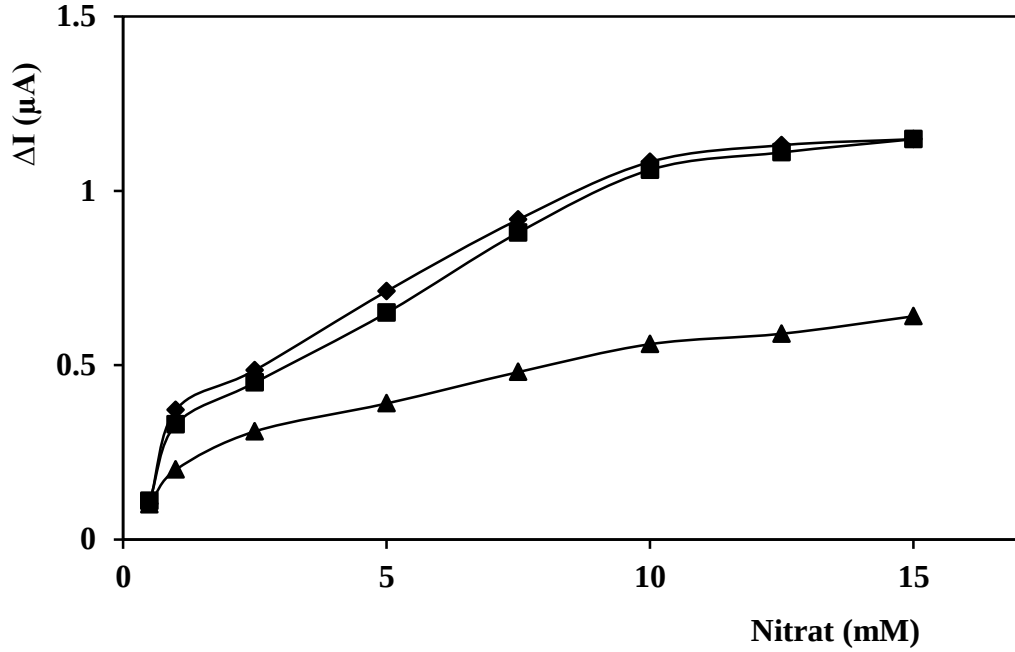


Şekil 4.72. Nitrat ölçümü için enzim miktarının PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi [2 μ L PU-F-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV; ▲ 0,25 U; ♦ 0,5 U; ■ 1 U].

4.5.3. Koenzim miktarının PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi

Enzim miktarının optimizasyonundan sonra, enzimin koenzimi olan NADPH miktarının optimizasyonuna geçildi. Bu amaç doğrultusunda 0,5 U NR enzimi içeren biyosensör ile 0,125 mM; 0,25 mM ve 0,5 mM NADPH varlığında nitrat serisi için gerçekleştirilen ölçüm sonuçları Şekil 4.73’de verilmiştir. 0,125 mM NADPH varlığında nitrat serisi için alınan biyosensör yanıtları 0,25 mM ve 0,5 mM NADPH

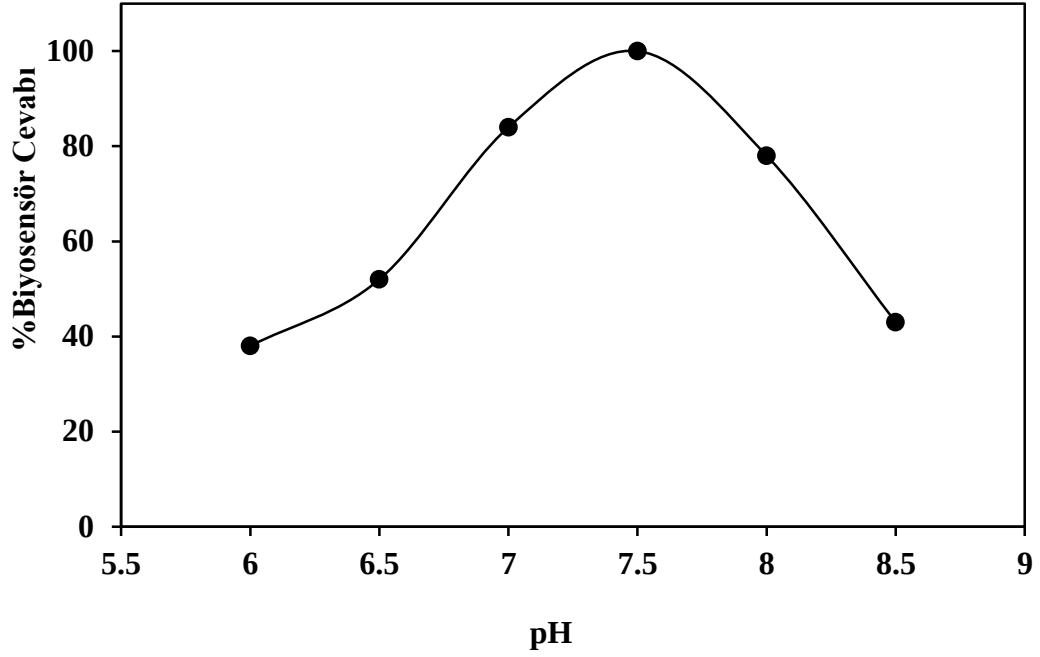
yanıtlarına göre çok düşüktür. En yüksek biyosensör cevabı 0,25 mM NADPH ile yapılan ölçümlerde alınmıştır. 0,5 mM NADPH için yapılan ölçümlerde ise biyosensör cevabında 0,25 mM NADPH ile yapılan ölçümlere göre azda olsa bir düşüş gözlenmiştir.



Şekil 4.73. Nitrat ölçümü için koenzim (NADPH) miktarının PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi [0,5 U NR; 2 μ L PU-F-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV; $\blacktriangle$ 0,125 mM; $\blacklozenge$ 0,25 mM; $\blacksquare$ 0,5 mM].

4.5.4. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum pH değerinin belirlenmesi

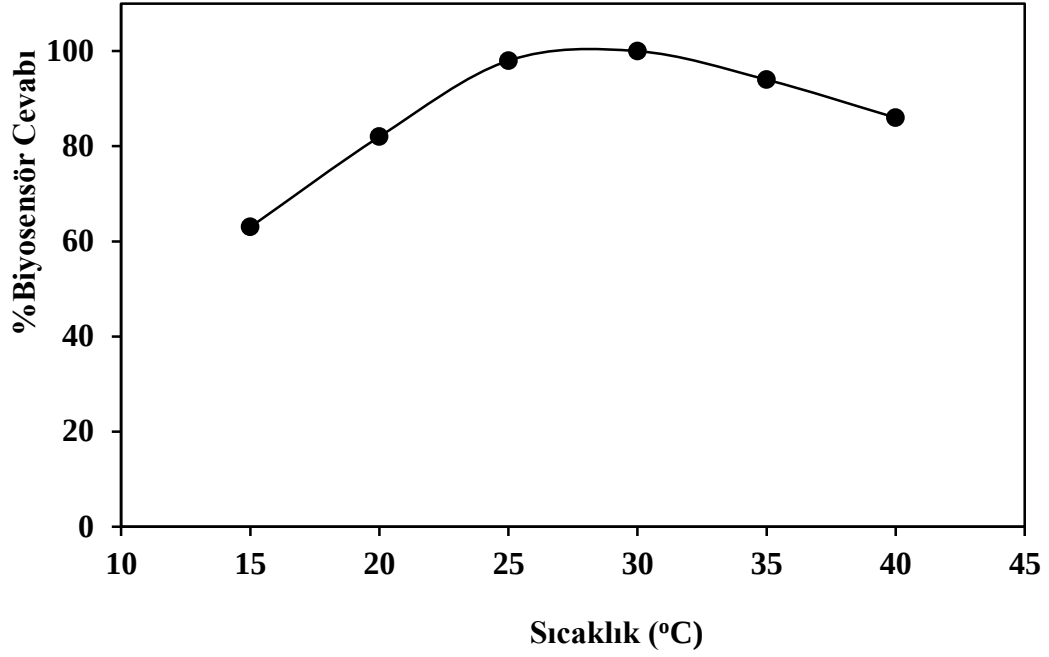
Biyosensörün optimum pH' sını belirlemek amacıyla 6 – 8,5 arasında değişen pH'larda fosfat tamponu ile ölçümler gerçekleştirilmiş ve yapılan denemeler sonucunda pH ve % biyosensör cevabı arasında çizilen optimum pH grafiği Şekil 4.74'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi optimum pH değeri 7,5 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.74. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum pH grafiği [0,5 U NR; 2 μ L PU-F-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 6 – 8,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV].

4.5.5. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum sıcaklığının belirlenmesi

PU-F-%1 polimeri temelli biyosensörün optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla, düşük sıcaklıktan yüksek sıcaklığa doğru 15 °C ile 40 °C arasında değişen sıcaklıklarda nitrat ölçümleri alınmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen sıcak ve % biyosensör cevabı arasında çizilen optimum sıcaklık grafiği Şekil 4.75’de verilmiştir. Grafikten görüldüğü gibi en yüksek biyosensör cevabı 30 °C’de alınmıştır. Optimum sıcaklık grafiği incelendiğinde 25 °C ve 30 °C için alınan biyosensör yanıtlarının birbirine yakın olduğu ve aralarında % 2’lik bir fark bulunduğu gözlenmiştir..



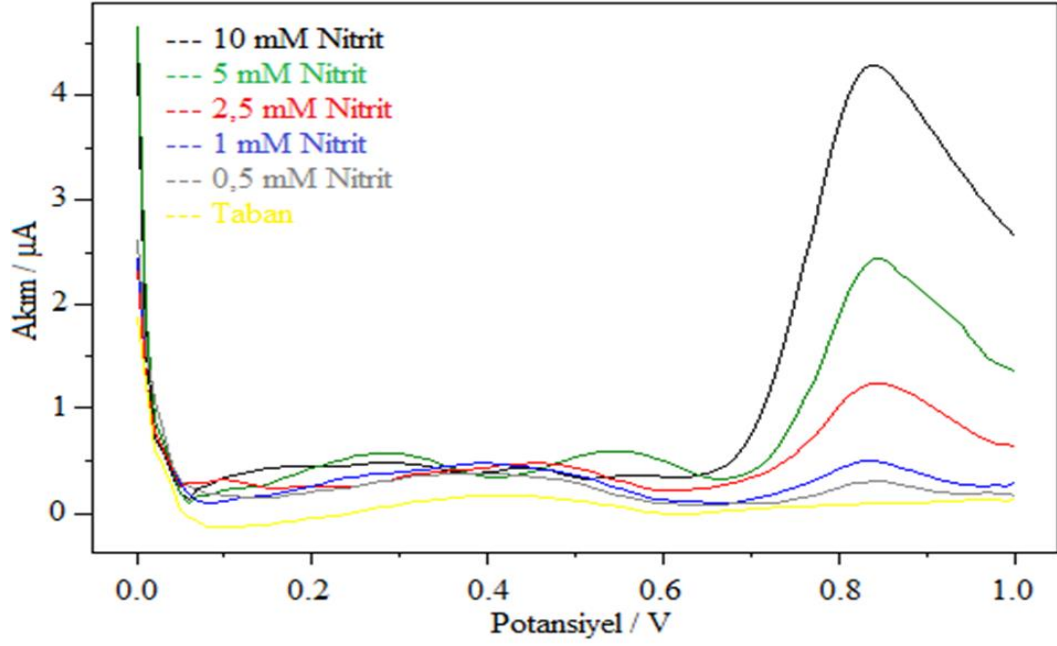
Şekil 4.75. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum sıcaklık grafiği [0,5 U NR; 2 µL PU-F-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; +0,87 V; DPV].

4.6. PU-F-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları

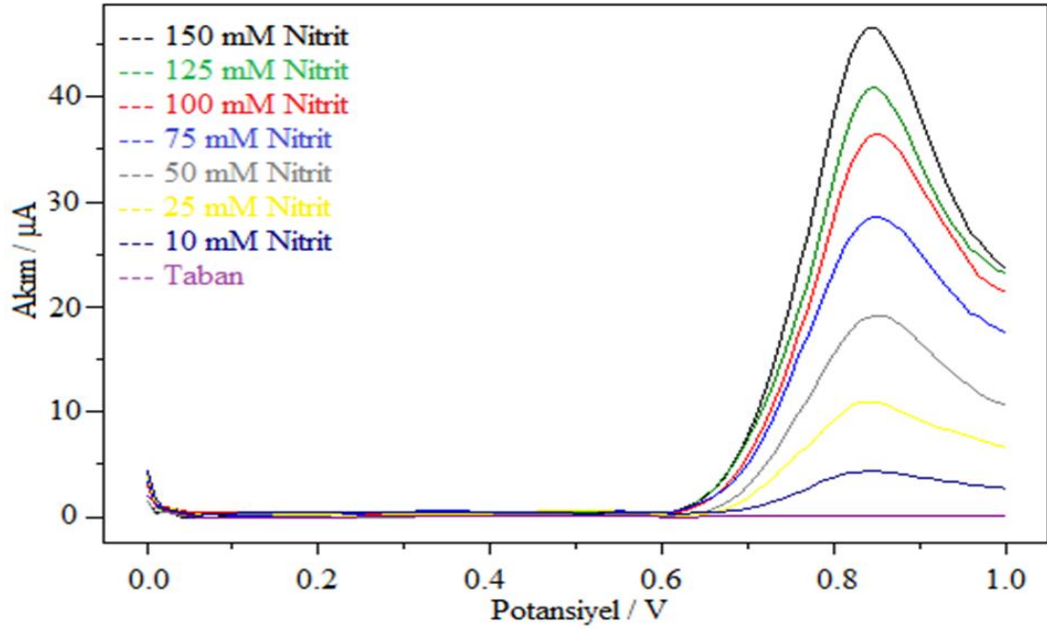
Geliştirilen PU-F-%1 polimeri ile kaplı biyosensörün hazırlama ve çalışma koşullarının optimizasyonundan sonra karakterizasyon çalışmalarına geçilmiştir.

4.6.1. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

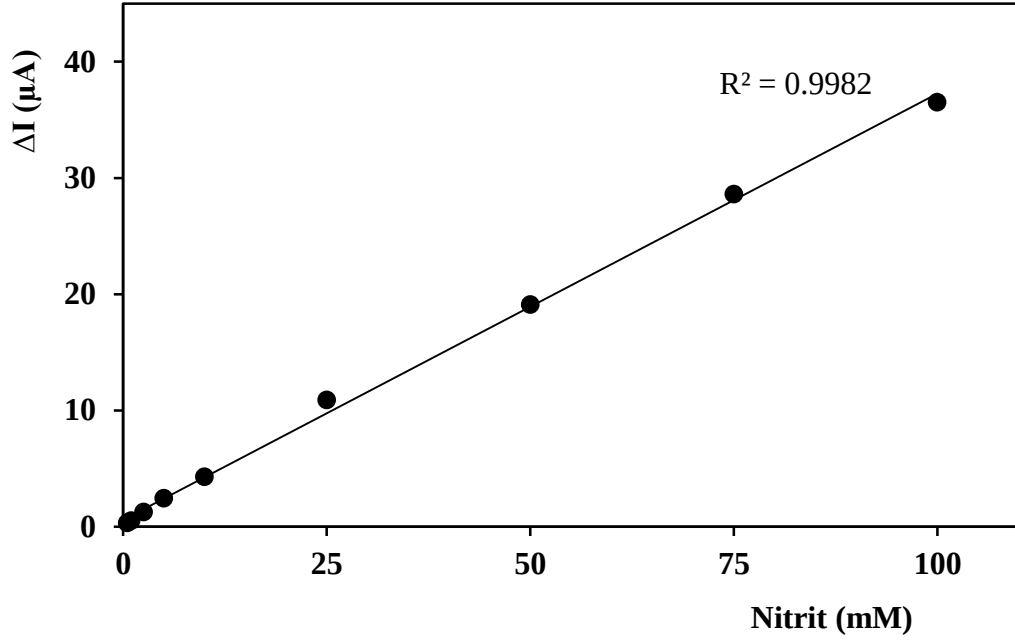
Optimize edilen koşullarda PU-F-%1 polimeri ile kaplanmış biyosensör ile farklı miktarlarda nitrit içeren ölçüm çözeltileri ile yapılan çalışmalarda, 0,5 mM – 10 mM arasında değişen nitrit derişimleri için yapılan ölçümler için elde edilen cihaz yanıtları Şekil 4.76’da, 10 mM – 150 mM arasında değişen nitrit derişimleri için yapılan ölçümler için elde edilen cihaz yanıtları ise Şekil 4.77’de verilmiştir. Doğrusal yanıt veren 0,5 mM – 100 mM arasındaki nitrit derişimleri grafiğe geçirildiğinde Şekil 4.78’de ki standart grafiği oluşturulmuştur. Elde edilen standart grafiğinin R^2 değeri ise 0,9982 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.76. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 0,5 mM – 10 mM aralığındaki nitrit derişimleri için alınan DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-F-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



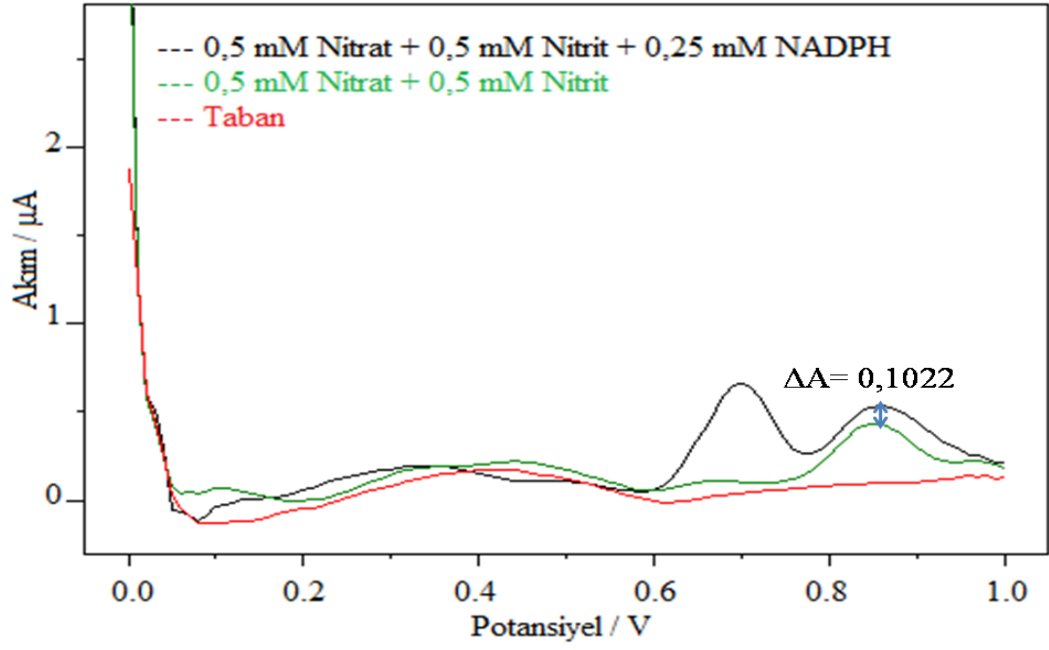
Şekil 4.77. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 10 mM – 150 mM aralığındaki nitrit derişimleri için alınan DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-F-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



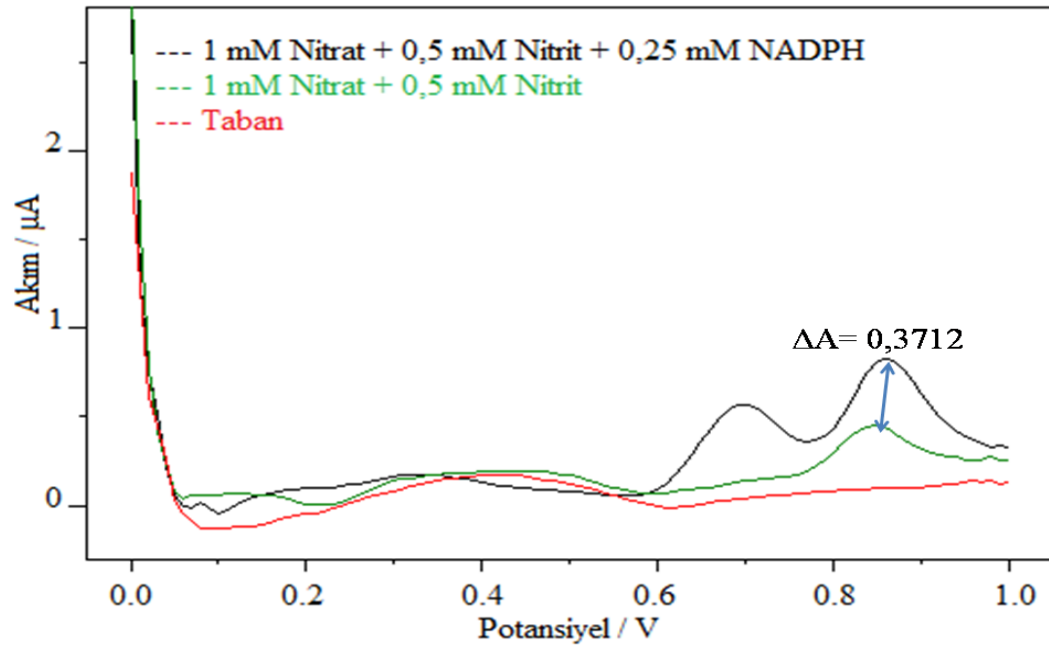
Şekil 4.78. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı [0,5 U NR; 2 μ L PU-F-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV].

4.6.2. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrat tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

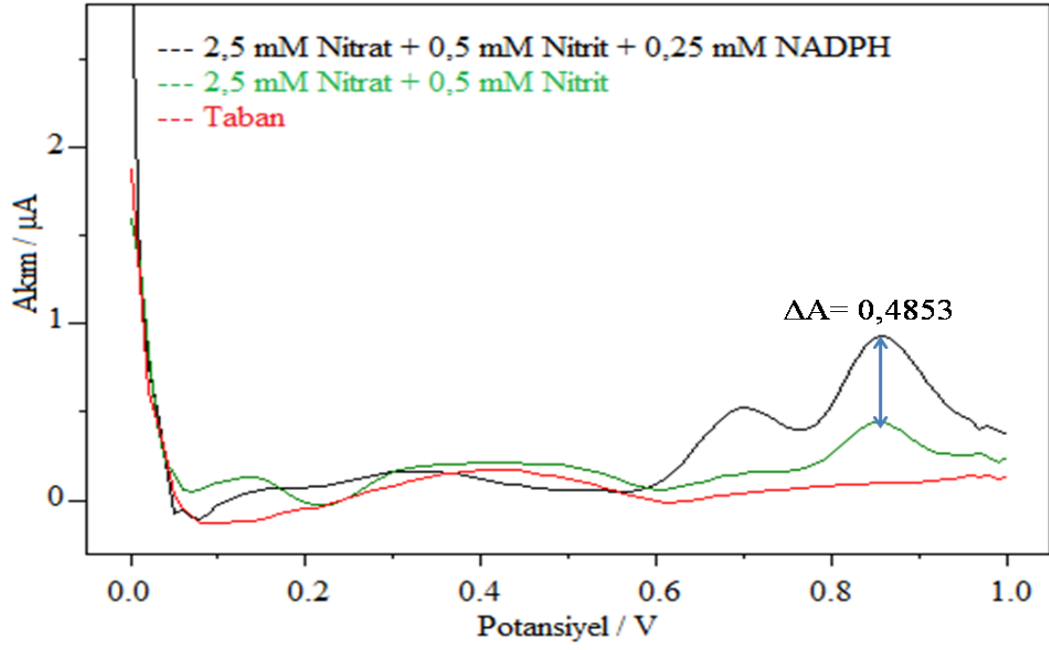
Optimize edilen koşullarda PU-F-%1 polimeri ile hazırlanmış biyosensör ile 0,5 mM – 15 mM arasında değişen nitrat derişimleri için ölçümler gerçekleştirildi. Her bir nitrat derişimi için elde edilen ölçüm sonuçları Şekil 4.79 ve Şekil 4.86 aralığında verilen şekillerde verilmiştir. Nitrat ölçümleri için akımda meydana gelen artışlar bu şekiller üzerinde gösterilmiştir. Nitrat derişimlerine karşılık elde edilen akımdaki değişimler grafiğe geçirildiğinde 1 mM’ın altındaki ve 10 mM’ın üstündeki nitrat derişimlerinde doğrusallıktan sapmalar meydana gelmiştir. 1 mM – 10 mM derişim aralığındaki nitrat ölçümleri grafiğe geçirildiğinde nitrat için standart grafiği elde edilmiştir. Bu grafik Şekil 4.87’de verilmiştir ve elde edilen standart grafiğinin R^2 değeri 0,9971 olarak bulunmuştur.



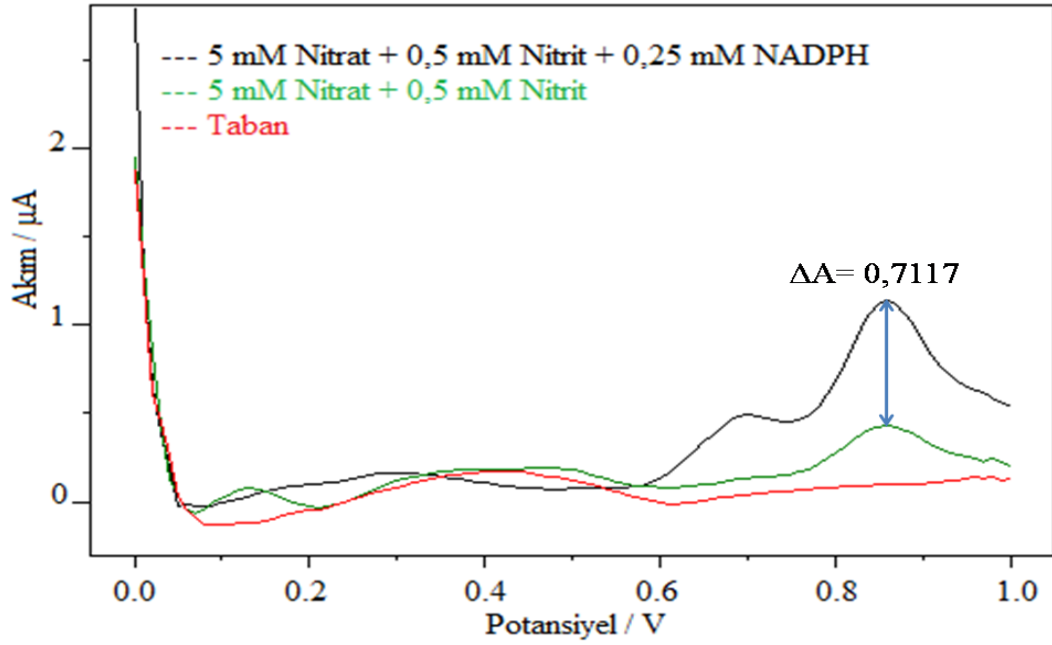
Şekil 4.79. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 0,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-F-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



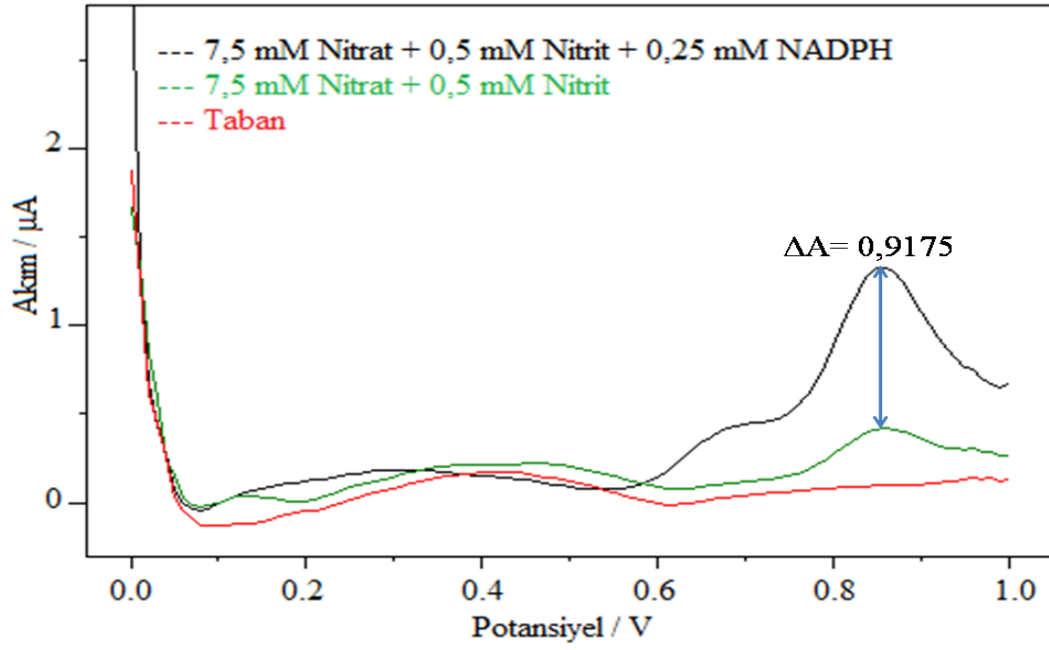
Şekil 4.80. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 1 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-F-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



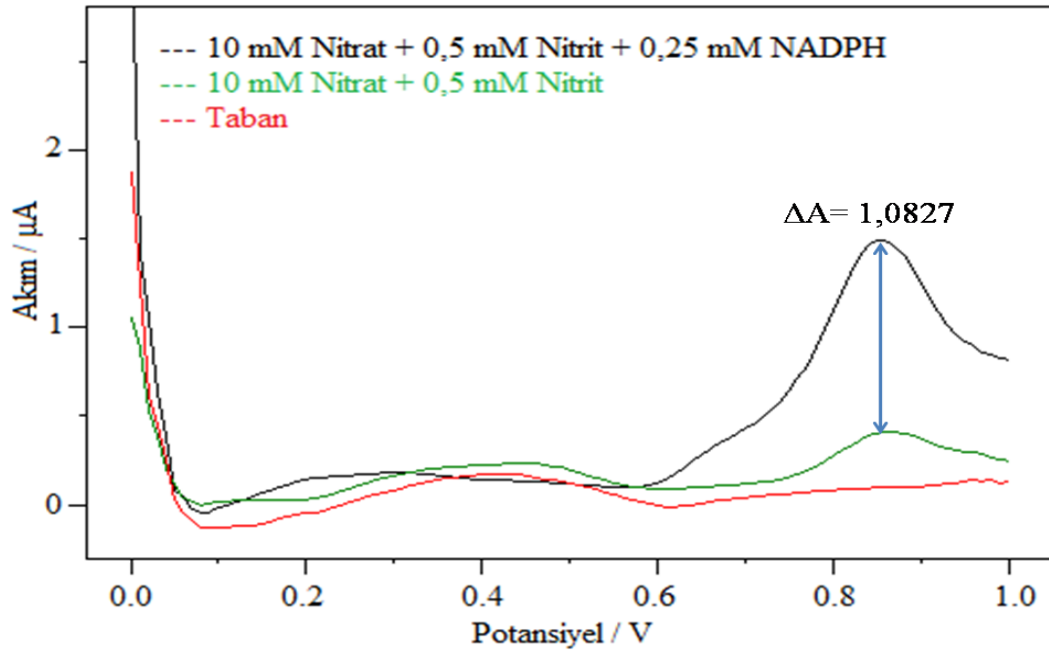
Şekil 4.81. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 2,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 μL PU-F-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C].



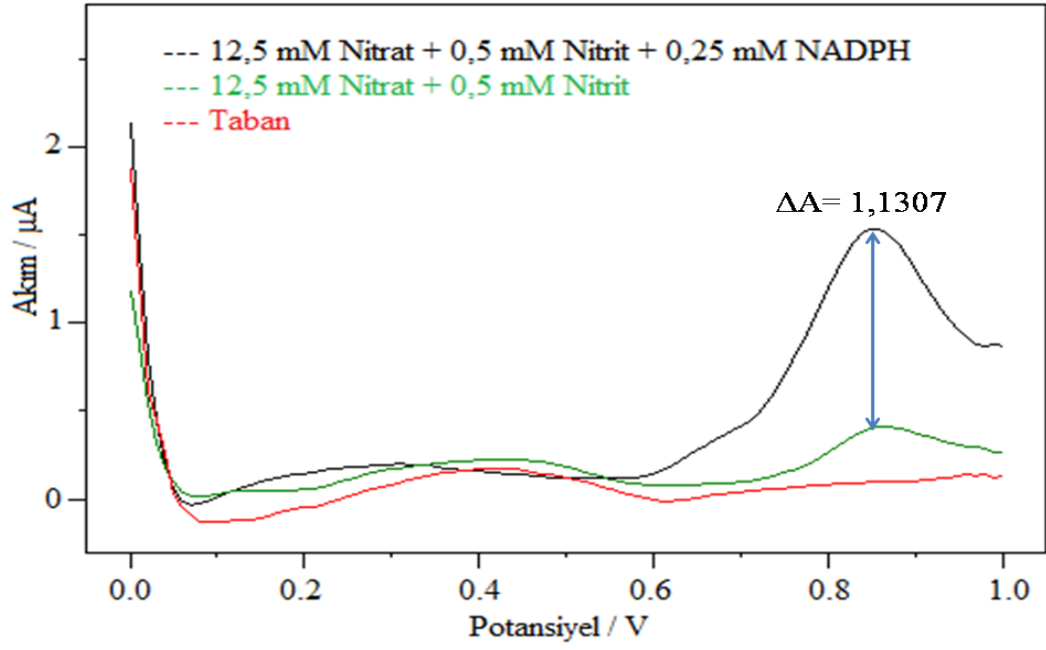
Şekil 4.82. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 μL PU-F-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C].



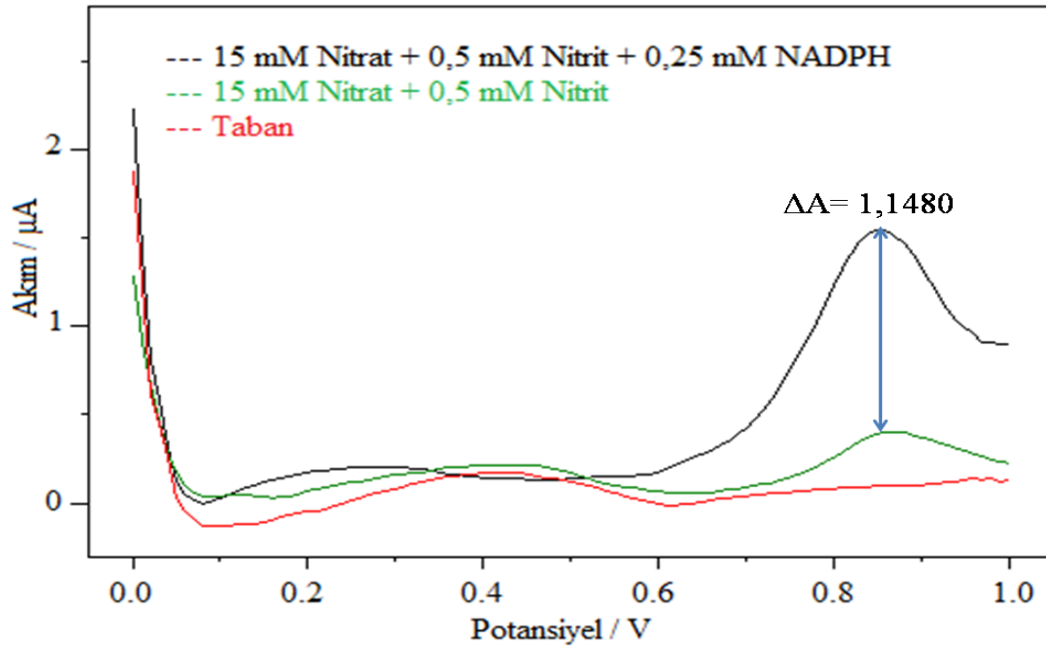
Şekil 4.83. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 7,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 μ L PU-F-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C].



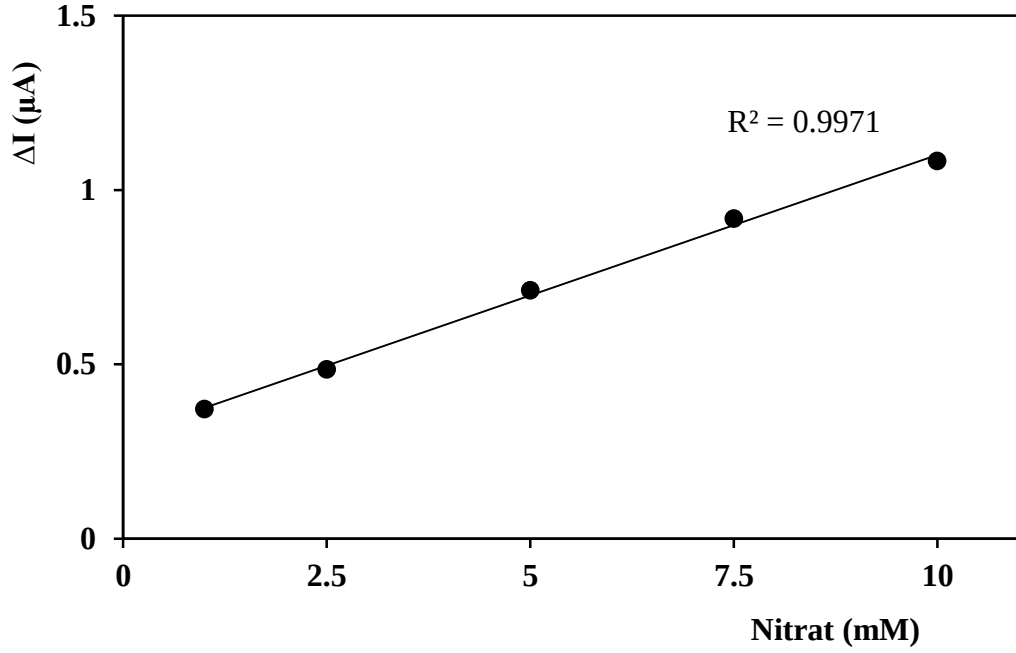
Şekil 4.84. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 10 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 μ L PU-F-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C].



Şekil 4.85. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 12,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-F-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



Şekil 4.86. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 15 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-F-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



Şekil 4.87. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrat tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı [0,5 U NR; 2 μ L PU-F-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV].

4.6.3. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit ve nitrat ölçümü için tekrarlanabilirlik

Bu çalışmada PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. Bu çalışmada hazırlanan biyosensörlerle hem 25 mM'lık nitrit hem de 5 mM'lık nitrat derişimleri için ölçümler alınmıştır. 10 kez tekrarlanan bu ölçümler sonucunda elde edilen akım farklarına karşılık gelen nitrit ve nitrat derişimleri ilgili standart grafiklerinden okunmuştur. Bu ölçümlerden elde edilen veriler ışığında ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. 25 mM'lık nitrit ölçümleri için elde edilen ölçüm sonuçları, ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri Tablo 4.1'de verilmiştir. 5 mM'lık nitrat ölçümleri için elde edilen ölçüm sonuçları, ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri ise Tablo 4.2'de verilmiştir.

Ölçüm No	ΔI (μA)	Nitrit (mM)
1	10,415	26,896
2	10,403	26,863
3	10,367	26,765
4	10,124	26,101
5	10,025	25,831
6	9,987	25,727
7	9,914	25,527
8	9,835	25,311
9	9,731	25,027
10	9,622	24,730
Ortalama Değer (mM)		25,878
Standart Sapma (mM)		0,771
Varyasyon Katsayısı (%VK)		2,981

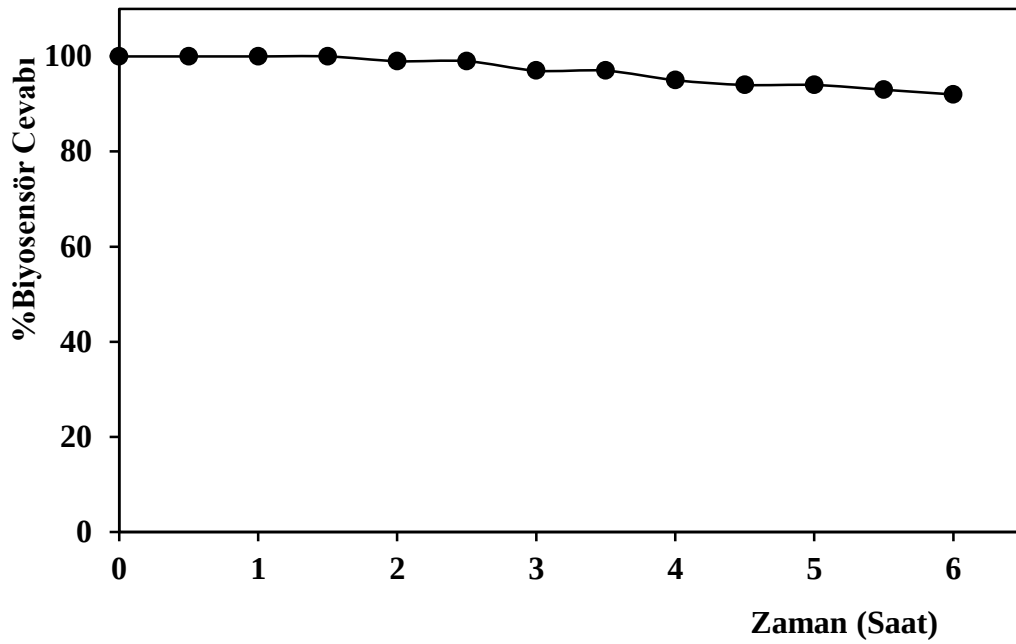
Tablo 4.1. PU-F-%1 polimeriyle hazırlanan biyosensörle 25 mM’lık nitrit ölçümleri için tekrarlanabilirlik sonuçları [0,5 U NR; 2 μL PU-F-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 $\pm$ 2 °C; +0,87 V; DPV].

Ölçüm No	ΔI (μA)	Nitrat (mM)
1	0,7117	5,221
2	0,7103	5,204
3	0,7068	5,160
4	0,7003	5,079
5	0,6987	5,059
6	0,6934	4,993
7	0,6884	4,930
8	0,6882	4,928
9	0,6853	4,891
10	0,6845	4,881
Ortalama Değer (mM)		5,035
Standart Sapma (mM)		0,129
Varyasyon Katsayısı (%VK)		2,564

Tablo 4.2. PU-F-%1 polimeriyle hazırlanan biyosensörle 5 mM’lık nitrat ölçümleri için tekrarlanabilirlik sonuçları [0,5 U NR; 2 μL PU-F-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 $\pm$ 2 °C; +0,87 V; DPV].

4.6.4. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün operasyonel kararlılığı

PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla optimize edilen ölçüm şartlarında 5 mM'lık nitrat derişimleri için 6 saat süresince 30 dakikada bir ölçümler alındı. Ölçüm sonuçları Şekil 4.88'de ki grafikte verilmiştir.



Şekil 4.88. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün operasyonel kararlılığı [0,5 U NR; 2 µL PU-F-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C; +0,87 V; DPV].

4.6.5. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün girişim etkilerinin incelenmesi

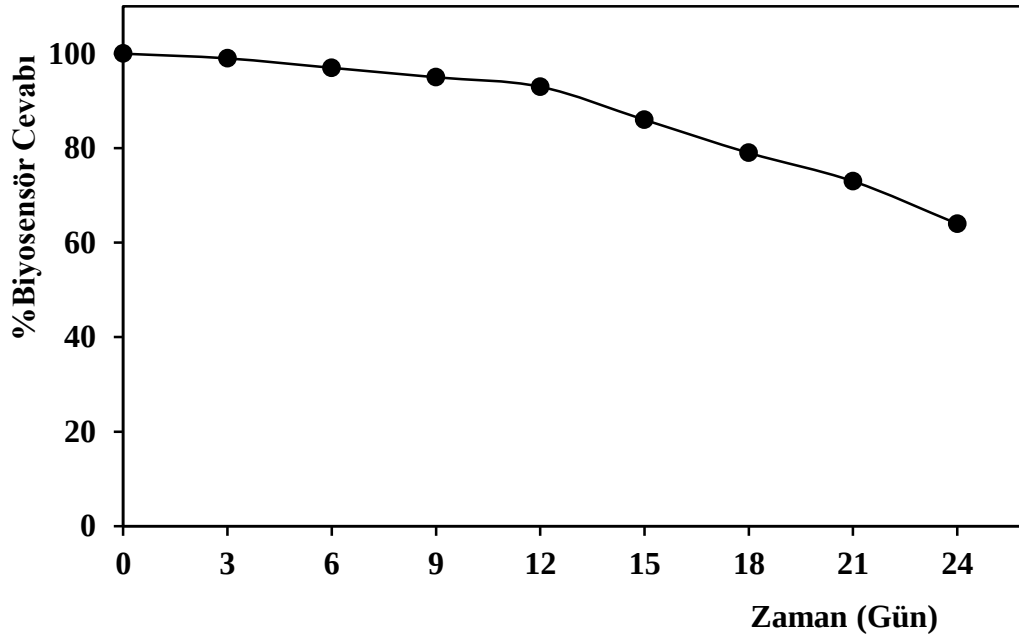
PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün girişim etkilerinin incelenmesi amacıyla ortamda farklı türler varken 25 mM nitrit ve 5 mM nitrat derişimleri için ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda yapılan ölçümlerde ortamda 1 mM olacak şekilde fruktoz, maltoz, süktroz, laktoz, glukoz, askorbik asit, oksalik asit ve üre çözeltileri kullanılmıştır. Girişim türlerine bağlı olarak biyosensör cevabında meydana gelen düşüşler Tablo 4.3'de verilmiştir.

Substrat	%Aktivite	Substrat	%Aktivite
Nitrit	100	Nitrat	100
Nitrit + Fruktoz	93	Nitrat + Fruktoz	88
Nitrit + Maltoz	95	Nitrat + Maltoz	90
Nitrit + Sükroz	95	Nitrat + Sükroz	89
Nitrit + Laktoz	94	Nitrat + Laktoz	87
Nitrit + Glukoz	95	Nitrat + Glukoz	90
Nitrit + Askorbik Asit	97	Nitrat + Askorbik Asit	93
Nitrit + Oksalik Asit	97	Nitrat + Oksalik Asit	93
Nitrit + Üre	96	Nitrat + Üre	91

Tablo 4.3. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün girişim etkilerinin incelenmesi [0,5 U NR; 2 µL PU-F-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C; +0,87 V; DPV].

4.6.6. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün depo kararlılığı

Çalışmanın bu kısmında biyosensörün depolama süresine bağlı olarak aktivitesini ne kadar kaybettiği araştırılmıştır. Geliştirilen biyosensörün depo kararlılığının belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan biyosensör ile başlangıç anında ve üç günlük periyotlar sonunda 5 mM nitrat derişimleri için ölçümler yapılmıştır. Biyosensörün nitrat standardına verdiği cevaplar 24 gün süre ile izlenmiş ve sonuçlar Şekil 4.89’da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde depolama şartlarına bağlı olarak biyosensör cevabında 12 gün sonunda % 7’lik, 24 gün sonunda ise % 36’lık bir düşüş görülmüştür.



Şekil 4.89. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün depo kararlılığı [0,5 U NR; 2 μ L PU-F-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV].

4.7. PU-F-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörle Örnek Uygulamaları

PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün nitrit ve nitrat analizine yönelik uygulanabilirliğini izlemek amacıyla ticari örneklerde ve atık su örneklerinde ölçümler alınmıştır. Ticari örnek olarak salam, sosis ve sucuk kullanılmıştır. Ayrıca 3 adette atık su örneğinde analiz yapılmıştır. Hazırlanan örnek stokları öncelikle referans yöntem olarak nitrit ve nitrat ölçüm kitleriyle okunmuş ve mg/L olarak verilen sonuçlar mM'a çevrilmiştir.

Bu 6 adet örnek hazırlanan biyosensör ile okunmuş ve ilgili standart grafiklerinden örneklerdeki nitrit ve nitrat miktarları hesaplanmıştır. Biyosensör ile yapılan bu ölçümlerde örneklerdeki nitrit ve nitrat düzeyi düşük olduğu için standart katma yöntemi kullanılmıştır. Daha sonra bu ölçüm sonuçları birbiri ile kıyaslanmıştır.

Biyosensör ile örneklerde gerçekleştirilen nitrit ölçüm sonuçları Tablo 4.4'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde ticari örnekler olan sucuk, salam ve sosis için

gerçekleştirilen ölçüm sonuçları referans yöntem olan kit ölçümü ile karşılaştırıldığında alınan yanıtlarda % 14'ün üzerinde düşüşler meydana gelmiştir.

PU-F-%1 polimeri kullanılarak hazırlanan biyosensör ile örneklerde gerçekleştirilen nitrat ölçüm sonuçları Tablo 4.5'de verilmiştir. Ticari örnekler için, biyosensör ile gerçekleştirilen nitrat ölçüm sonuçları, aynı örneklerdeki nitrit ölçüm sonuçları ile karşılaştırıldığında biyosensör yanıtlarında meydana gelen düşüş oranı artmıştır. Nitrat ölçüm sonuçları referans yöntem olan kit ölçümü ile karşılaştırıldığında ise alınan biyosensör yanıtlarında % 21'in üzerinde düşüşler meydana geldiği görülmektedir. Bir numaralı atık su örneği ile gerçekleştirilen nitrat ölçümünde ise biyosensör yanıtında yaklaşık olarak yarı yarıya bir düşüş gözlenmiştir. 2 ve 3 numaralı atık su örneklerinden alınan biyosensör yanıtlarında ise dikkate değer bir düşüş olmadığı görülmüştür.

Örnek	Nitrit		
	Kit Değeri (mM)	Biyosensör Değeri (mM) ± S.S.*	% Yanıt
Sucuk	1,3614	1,1241 ± 0,0325	83
Salam	1,4872	1,2843 ± 0,0286	86
Sosis	1,6398	1,3904 ± 0,0412	85
Atık su 1	0,7761	0,7226 ± 0,0148	93
Atık su 2	0,5609	0,5138 ± 0,0095	96
Atık su 3	2,0136	1,9341 ± 0,0324	96

* Ölçüm sonuçları ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n=3).

Tablo 4.4. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle örneklerde nitrit ölçümü [0,5 U NR; 2 µL PU-F-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C; +0,87 V; DPV].

Örnek	Nitrat		
	Kit Değeri (mM)	Biyosensör Değeri (mM) ± S.S.*	% Yanıt
Sucuk	2,1067	1,5597 ± 0,0141	74
Salam	0,9419	0,7454 ± 0,0035	79
Sosis	0,7032	0,5268 ± 0,0037	75
Atık su 1	0,8475	0,4437 ± 0,0101	52
Atık su 2	2,3258	2,1174 ± 0,0124	91
Atık su 3	2,5387	2,3841 ± 0,0121	94

* Ölçüm sonuçları ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n=3).

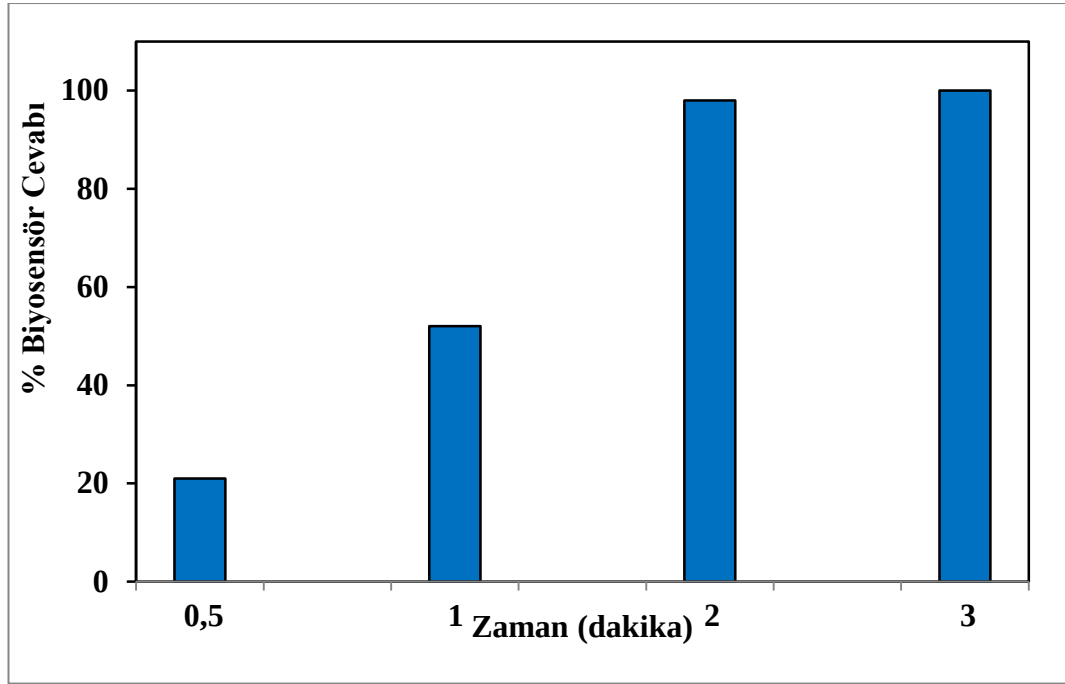
Tablo 4.5. PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle örneklerde nitrat ölçümü [0,5 U NR; 2 µL PU-F-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C; +0,87 V; DPV].

4.8. PU-M-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörün Optimizasyon Çalışmaları

PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan enzim sensörünün optimizasyonuna ilişkin çalışmalarda, hazırlama ve çalışma koşullarının biyosensör cevabına olan etkisi araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda optimizasyonuna yönelik olarak yanıt süresinin, enzim miktarının, koenzim miktarının, pH ve sıcaklığın biyosensör cevabına etkisi incelenmiştir.

4.8.1. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün nitrat ölçümü için yanıt süresinin belirlenmesi

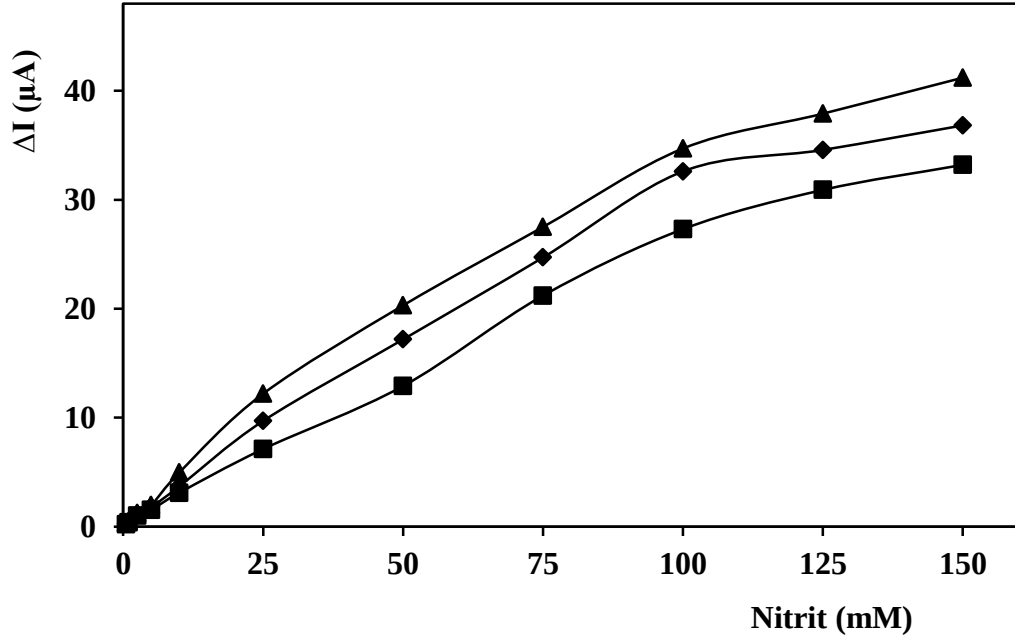
PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör ile 5 mM'lık nitrat derişimleri için yapılan ölçümlerden en yüksek akım farkının olduğu süre tespit edildi. Elde edilen ölçüm sonuçları Şekil 4.90'da verilmiştir. Gerçekleştirilen ölçümler sonucunda 4 farklı zaman için elde edilen veriler kıyaslandığında, en yüksek biyosensör cevabının 3. dakikalarda alındığı görülmektedir. 0,5. dakikada gerçekleştirilen biyosensör ölçümünde % 21'lik bir yanıt alınmıştır. Yine 1. dakikada alınan biyosensör cevabı % 52'dir. 2. dakikada alınan biyosensör yanıtıyla 3. dakikada alınan biyosensör yanıtları birbirine yakın olsa da arada % 2'lik bir fark vardır.



Şekil 4.90. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün nitrat ölçümü için yanıt süresinin belirlenmesi [0,5 U NR; 2 μ L PU-M-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV].

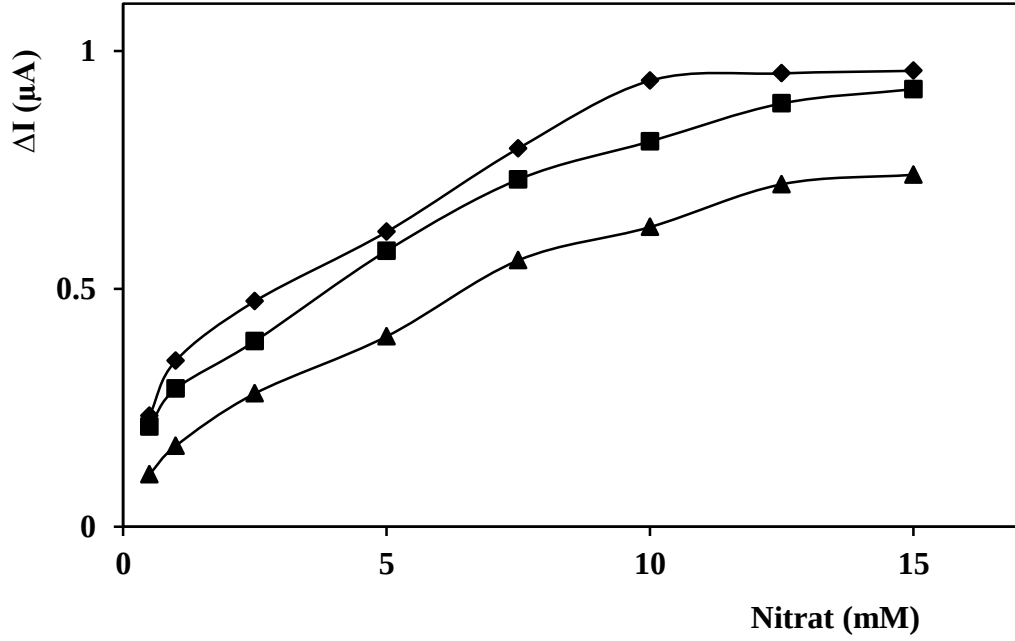
4.8.2. Enzim miktarının PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi

Enzim miktarının hazırlanan biyosensör cevabına etkilerinin incelenmesi için yapılan bu çalışmada, polimer miktarı ve ölçüm şartları sabit tutularak farklı miktarlarda enzim içeren biyosensörlerle nitrit ve nitrat ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda, nitrit ve nitrat derişimlerine karşılık elde edilen akımdaki değişimler grafiğe geçirilmiştir. 0,25 U; 0,5 U ve 1 U NR enzimi içeren biyosensörlerle gerçekleştirilen nitrit ölçümleri Şekil 4.91’de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi nitrit serisi için en yüksek yanıtlar 0,25 U NR enzimi bulunan elektrot ile alınmıştır fakat yanıtlar incelendiğinde bu yanıtlarda alınan doğrusal ölçüm aralığı dardır. NR enzim miktarı 0,5 U ve 1 U yapıldığında biyosensörler için alınan nitrit yanıtlarında düşüşler görülmüştür.



Şekil 4.91. Nitrit ölçümü için enzim miktarının PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi [2 μ L PU-M-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV; $\blacktriangle$ 0,25 U; $\blacklozenge$ 0,5 U; $\blacksquare$ 1 U].

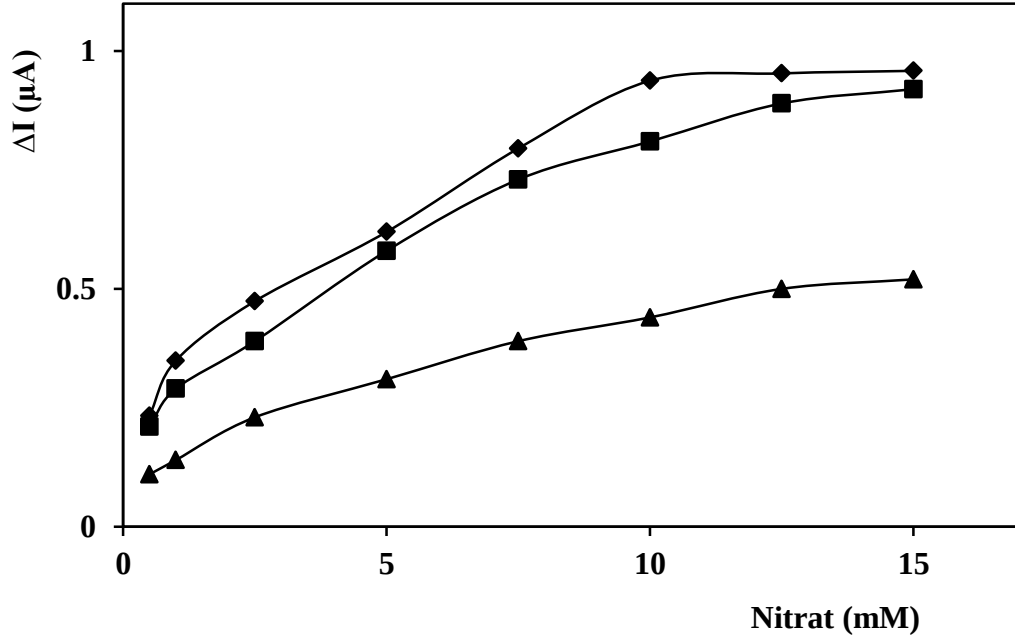
Şekil 4.92’de 0,25 U; 0,5 U ve 1 U NR enzimi içeren biyosensörler ile gerçekleştirilen nitrat ölçümleri görülmektedir. Sonuçlar incelendiğinde en düşük biyosensör yanıtlarının biyoaktif tabakasında 0,25 U NR enzimi içeren biyosensörlerle alındığı görülmüştür. Nitrat ölçümü için en yüksek yanıtların 0,5 U NR enzimi içeren biyosensörle alındığı, 1 U NR enzimi içeren biyosensörle yapılan nitrat ölçümlerinde ise enzim miktarı artmasına rağmen biyosensör yanıtlarda düşmeler gözlenmiştir.



Şekil 4.92. Nitrat ölçümü için enzim miktarının PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi [2 μ L PU-M-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV; $\blacktriangle$ 0,25 U; $\blacklozenge$ 0,5 U; $\blacksquare$ 1 U].

4.8.3. Koenzim miktarının PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi

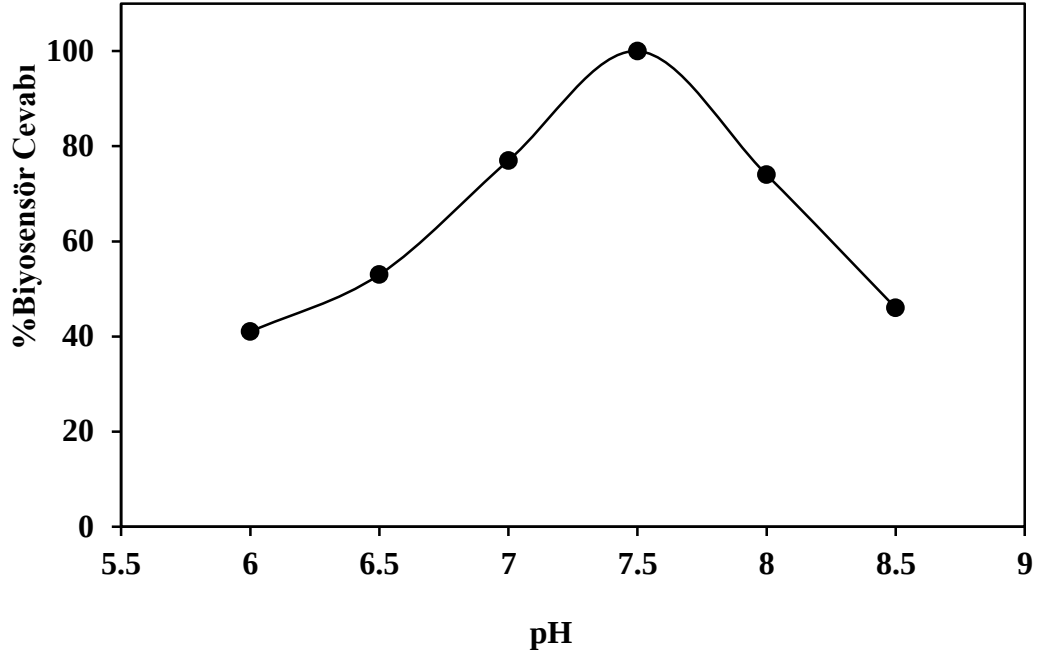
Optimizasyon çalışmalarındaki bir sonraki adım enzimin koenzimi olan NADPH miktarının optimizasyonuydu. Bu amaç doğrultusunda PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan 0,5 U NR enzimi içeren biyosensör ile 0,125 mM; 0,25 mM ve 0,5 mM NADPH varlığında nitrat serisi için gerçekleştirilen ölçüm sonuçları Şekil 4.93'de verilmiştir. En düşük biyosensör yanıtları 0,125 mM NADPH varlığında nitrat serisi için alınan ölçümlerden elde edilmiştir. En yüksek biyosensör cevabı ise 0,25 mM NADPH ile yapılan ölçümlerde alınmıştır. 0,5 mM NADPH için yapılan ölçümlerde ise biyosensör cevabında 0,25 mM NADPH ile yapılan ölçümlere göre bir miktar düşüş gözlenmiştir.



Şekil 4.93. Nitrat ölçümü için koenzim (NADPH) miktarının PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi [0,5 U NR; 2 μ L PU-M-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV; $\blacktriangle$ 0,125 mM; $\blacklozenge$ 0,25 mM; $\blacksquare$ 0,5 mM].

4.8.4. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum pH değerinin belirlenmesi

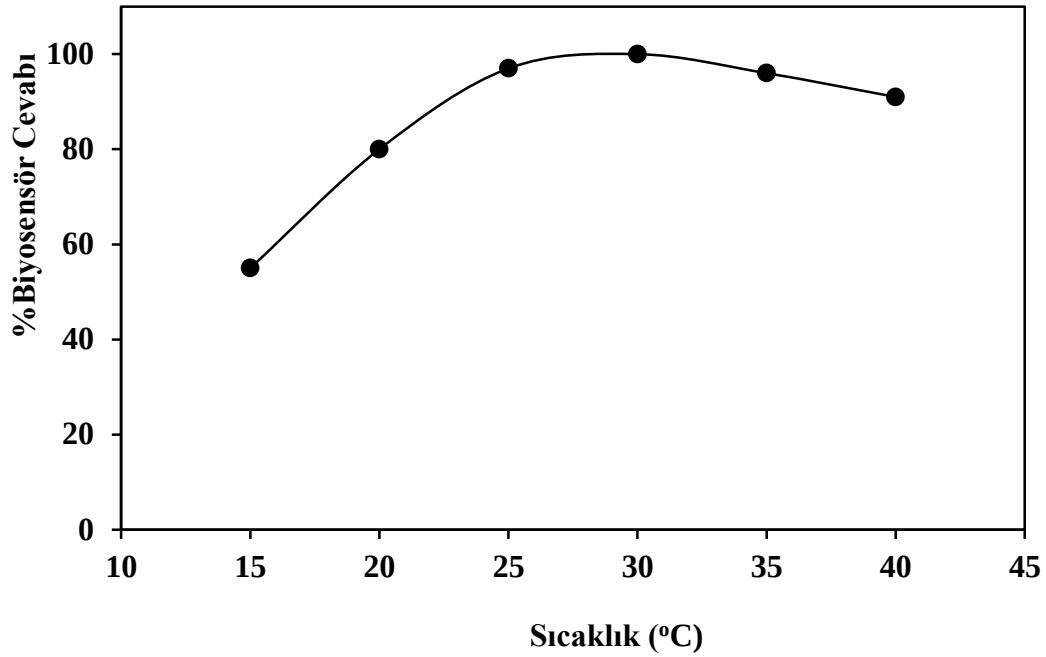
Biyosensörün optimum pH' sını belirlemek amacıyla 6 – 8,5 arasında değişen pH'larda fosfat tamponu ile ölçümler gerçekleştirilmiş ve yapılan denemeler sonucunda pH ve % biyosensör cevabı arasında çizilen optimum pH grafiği Şekil 4.94'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi optimum pH değeri 7,5 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.94. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum pH grafiği [0,5 U NR; 2 μ L PU-M-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 6 – 8,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV].

4.8.5. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum sıcaklığının belirlenmesi

Biyosensörün optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla, düşük sıcaklıktan yüksek sıcaklığa doğru 15 °C ile 40 °C arasında değişen sıcaklıklarda nitrat ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen sıcaklık ve % biyosensör cevabı arasında çizilen grafik Şekil 4.95’de verilmiştir. Grafikten görüldüğü gibi en yüksek biyosensör cevabı 30 °C’de alınmıştır. Optimum sıcaklık grafiği incelendiğinde 25 °C ve 30 °C için alınan biyosensör yanıtlarının birbirine çok yakın olduğu ve aralarında % 3’lük bir fark bulunduğu gözlenmiştir.



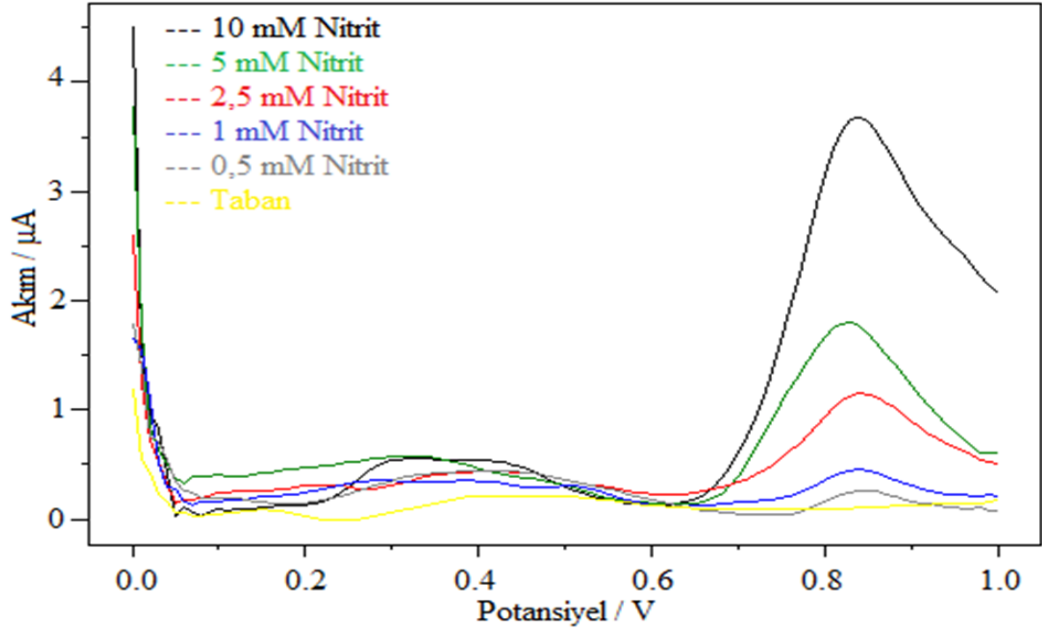
Şekil 4.95. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum sıcaklık grafiği [0,5 U NR; 2 μ L PU-M-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; +0,87 V; DPV].

4.9. PU-M-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları

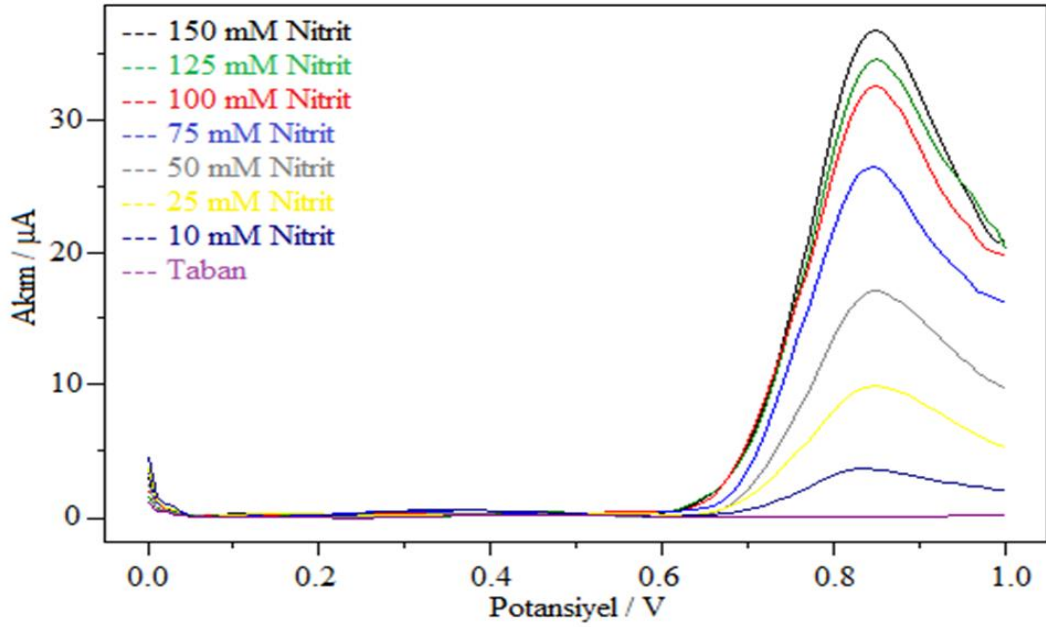
PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimizasyon çalışmalarından sonra karakterizasyon çalışmalarına geçilmiştir.

4.9.1. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

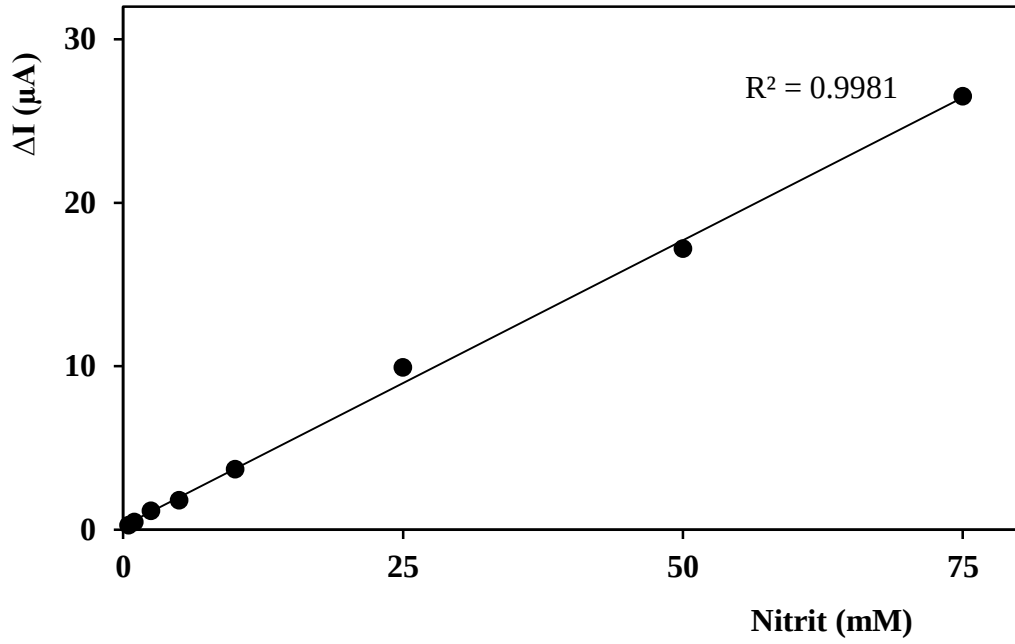
PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün karakterizasyonuna yönelik ilk olarak optimize edilen şartlarda nitrit ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda yapılan çalışmada, 0,5 mM – 10 mM arasında değişen nitrit derişimleri için elde edilen sonuçlar Şekil 4.96’da, 10 mM – 150 mM arasında değişen nitrit derişimleri için yapılan ölçüm sonuçları ise Şekil 4.97’de verilmiştir. Gerçekleştirilen bu ölçümlerde 0,5 mM – 75 mM arasındaki nitrit derişimleri için okunan değerler grafiğe geçirildiğinde Şekil 4.98’deki standart grafiği elde edilmiştir. Elde edilen standart grafiğinin R^2 değeri ise 0,9981 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.96. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 0,5 mM – 10 mM aralığındaki nitrit derişimleri için alınan DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-M-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



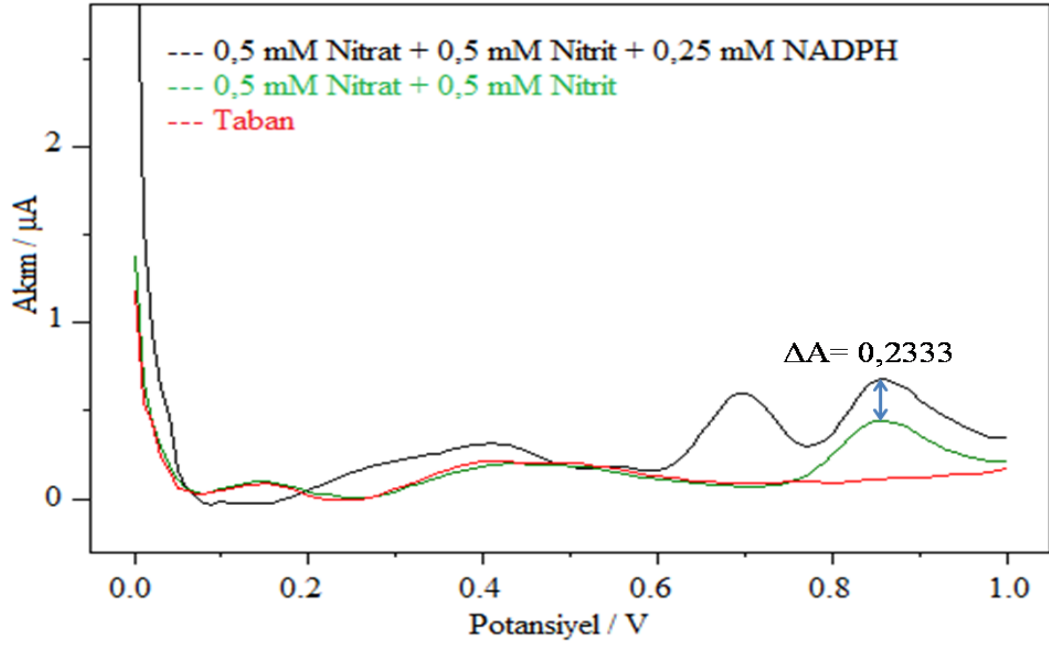
Şekil 4.97. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 10 mM – 150 mM aralığındaki nitrit derişimleri için alınan DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-M-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



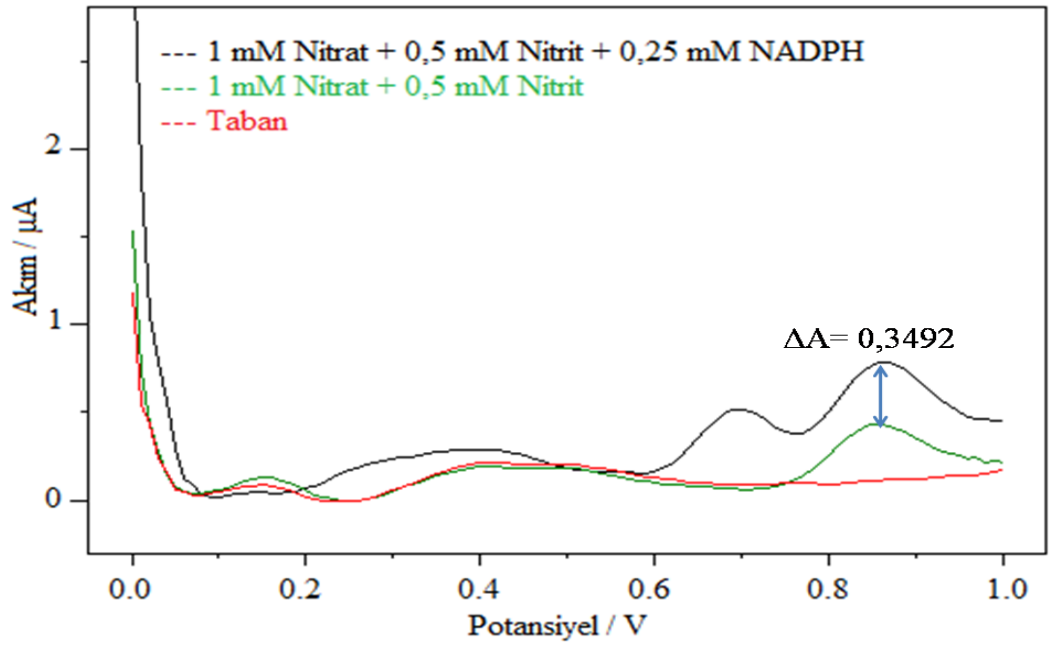
Şekil 4.98. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı [0,5 U NR; 2 μ L PU-M-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV].

4.9.2. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrat tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

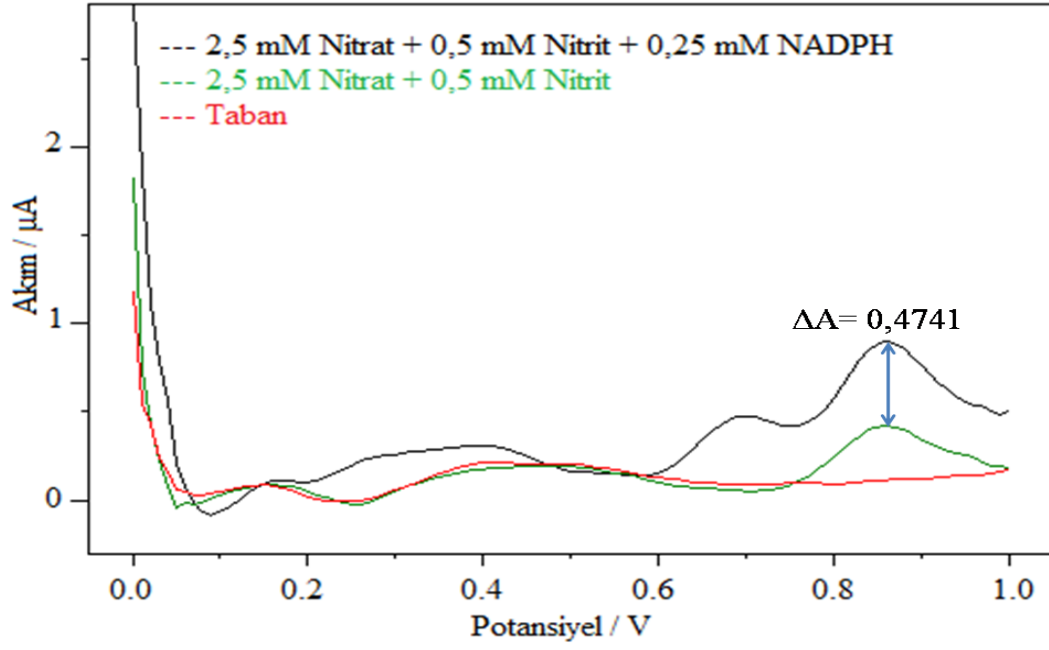
PU-M-%1 polimeri ile hazırlanmış biyosensörle optimize edilen koşullarda 0,5 mM – 15 mM arasında değişen nitrat derişimleri için ölçümler gerçekleştirildi. Her bir nitrat derişimi için cihaz tarafından elde edilen ölçüm sonuçları Şekil 4.99 ve Şekil 4.106 aralığında verilen şekillerde verilmiştir. Ölçülen her bir nitrat derişimi için akımda meydana gelen artışlar bu şekiller üzerinde gösterilmiştir. Nitrat derişimlerine karşılık elde edilen akımdaki değişimler grafiğe geçirildiğinde 1mM’ın altındaki ve 10 mM’ın üstündeki nitrat derişimlerinde doğrusallıktan sapmalar meydana gelmiştir. 1 mM – 10 mM derişim aralığındaki nitrat ölçümleri grafiğe geçirildiğinde nitrat için standart grafiği elde edilmiştir. Bu grafik Şekil 4.107’de verilmiştir ve elde edilen standart grafiğinin R^2 değeri 0,9973 olarak bulunmuştur.



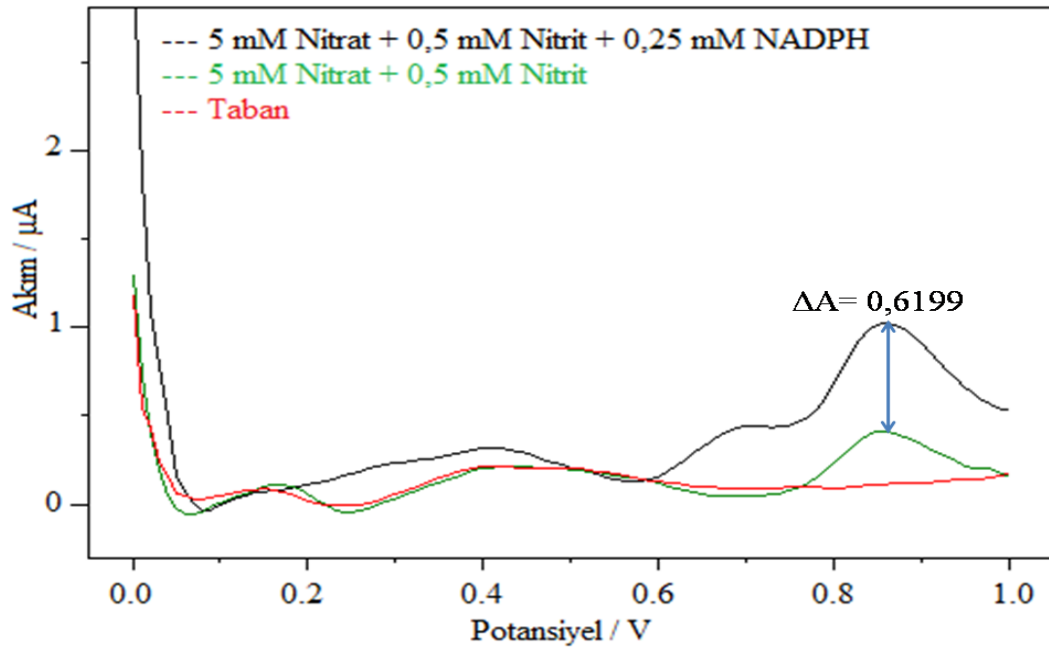
Şekil 4.99. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 0,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 μ L PU-M-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C].



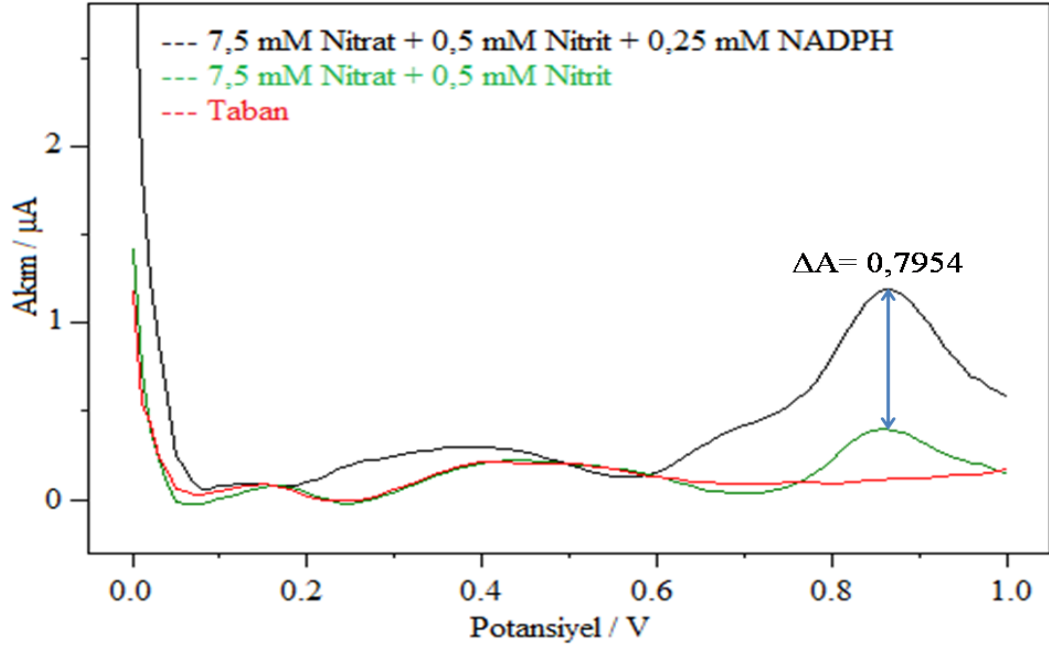
Şekil 4.100. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 1 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 μ L PU-M-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C].



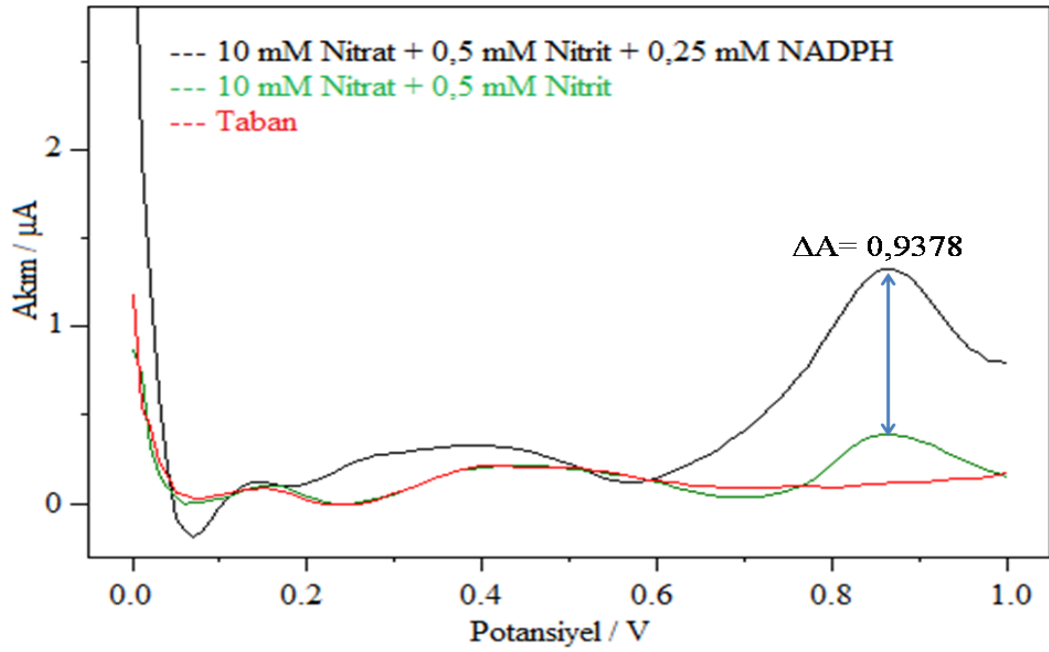
Şekil 4.101. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 2,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-M-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



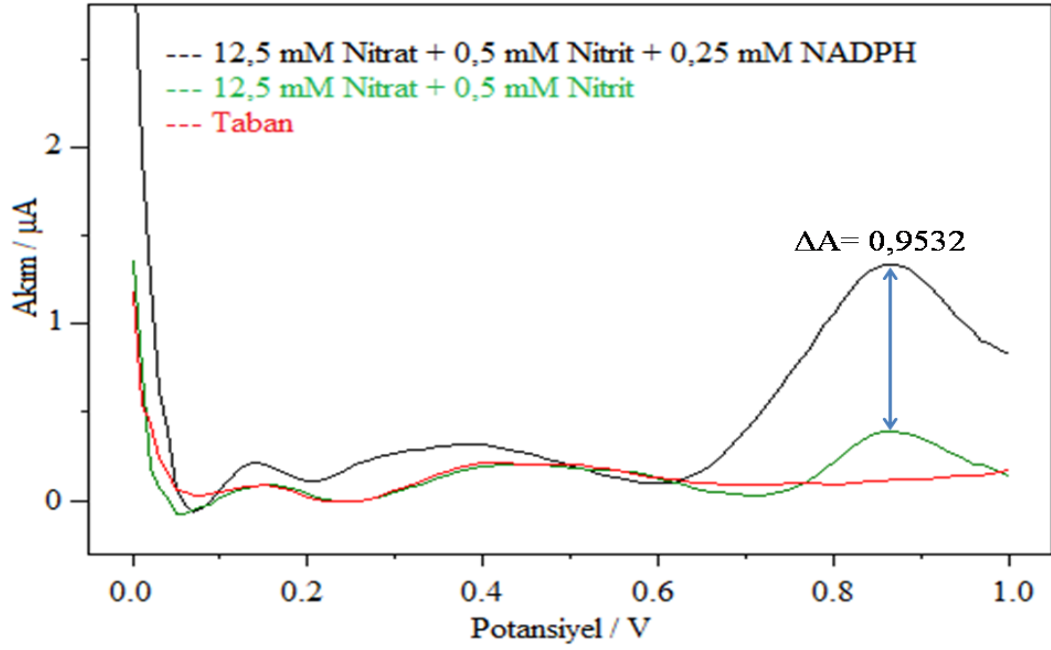
Şekil 4.102. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-M-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



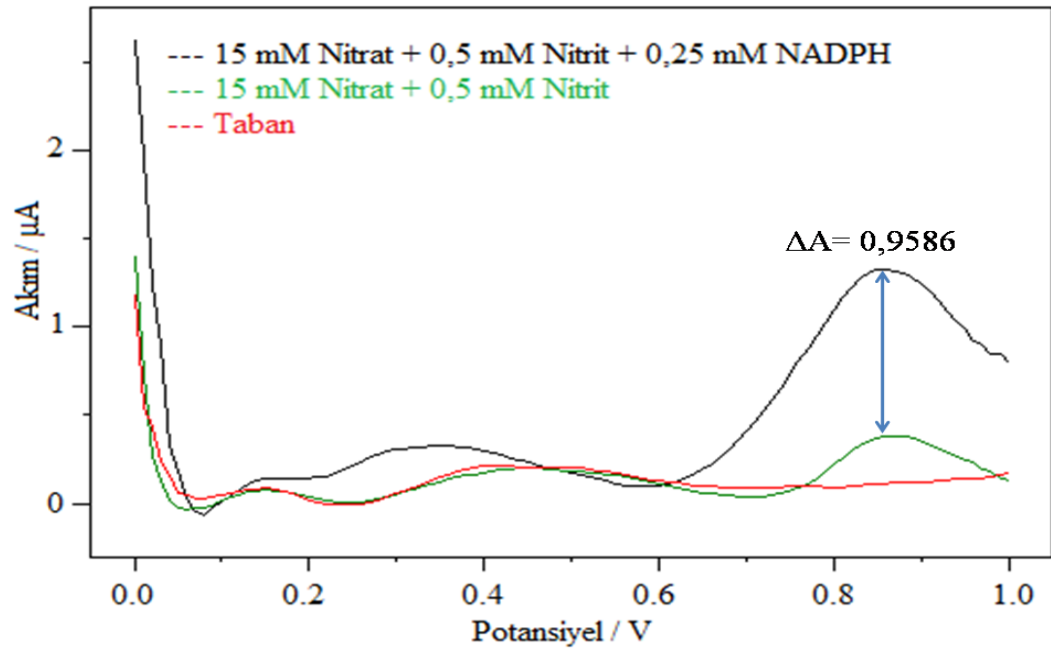
Şekil 4.103. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 7,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-M-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



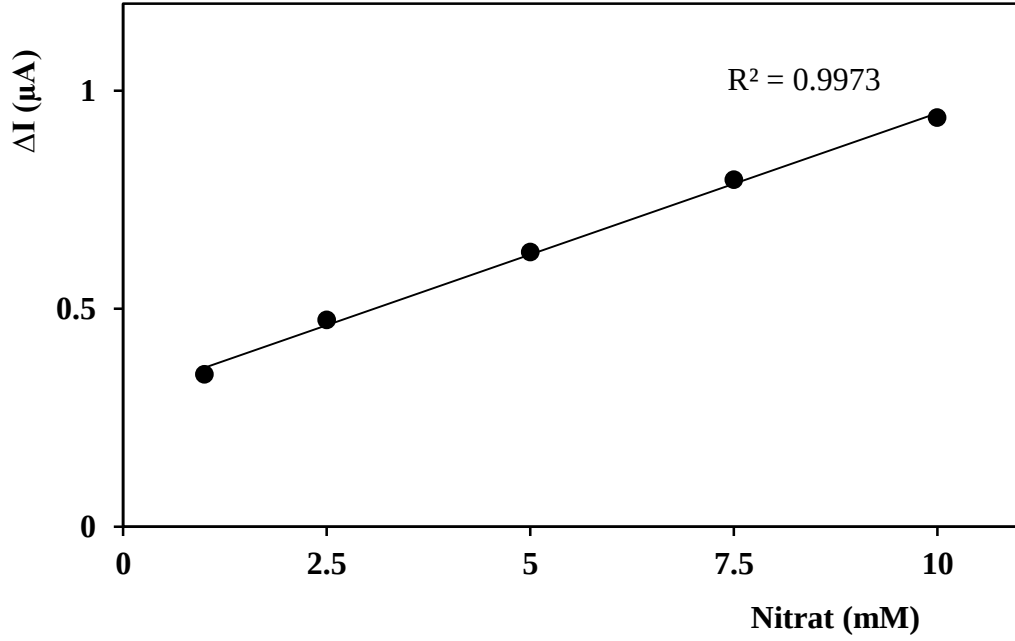
Şekil 4.104. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 10 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-M-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



Şekil 4.105. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 12,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-M-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



Şekil 4.106. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 15 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-M-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



Şekil 4.107. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrat tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı [0,5 U NR; 2 μ L PU-M-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; 0,87 V; DPV].

4.9.3. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit ve nitrat ölçümü için tekrarlanabilirlik

PU-M-%1 polimeri kullanılarak hazırlanan biyosensörle tekrarlanabilir sonuçlar alınıp alınmadığı bu çalışma ile incelenmiştir. Tekrarlanabilirlik çalışmasında hazırlanan biyosensörlerle hem 25 mM’lık nitrit hem de 5 mM’lık nitrat derişimleri için ölçümler alınmıştır. Arka arkaya 10 kez tekrarlanan bu ölçümler sonucunda elde edilen akım farklarına karşılık gelen nitrit ve nitrat derişimleri ilgili standart grafiklerinden okunmuştur. Bu ölçümlerden elde edilen veriler ışığında ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. 25 mM’lık nitrit ölçümleri için elde edilen ölçüm sonuçları, ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri Tablo 4.6’da verilmiştir. 5 mM’lık nitrat ölçümleri için elde edilen ölçüm sonuçları, ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri ise Tablo 4.7’de verilmiştir.

Ölçüm No	ΔI (μA)	Nitrit (mM)
1	9,514	26,599
2	9,412	26,307
3	9,376	26,203
4	9,245	25,828
5	9,124	25,481
6	9,038	25,235
7	9,015	25,169
8	8,925	24,911
9	8,876	24,771
10	8,875	24,768
Ortalama Değer (mM)		25,527
Standart Sapma (mM)		0,671
Varyasyon Katsayısı (%VK)		2,627

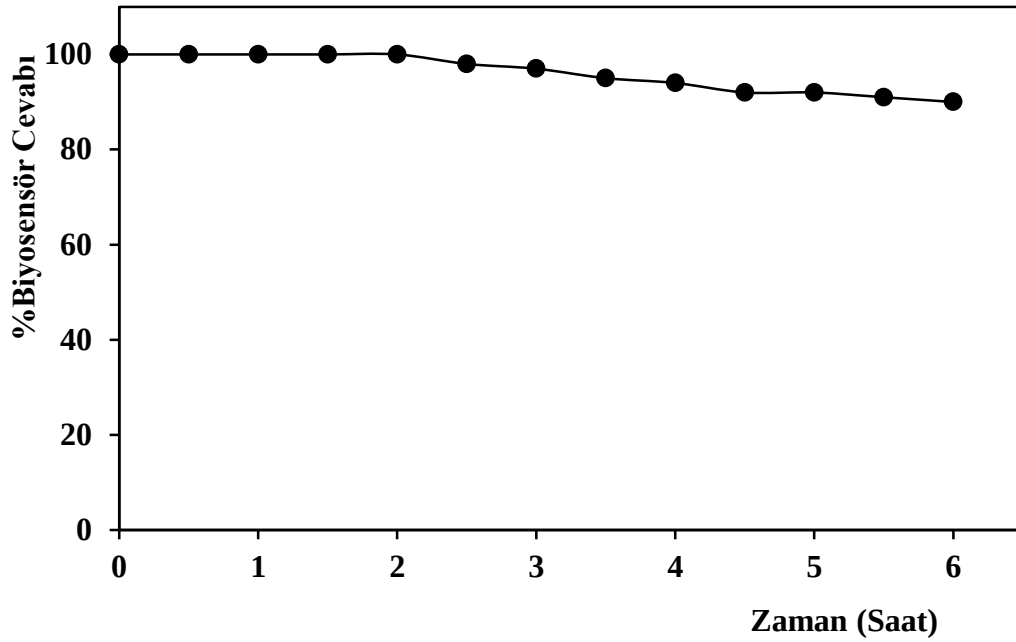
Tablo 4.6. PU-M-%1 polimeriyle hazırlanan biyosensörle 25 mM’lık nitrit ölçümleri için tekrarlanabilirlik sonuçları [0,5 U NR; 2 μL PU-M-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 $\pm$ 2 °C; +0,87 V; DPV].

Ölçüm No	ΔI (μA)	Nitrat (mM)
1	0,6299	5,202
2	0,6224	5,084
3	0,6208	5,059
4	0,6198	5,044
5	0,6183	5,020
6	0,6179	5,014
7	0,6154	4,975
8	0,6129	4,936
9	0,6112	4,909
10	0,6106	4,900
Ortalama Değer (mM)		5,014
Standart Sapma (mM)		0,091
Varyasyon Katsayısı (%VK)		1,817

Tablo 4.7. PU-M-%1 polimeriyle hazırlanan biyosensörle 5 mM’lık nitrat ölçümleri için tekrarlanabilirlik sonuçları [0,5 U NR; 2 μL PU-M-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 $\pm$ 2 °C; +0,87 V; DPV].

4.9.4. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün operasyonel kararlılığı

PU-M-%1 polimeri temelli biyosensörün operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla hazırlanan yeni bir biyosensör ile optimize edilen ölçüm şartlarında 5 mM'lık nitrat derişimleri için 6 saat süresince 30 dakikada bir ölçümler gerçekleştirildi. Elde edilen ölçüm sonuçları Şekil 4.108'de ki grafikte verilmiştir.



Şekil 4.108. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün operasyonel kararlılığı [0,5 U NR; 2 μ L PU-M-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV].

4.9.5. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün girişim etkilerinin incelenmesi

Biyosensörler ile ölçüm alınırken ortamda bulunan ve girişim yaratan farklı türler her zaman ölçüm sonuçlarını etkilemektedirler. Hazırlanan biyosensörün girişim etkilerinin incelenmesi amacıyla ortamda farklı türler varken 25 mM nitrit ve 5 mM nitrat derişimleri için ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda yapılan ölçümlerde ortamda 1 mM olacak şekilde fruktoz, maltoz, süktroz, laktoz, glukoz, askorbik asit, oksalik asit ve üre çözeltileri kullanılmıştır. Bu girişim

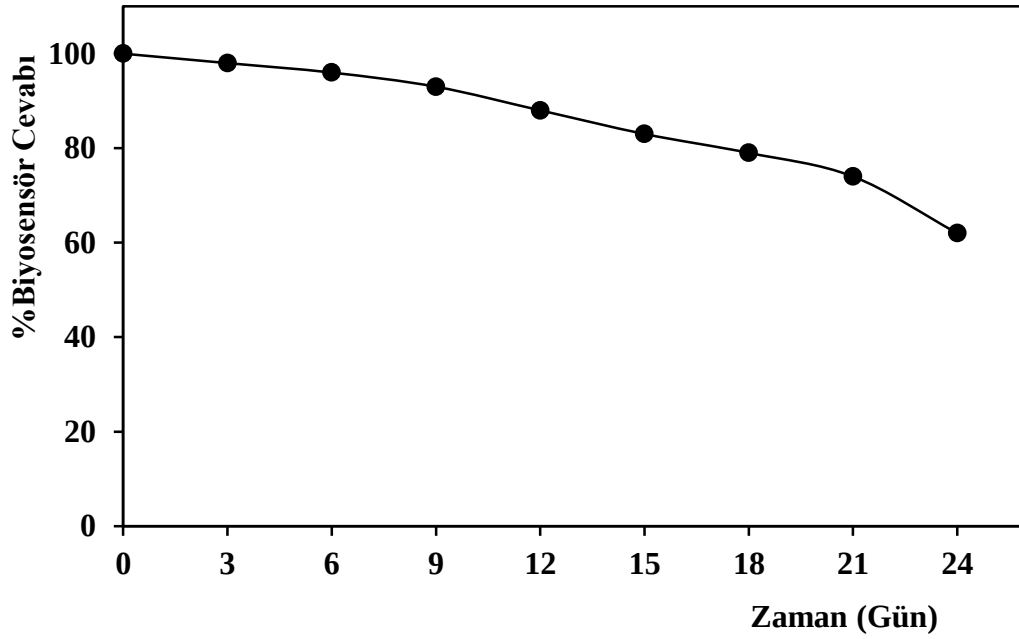
türlerine bağlı olarak biyosensör cevabında meydana gelen düşüşler Tablo 4.8’de verilmiştir.

Substrat	%Aktivite	Substrat	%Aktivite
Nitrit	100	Nitrat	100
Nitrit + Fruktoz	92	Nitrat + Fruktoz	88
Nitrit + Maltoz	95	Nitrat + Maltoz	89
Nitrit + Sükroz	94	Nitrat + Sükroz	89
Nitrit + Laktoz	92	Nitrat + Laktoz	90
Nitrit + Glukoz	93	Nitrat + Glukoz	89
Nitrit + Askorbik Asit	98	Nitrat + Askorbik Asit	93
Nitrit + Oksalik Asit	97	Nitrat + Oksalik Asit	92
Nitrit + Üre	96	Nitrat + Üre	90

Tablo 4.8. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün girişim etkilerinin incelenmesi [0,5 U NR; 2 µL PU-M-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C; +0,87 V; DPV].

4.9.6. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün depo kararlılığı

PU-M-%1 polimeri temelli biyosensörün depolama süresine bağlı olarak aktivitesinde ne gibi değişiklikler olduğunun belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada, yeni hazırlanan biyosensör ile başlangıç anında ve üç günlük periyotlar sonunda 5 mM nitrat derişimleri için ölçümler yapılmıştır. Biyosensörün nitrat standardına verdiği cevaplar 24 gün süre ile izlenmiş ve sonuçlar Şekil 4.109’da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde depolama şartlarına bağlı olarak biyosensör cevabında 12 gün sonunda % 12’lik, 24 gün sonunda ise % 38’lik bir düşüş görülmüştür.



Şekil 4.109. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün depo kararlılığı [0,5 U NR; 2 μ L PU-M-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV].

4.10. PU-M-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörle Örnek Uygulamaları

PU-M-%1 polimeri temelli biyosensörün nitrit ve nitrat tayinine yönelik uygulanabilirliğini izlemek amacıyla ticari örneklerde ve atık su örneklerinde ölçümler alınmıştır. Ticari örnek olarak salam, sosis ve sucuk kullanılmıştır. Ayrıca 3 adette atık su örneğinde analiz yapılmıştır. Hazırlanan örnek stokları öncelikle referans yöntem olarak nitrit ve nitrat ölçüm kitleriyle okunmuş ve mg/L olarak verilen sonuçlar mM'a çevrilmiştir.

Daha sonra bu 6 adet örnek hazırlanan biyosensör ile okunmuş ve ilgili standart grafiklerinden örneklerdeki nitrit ve nitrat miktarları hesaplanmıştır. Biyosensör ile yapılan ölçümlerde örneklerdeki nitrit ve nitrat düzeyi düşük olduğu için standart katma yöntemi kullanılmıştır. Daha sonra bu ölçüm sonuçları birbiri ile kıyaslanmıştır.

Nitrit ölçümleri için elde edilen kit ve biyosensör sonuçları Tablo 4.9'da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde sucuk, salam ve sosis için gerçekleştirilen biyosensör ölçüm sonuçları referans yöntem olan kit ölçümü ile karşılaştırıldığında

alınan yanıtlarda düşüşler meydana gelmiştir. En fazla düşüş % 16 ile sucukta meydana gelirken en az düşüş % 12 ile salamda meydana gelmiştir. Biyosensör ile atık su örneklerinde gerçekleştirilen nitrit ölçümlerinde ise yanıtlarda ki düşüş oranının daha az olduğu görülmüştür.

Nitrat ölçümleri için elde edilen kit ve biyosensör sonuçları Tablo 4.10'da verilmiştir. PU-F-%1 polimeri kullanılarak hazırlanan biyosensör ile ticari örnekler için gerçekleştirilen nitrat ölçüm sonuçları, aynı örneklerdeki nitrit ölçüm sonuçları ile karşılaştırıldığında biyosensör yanıtlarında meydana gelen düşüş oranı artmıştır. Ticari örnekler için alınan nitrat ölçüm sonuçları referans yöntem olan kit ölçümü ile karşılaştırıldığında ise biyosensör yanıtlarında en fazla düşüş % 24 ile sosiste gözlenmiştir. Bunuda sırasıya % 23 ile sucuk ve % 22 ile salam takip etmiştir.

Atık su örnekleri için alınan biyosensör yanıtları incelendiğinde ise 1 numaralı atık su örneği ile gerçekleştirilen nitrat ölçümünde % 43' lük bir düşüş gözlenmiştir. PU-F-%1 biyosensörü ile gerçekleştirilen ölçümde de yine 1 numaralı atık su örneği için düşük yanıt alınmıştır. 2 ve 3 numaralı atık su örneklerinden alınan biyosensör yanıtlarında ise % 7'lik bir düşüş görülmüştür.

Örnek	Nitrit		
	Kit Değeri (mM)	Biyosensör Değeri (mM) ± S.S.*	%Yanıt
Sucuk	1,3614	1,1485 ± 0,0382	84
Salam	1,4872	1,3031 ± 0,0319	88
Sosis	1,6398	1,4222 ± 0,0274	87
Atık su 1	0,7761	0,7239 ± 0,0163	93
Atık su 2	0,5609	0,5462 ± 0,0108	97
Atık su 3	2,0136	1,9256 ± 0,0415	96

* Ölçüm sonuçları ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n=3).

Tablo 4.9. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle örneklerde nitrit ölçümü [0,5 U NR; 2 µL PU-M-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C; +0,87 V; DPV].

Örnek	Nitrat		
	Kit Değeri (mM)	Biyosensör Değeri (mM) ± S.S.*	%Yanıt
Sucuk	2,1067	1,6308 ± 0,0153	77
Salam	0,9419	0,7318 ± 0,0046	78
Sosis	0,7032	0,5375 ± 0,0037	76
Atık su 1	0,8475	0,4841 ± 0,0095	57
Atık su 2	2,3258	2,1602 ± 0,0142	93
Atık su 3	2,5387	2,3577 ± 0,0158	93

* Ölçüm sonuçları ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n=3).

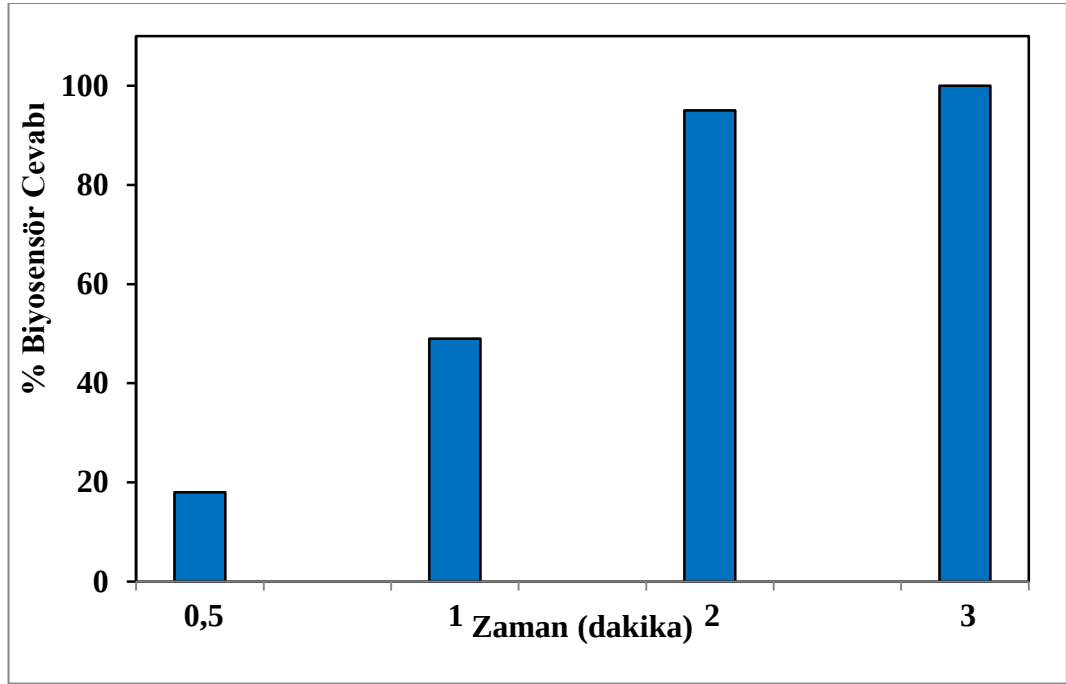
Tablo 4.10. PU-M-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle örneklerde nitrat ölçümü [0,5 U NR; 2 µL PU-M-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C; +0,87 V; DPV].

4.11. PU-L-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörün Optimizasyon Çalışmaları

PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimizasyonuna ilişkin çalışmalarda çeşitli parametrelerin biyosensör cevabına olan etkisi incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda hazırlama koşullarının ve çalışma koşullarının optimizasyonuna yönelik olarak yanıt süresinin, enzim miktarının, koenzim miktarının, pH ve sıcaklığın biyosensör cevabına etkisi incelenmiştir.

4.11.1. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün nitrat ölçümü için yanıt süresinin belirlenmesi

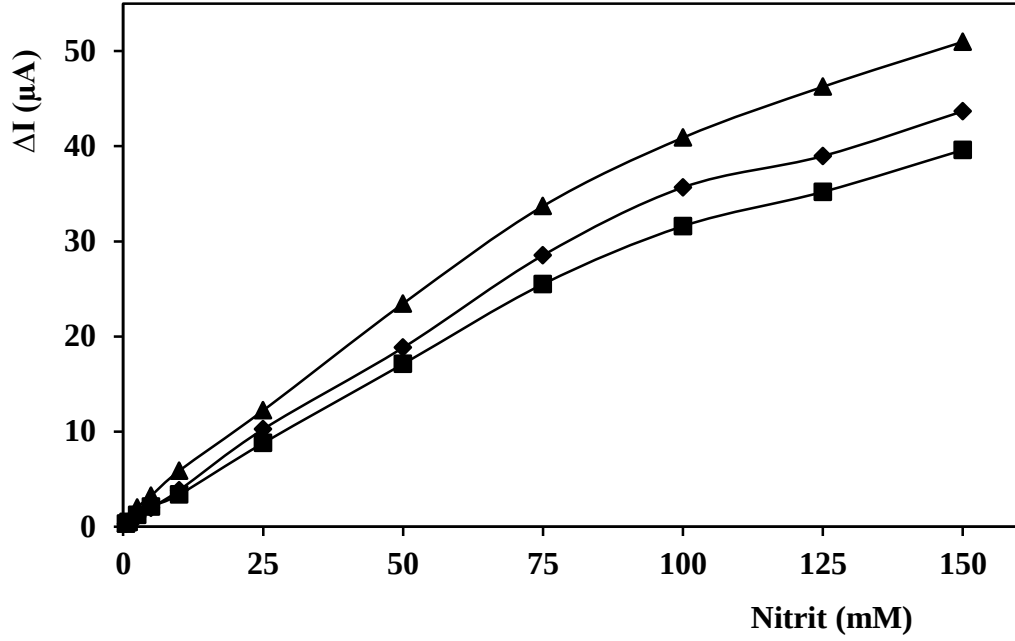
Biyoaktif tabakasında 0,5 U NR enzimi içeren ve PU-L-%1 polimeri kaplanarak hazırlanan biyosensörün 5 mM'lık nitrat derişimi için farklı sürelerde verdiği biyosensör yanıtları Şekil 4.110'da verilmişti. Dört farklı zamanda gerçekleştirilen nitrat ölçümleri kıyaslandığında, en yüksek biyosensör cevabının 3. dakikalarda alındığı görülmektedir. Hazırlanan biyosensör ile 0,5. dakikada alınan yanıt 3. dakikada alınan yanıtla göre % 82'lik bir düşüş göstermiştir. Yine 1. dakikada alınan biyosensör cevabında 3. dakikada alınan yanıtla göre % 51'lik bir düşme olmuştur. 2. dakikada ve 3. dakikada alınan biyosensör yanıtları arasında ise % 5'lik bir fark gözlenmiştir.



Şekil 4.110. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün nitrat ölçümü için yanıt süresinin belirlenmesi [0,5 U NR; 2 μ L PU-L-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV].

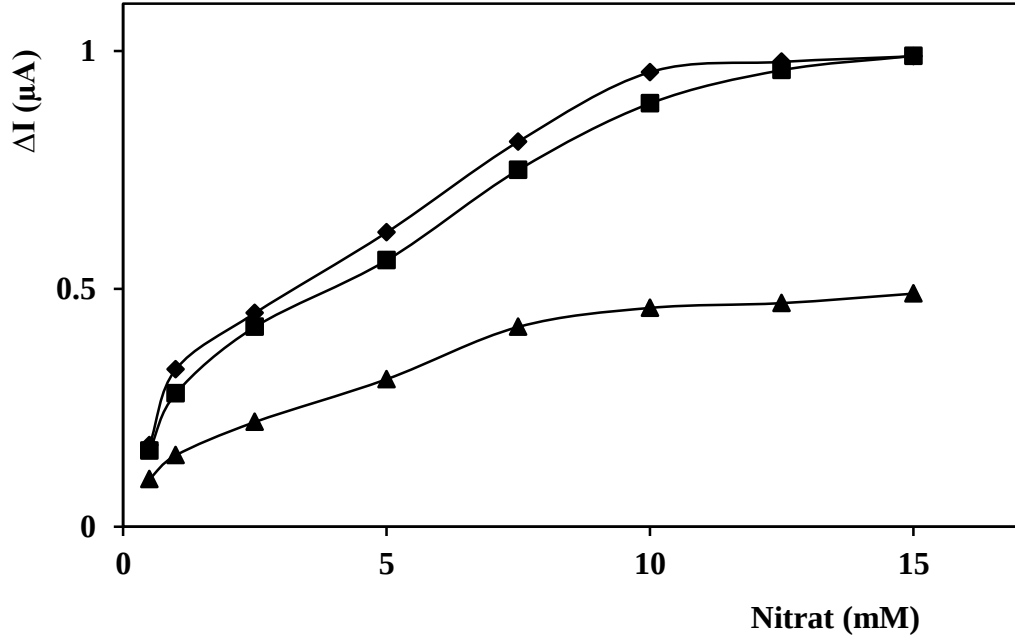
4.11.2. Enzim miktarının PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi

Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisini belirlemek amacıyla polimer miktarı sabit tutularak, farklı miktarlarda enzim içeren biyosensörler hazırlanmıştır. Bu biyosensörler ile sabit tutulan ölçüm şartlarında nitrit ve nitrat ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Farklı miktarlarda enzim içeren bu biyosensörler ile yapılan ölçümlerde nitrit ve nitrat derişimlerine karşılık akımdaki değışimler grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.111’de 0,25 U; 0,5 U ve 1 U NR enzimi içeren biyosensörler ile gerçekleştirilen nitrit ölçümleri görölmektedir. Nitrit serisi için en yüksek yanıtın 0,25 U NR enzimi bulunduran biyosensör ile alındığı görölmektedir. 0,5 U ve 1 U NR enzimiyle hazırlanan biyosensörler için aynı derişimlerde alınan nitrit yanıtlarında düşüşler gözlenmiştir.



Şekil 4.111. Nitrit ölçümü için enzim miktarının PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi [2 μ L PU-L-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV; $\blacktriangle$ 0,25 U; $\blacklozenge$ 0,5 U; $\blacksquare$ 1 U].

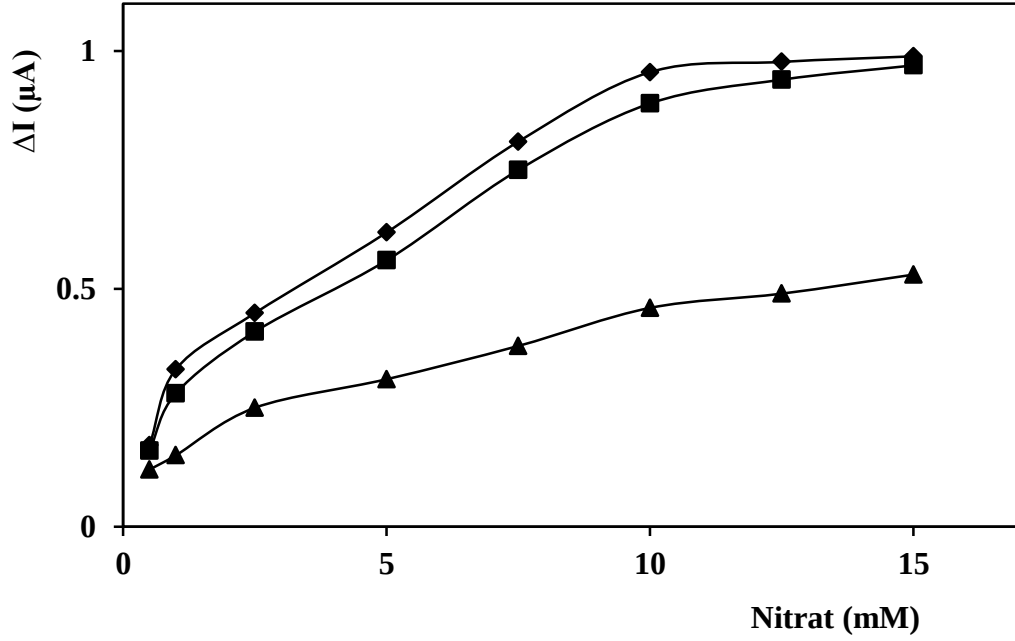
Biyoaktif tabakada bulunan enzim miktarının nitrat ölçümünü nasıl etkilediğini incelemek için, 0,25 U; 0,5 U ve 1 U NR enzimi içeren biyosensörlerle denemeler yapıldı. Farklı miktarlarda enzim içeren bu biyosensörlerle gerçekleştirilen nitrat ölçümleri Şekil 4.112’de verilmiştir. Nitrat ölçümleri incelendiğinde en düşük biyosensör yanıtlarının biyoaktif tabakasında 0,25 U NR enzimi içeren biyosensörlerle alındığı görülmüştür. 0,5 U NR enzimi içeren biyosensörle elde edilen sonuçlar incelendiğinde 0,25 U enzim içeren biyosensöre göre daha yüksek yanıtlar elde edilmiştir. 1 U NR enzimi içeren biyosensörle yapılan ölçümde ise 0,5 U’ye göre artan enzim miktarına rağmen biyosensör yanıtlarında düşmeler görülmüştür.



Şekil 4.112. Nitrat ölçümü için enzim miktarının PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi [2 μ L PU-L-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV; $\blacktriangle$ 0,25 U; $\blacklozenge$ 0,5 U; $\blacksquare$ 1 U].

4.11.3. Koenzim miktarının PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi

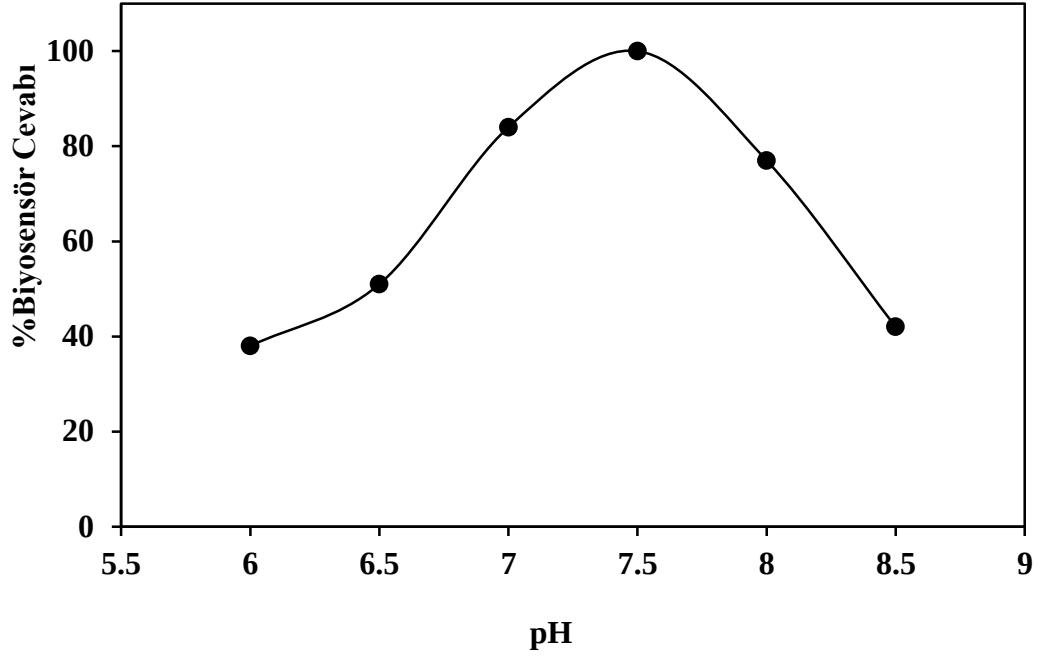
Enzim miktarı optimize edildikten sonra, enzimin koenzimi olan NADPH miktarının optimizasyonuna geçildi. Bu amaç doğrultusunda PU-L-%1 polimeri ile hazırlanmış 0,5 U NR enzimi içeren biyosensör ile 0,125 mM; 0,25 mM ve 0,5 mM NADPH varlığında nitrat serisi için gerçekleştirilen ölçüm sonuçları Şekil 4.113’de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde en düşük biyosensör yanıtlarının 0,125 mM NADPH varlığında gerçekleştirilen nitrat ölçümleri için alındığı görülmektedir. En yüksek biyosensör cevabı ise 0,25 mM NADPH ile yapılan ölçümlerde alınmıştır. 0,5 mM NADPH için yapılan ölçümlerde ise biyosensör cevabında 0,25 mM NADPH ile yapılan ölçümlere göre bir miktar düşüş gözlenmiştir.



Şekil 4.113. Nitrat ölçümü için koenzim (NADPH) miktarının PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi [0,5 U NR; 2 μ L PU-L-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV; $\blacktriangle$ 0,125 mM; $\blacklozenge$ 0,25 mM; $\blacksquare$ 0,5 mM].

4.11.4. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum pH değerinin belirlenmesi

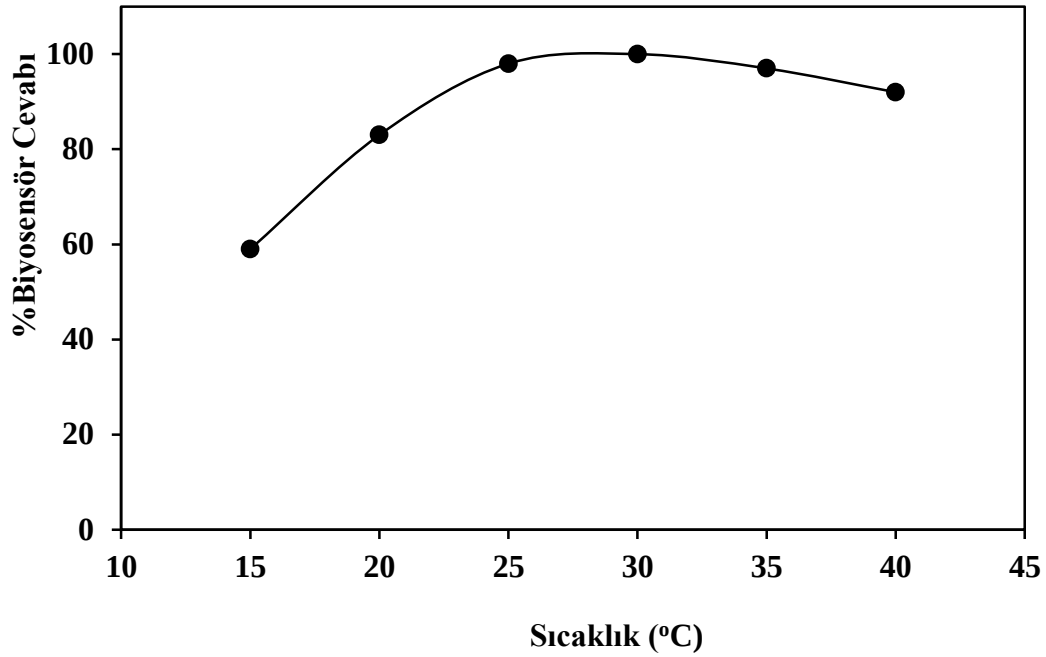
Biyosensörün pH davranışlarını belirlemek amacıyla 6 – 8,5 arasında değişen pH'larda fosfat tamponu ile 5 mM'lık nitrat için ölçümler gerçekleştirilmiş ve yapılan denemeler sonucunda pH ve % biyosensör cevabı arasında çizilen optimum pH grafiği Şekil 4.114'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi enzimin optimum pH değeri 7,5 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.114. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum pH grafiği [0,5 U NR; 2 μ L PU-L-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 6 – 8,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV].

4.11.5. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum sıcaklığının belirlenmesi

Bu amaç doğrultusunda biyosensörün optimum sıcaklığını belirlemek için 15 °C ile 40 °C arasında değişen sıcaklıklarda ve düşük sıcaklıktan başlayarak yüksek sıcaklığa doğru nitrat ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen sıcaklık ve % biyosensör cevabı arasında çizilen optimum sıcaklık grafiği Şekil 4.115’de verilmiştir. Grafik incelendiğinde en yüksek biyosensör cevabının 30 °C’ de alındığı görülmüştür. 25 °C için elde edilen biyosensör yanıtının 30 °C için alınan biyosensör yanıtına yakın olduğu ve aralarında % 2’lik bir fark bulunduğu görülmüştür.



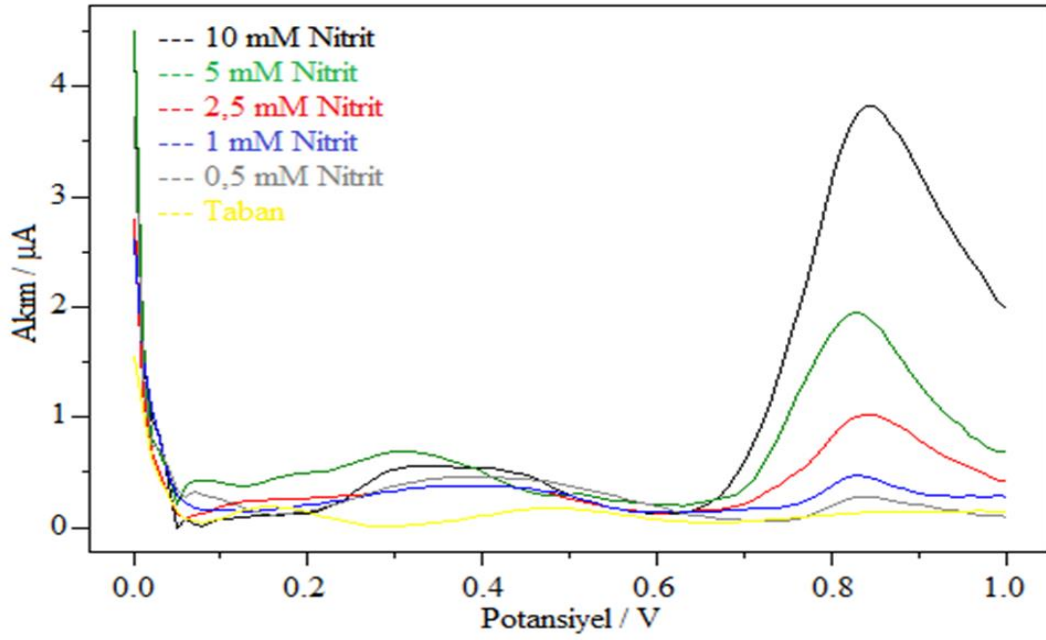
Şekil 4.115. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum sıcaklık grafiği [0,5 U NR; 2 µL PU-L-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; +0,87 V; DPV].

4.12. PU-L-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları

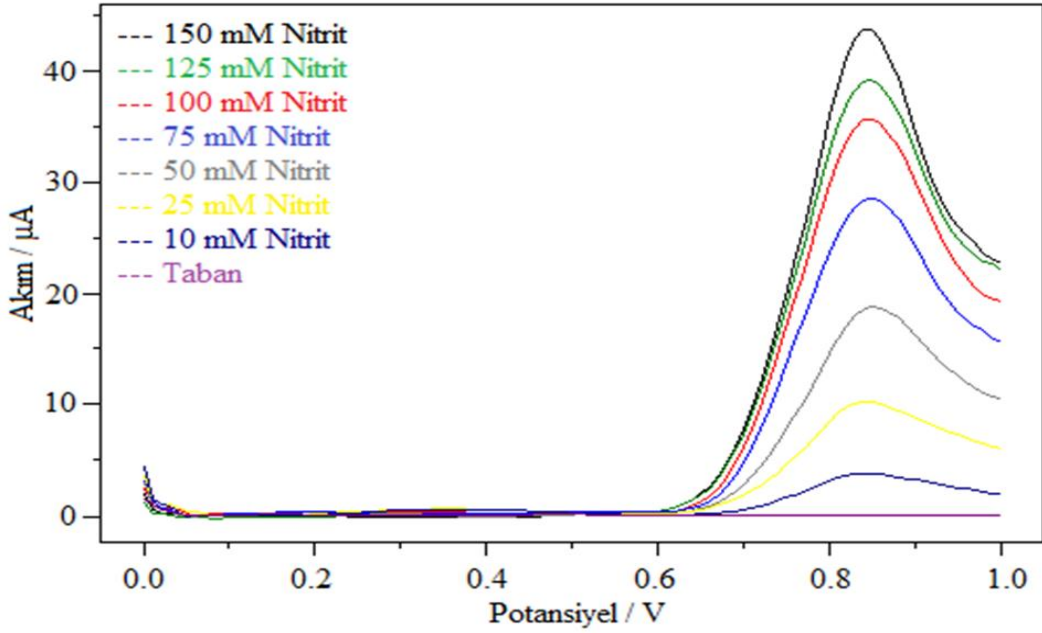
PU-L-%1 polimeri temelli biyosensörün hazırlama ve çalışma koşullarının optimizasyonundan sonra karakterizasyon çalışmalarına geçilmiştir.

4.12.1. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

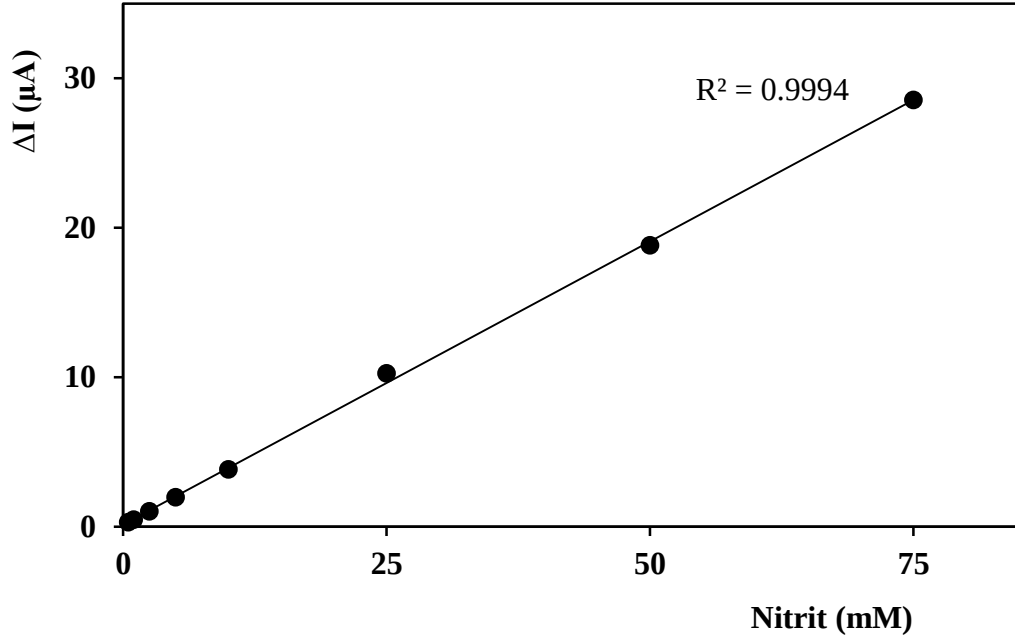
Biyosensörün nitrit için doğrusal tayin aralığının belirlenmesi amacıyla optimize edilen koşullarda farklı derişimlerde ki nitrit çözeltileri için ölçümler gerçekleştirildi. Yapılan çalışmalarda, 0,5 mM – 10 mM arasında değişen nitrit derişimleri için elde edilen ölçüm sonuçları Şekil 4.116’da, 10 mM – 150 mM arasında değişen nitrit derişimleri için elde edilen ölçüm sonuçları ise Şekil 4.117’de verilmiştir. 0,5 mM – 75 mM arasındaki nitrit derişimleri için elde edilen akım değerleri grafiğe geçirildiğinde Şekil 4.118’de ki standart grafiği oluşturulmuştur. Elde edilen standart grafiğinin R^2 değeri ise 0,9994 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.116. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 0,5 mM – 10 mM aralığındaki nitrit derişimleri için alınan DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-L-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



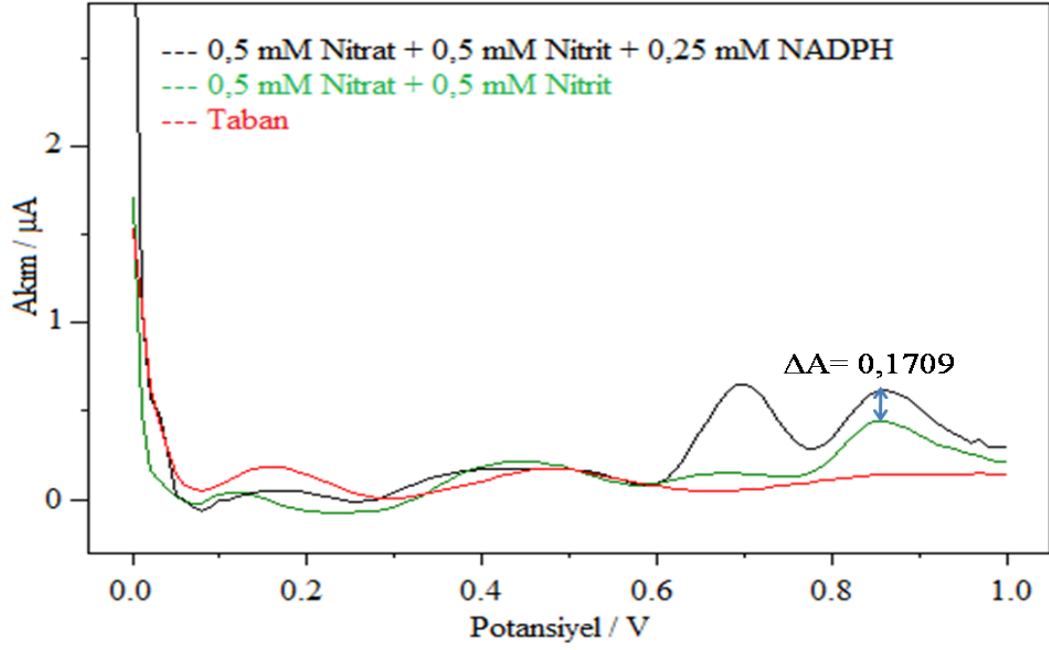
Şekil 4.117. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 10 mM – 150 mM aralığındaki nitrit derişimleri için alınan DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-L-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



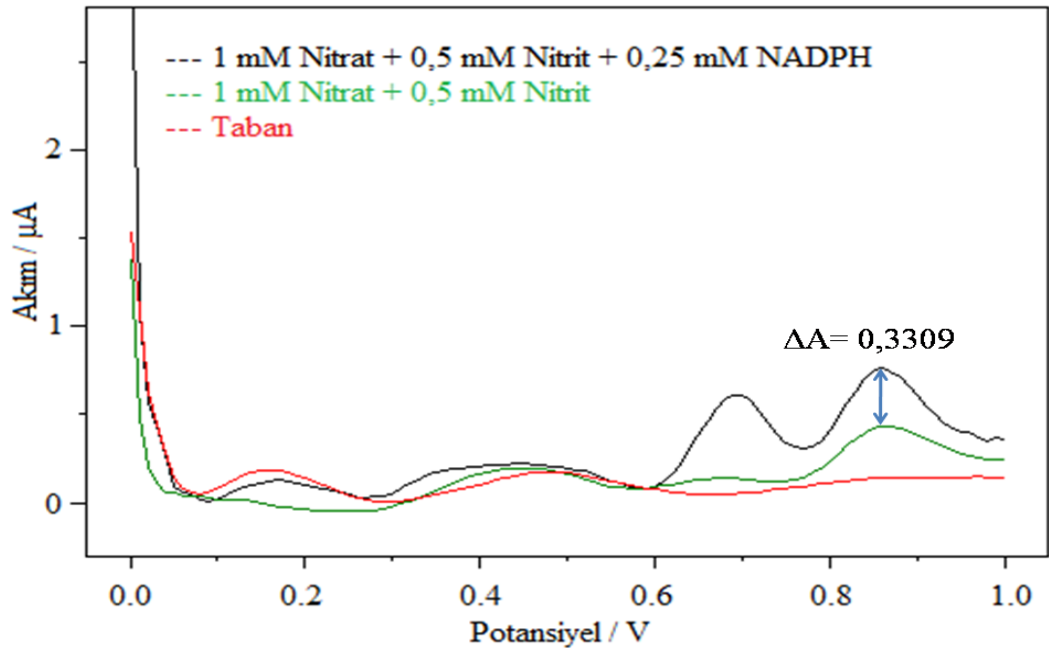
Şekil 4.118. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı [0,5 U NR; 2 μ L PU-L-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV].

4.12.2. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrat tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

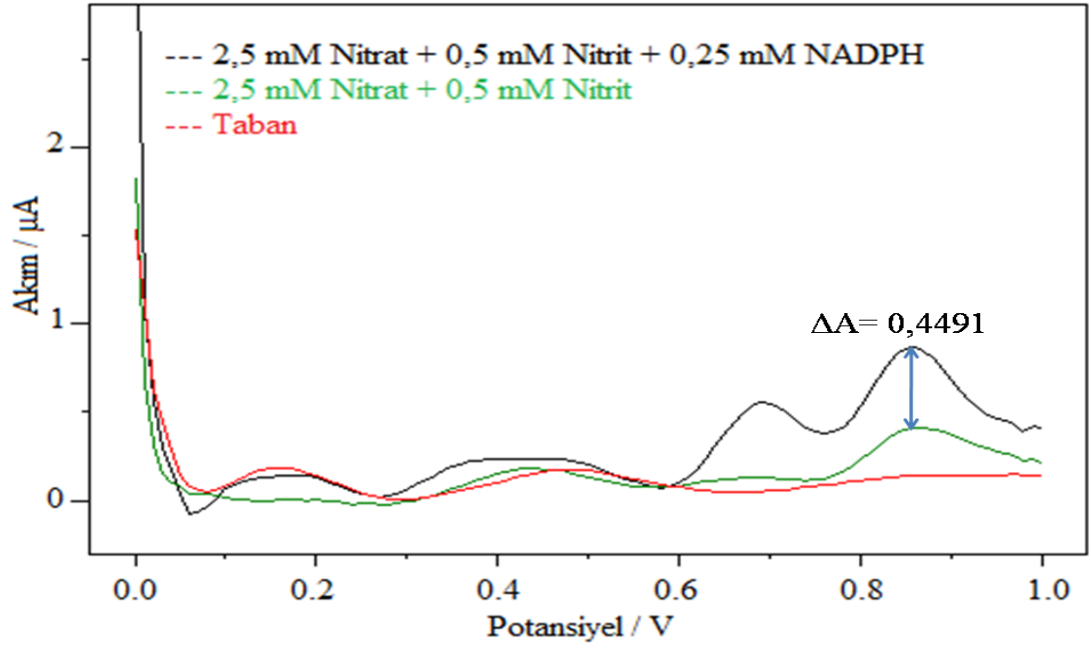
Nitrat için doğrusal tayin aralığının belirlenmesine yönelik optimize edilen koşullarda PU-L-%1 polimeri ile hazırlanmış biyosensör ile 0,5 mM – 15 mM arasında değişen nitrat derişimleri için ölçümler gerçekleştirildi. Her bir nitrat derişimi için elde edilen ölçüm sonuçları Şekil 4.119 ve Şekil 4.126 aralığında verilen grafiklerde verilmiştir. Bu grafikler üzerinde nitrat ölçümleri için akımda meydana gelen artış değerleri gösterilmiştir. Nitrat derişimlerine karşılık elde edilen akımdaki bu derişimler grafiğe geçirildiğinde 1 mM – 10 mM arasındaki nitrat ölçümleri için doğrusal standart grafiği elde edilmiştir. Bu grafik Şekil 4.127’de verilmiştir ve elde edilen standart grafiğinin R^2 değeri 0,9980 olarak bulunmuştur.



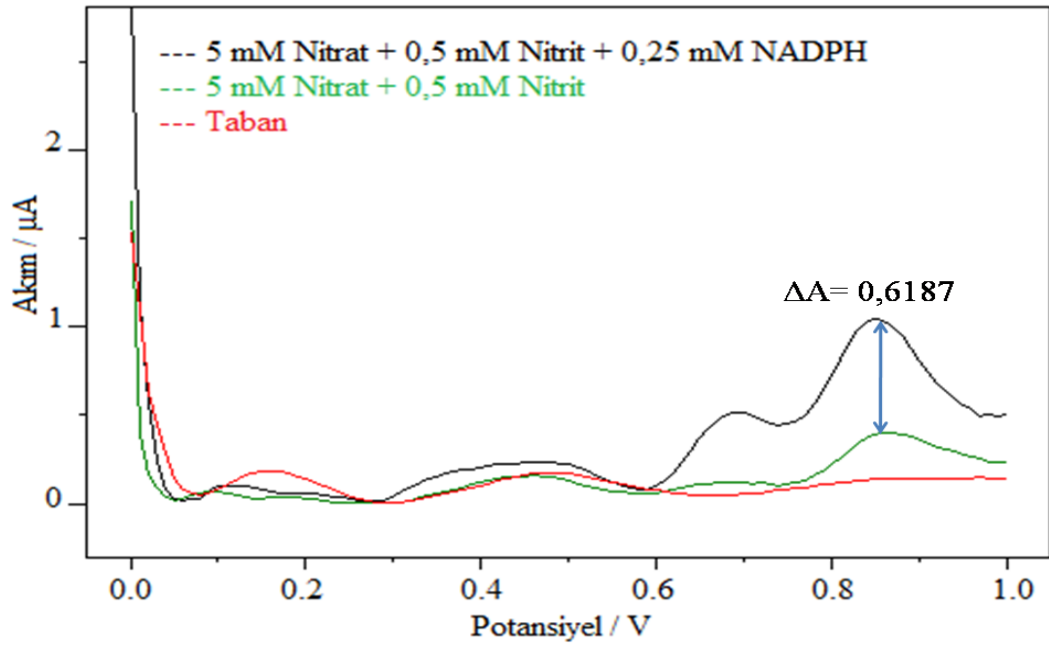
Şekil 4.119. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 0,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 μ L PU-L-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C].



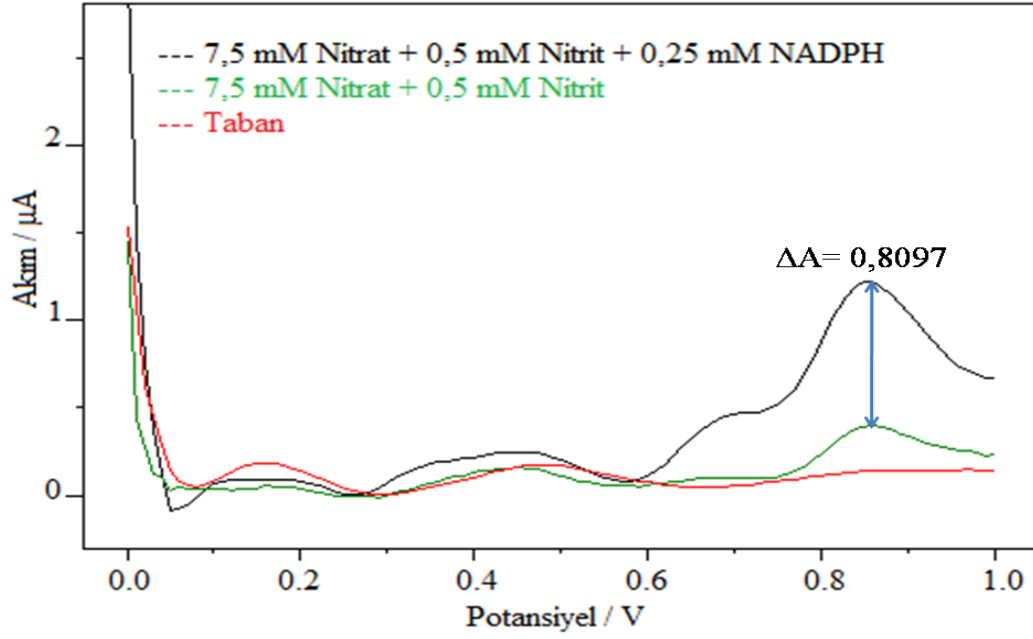
Şekil 4.120. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 1 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 μ L PU-L-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C].



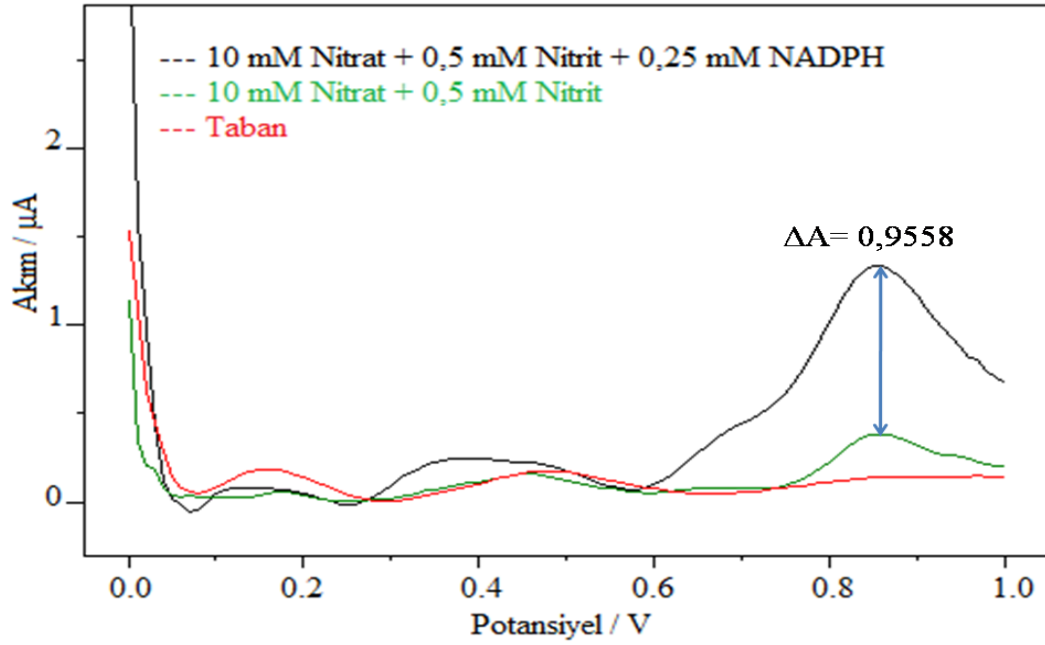
Şekil 4.121. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 2,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 μL PU-L-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C].



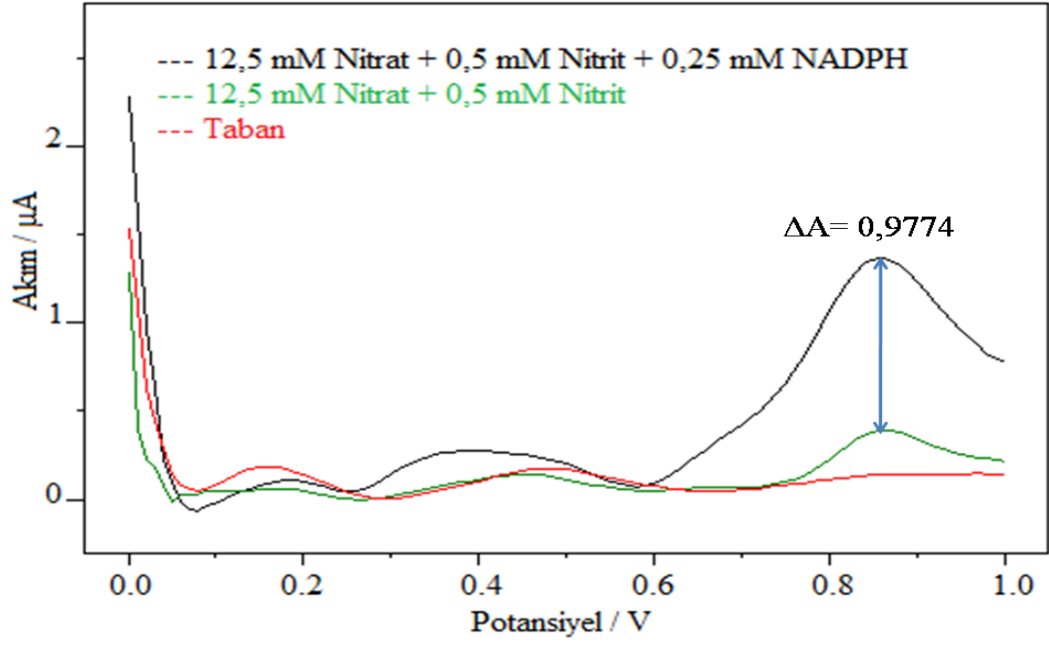
Şekil 4.122. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 μL PU-L-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C].



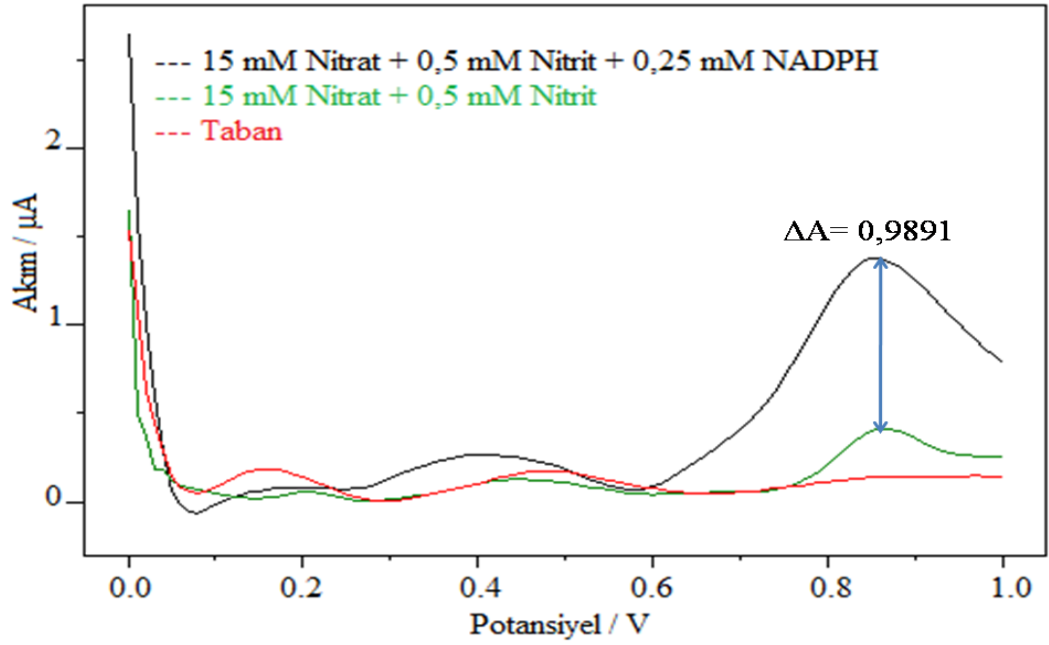
Şekil 4.123. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 7,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-L-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



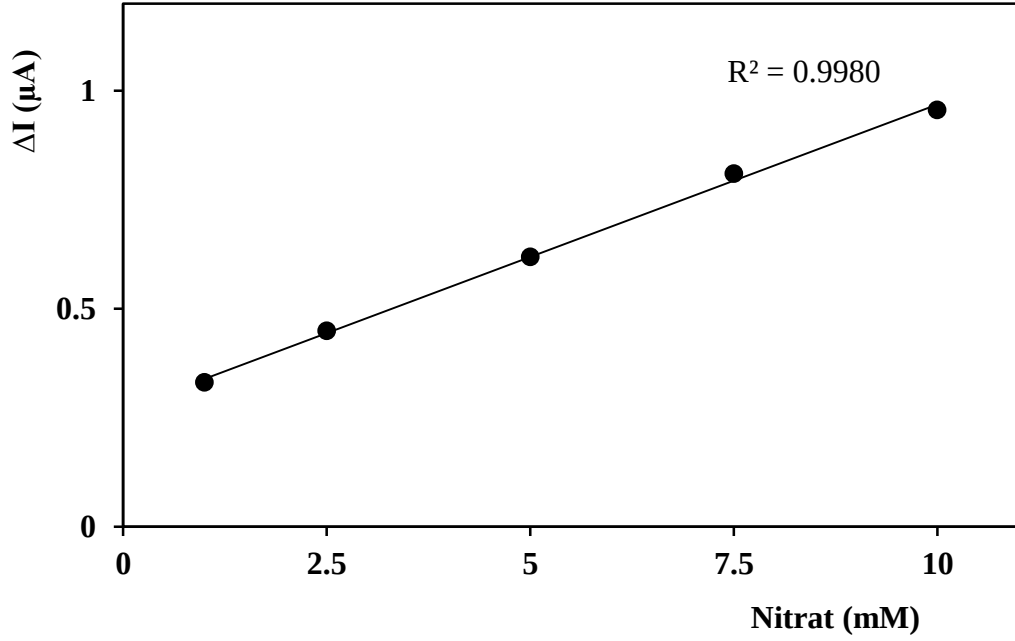
Şekil 4.124. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 10 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-L-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



Şekil 4.125. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 12,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-L-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



Şekil 4.126. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 15 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-L-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



Şekil 4.127. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrat tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı [0,5 U NR; 2 μ L PU-L-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; 0,87 V; DPV].

4.12.3. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit ve nitrat ölçümü için tekrarlanabilirlik

Hazırlanan biyosensör ile nitrit ve nitrat ölçümünde tekrarlanabilir sonuçlar alınıp alınmadığı incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda hazırlanan biyosensörlerle hem 25 mM’lık nitrit hem de 5 mM’lık nitrat derişimleri için ölçümler alınmıştır. Bu ölçümler 10’ar kez tekrarlanmış ve bu ölçümler sonucunda elde edilen akım farklarına karşılık gelen nitrit ve nitrat derişimleri ilgili standart grafiklerinden okunmuştur. Yapılan çalışmadan elde edilen veriler ışığında ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. 25 mM’lık nitrit ölçümleri için elde edilen ölçüm sonuçları, ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri Tablo 4.11’de ve 5 mM’lık nitrat ölçümleri için elde edilen ölçüm sonuçları, ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri ise Tablo 4.12’de verilmiştir.

Ölçüm No	ΔI (μA)	Nitrit (mM)
1	10,245	27,309
2	10,242	27,300
3	10,198	27,179
4	10,125	26,978
5	9,987	26,598
6	9,865	26,262
7	9,741	25,920
8	9,548	25,388
9	9,354	24,854
10	9,328	24,782
Ortalama Değer (mM)		26,257
Standart Sapma (mM)		0,983
Varyasyon Katsayısı (%VK)		3,743

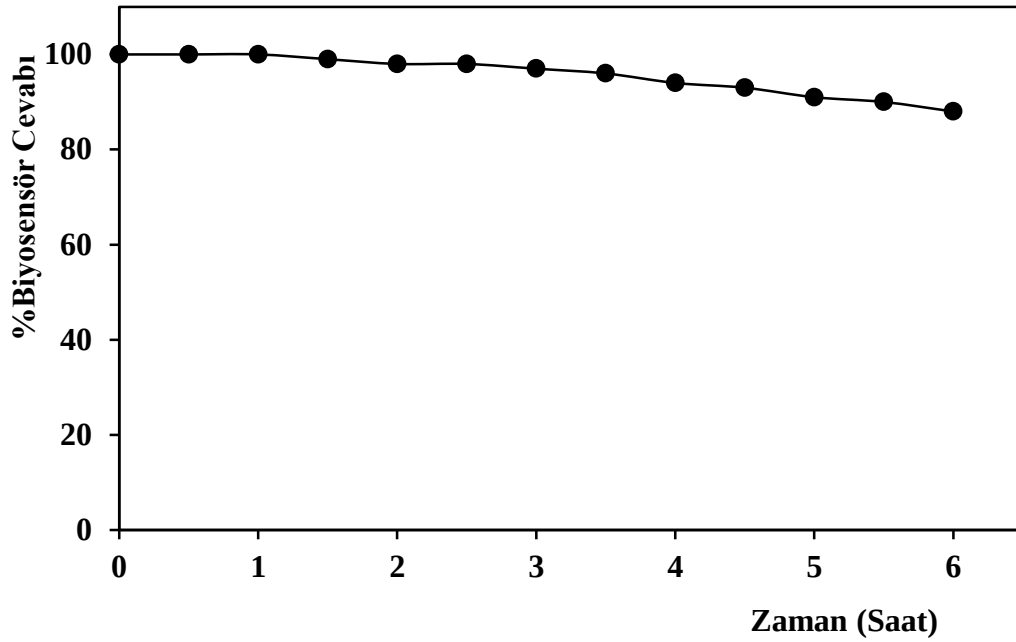
Tablo 4.11. PU-L-%1 polimeriyle hazırlanan biyosensörle 25 mM’lık nitrit ölçümleri için tekrarlanabilirlik sonuçları [0,5 U NR; 2 μ L PU-L-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 $\pm$ 2 °C; +0,87 V; DPV].

Ölçüm No	ΔI (μA)	Nitrat (mM)
1	0,6396	4,980
2	0,6395	4,978
3	0,6361	4,929
4	0,6308	4,852
5	0,6298	4,838
6	0,6298	4,838
7	0,6279	4,810
8	0,6247	4,764
9	0,6214	4,716
10	0,6187	4,677
Ortalama Değer (mM)		4,838
Standart Sapma (mM)		0,103
Varyasyon Katsayısı (%VK)		2,128

Tablo 4.12. PU-L-%1 polimeriyle hazırlanan biyosensörle 5 mM’lık nitrat ölçümleri için tekrarlanabilirlik sonuçları [0,5 U NR; 2 μ L PU-L-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 $\pm$ 2 °C; +0,87 V; DPV].

4.12.4. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün operasyonel kararlılığı

0,5 U NR enzimi içeren ve PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla optimize edilen ölçüm şartlarında 5 mM'lık nitrat derişimleri için 6 saat süresince 30 dakikada bir ölçümler alındı. Ölçüm sonuçları Şekil 4.128'de ki grafikte verilmiştir.



Şekil 4.128. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün operasyonel kararlılığı [0,5 U NR; 2 µL PU-L-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C; +0,87 V; DPV].

4.12.5. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün girişim etkilerinin incelenmesi

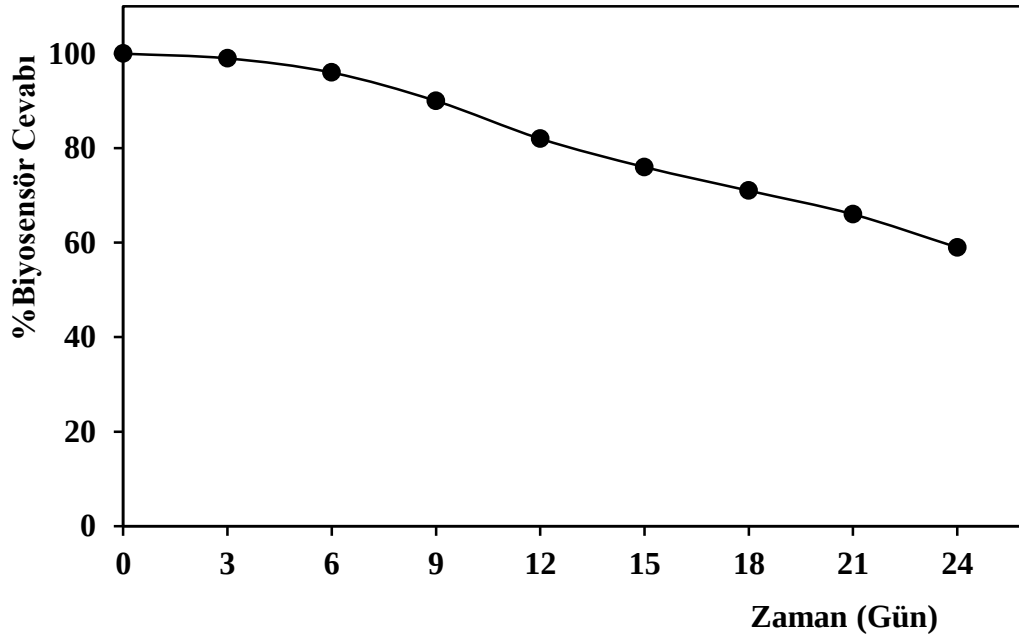
PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün girişim etkilerinin incelenmesi amacıyla ortamda 1 mM olacak şekilde fruktoz, maltoz, sükroz, laktoz, glukoz, askorbik asit, oksalik asit ve üre çözeltileri varken 25 mM nitrit ve 5 mM nitrat derişimleri için ölçümler gerçekleştirilmiştir. Girişim türlerine bağlı olarak biyosensör cevabında meydana gelen değişimler Tablo 4.13'de verilmiştir.

Substrat	%Aktivite	Substrat	%Aktivite
Nitrit	100	Nitrat	100
Nitrit + Fruktoz	91	Nitrat + Fruktoz	86
Nitrit + Maltoz	93	Nitrat + Maltoz	87
Nitrit + Sükroz	93	Nitrat + Sükroz	88
Nitrit + Laktoz	90	Nitrat + Laktoz	87
Nitrit + Glukoz	91	Nitrat + Glukoz	88
Nitrit + Askorbik Asit	95	Nitrat + Askorbik Asit	93
Nitrit + Oksalik Asit	97	Nitrat + Oksalik Asit	94
Nitrit + Üre	94	Nitrat + Üre	92

Tablo 4.13. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün girişim etkilerinin incelenmesi [0,5 U NR; 2 µL PU-L-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C; +0,87 V; DPV].

4.12.6. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün depo kararlılığı

Depolama süresine bağlı olarak PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün aktivitesinde meydana gelen değişimler incelenmiştir. Bu biyosensörün depo kararlılığının belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan biyosensör ile başlangıç anında ve üç günlük periyotlar sonunda 5 mM nitrat derişimleri için ölçümler alınmıştır. Biyosensörün nitrat standardına verdiği cevaplar 24 gün süre ile izlenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.129’da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde depolama şartlarına bağlı olarak biyosensör cevabında 9 gün sonunda % 10’luk, 24 gün sonunda ise % 41’lik bir düşüş görülmüştür.



Şekil 4.129. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün depo kararlılığı [0,5 U NR; 2 μ L PU-L-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV].

4.13. PU-L-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörle Örnek Uygulamaları

Ticari örneklerde ve atık su örneklerinde PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün örnek uygulanabilirliğini izlemek amacıyla nitrit ve nitrat analizine yönelik ölçümler alınmıştır. Ticari örnek olarak salam, sosis ve sucuk, su örneği olarak farklı fabrikalardan alınmış 3 adet atık su örneği kullanılmıştır. Bu örneklerde hazırlanan stoklar öncelikle referans yöntem olan nitrit ve nitrat ölçüm kitleriyle okunmuş ve mg/L olarak verilen sonuçlar mM'a çevrilmiştir.

Ticari örnekler ve atık su örnekleri hazırlanan biyosensör ile okunmuş ve ilgili standart grafiklerinden örneklerdeki nitrit ve nitrat miktarları hesaplanmıştır. Biyosensör ile yapılan bu ölçümlerde örneklerdeki nitrit ve nitrat düzeyi düşük olduğu için standart katma yöntemi kullanılmıştır. Daha sonra bu ölçüm sonuçları birbiri ile kıyaslanmıştır.

Örneklerde biyosensör ile gerçekleştirilen nitrit ölçüm sonuçları Tablo 4.14'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde ticari örnekler olan sucuk, salam ve sosis için gerçekleştirilen ölçüm sonuçları referans yöntem olan kit ölçümü ile

karşılaştırıldığında alınan yanıtlarda % 15'in üzerinde düşüşler meydana gelmiştir. Atık su örneklerinde gerçekleştirilen nitrit ölçümünde ise yanıtlarda ki düşüş oranının daha az olduğu görülmüştür.

Ticari örnekler ve atık su örneklerinde PU-L-%1 polimeri kullanılarak hazırlanan biyosensör ile gerçekleştirilen nitrat ölçüm sonuçları Tablo 4.15'de verilmiştir. Ticari örnekler için, biyosensör ile gerçekleştirilen nitrat ölçüm sonuçları, aynı örneklerdeki nitrit ölçüm sonuçları ile karşılaştırıldığında biyosensör yanıtlarında meydana gelen düşüş oranı artmıştır. Nitrat ölçüm sonuçları referans yöntem olan kit ölçümü ile karşılaştırıldığında ise alınan biyosensör yanıtlarında % 25'in üzerinde düşüşler meydana geldiği görülmektedir. Bir numaralı atık su örneği ile gerçekleştirilen nitrat ölçümünde ise biyosensör yanıtında % 41'lik bir düşüş gözlenmiştir. 2 ve 3 numaralı atık su örneklerinden alınan biyosensör yanıtlarında ise % 8 civarında bir düşüş olduğu görülmüştür.

Örnek	Nitrit		
	Kit Değeri (mM)	Biyosensör Değeri (mM) ± S.S.*	%Yanıt
Sucuk	1,3614	1,1353 ± 0,0407	83
Salam	1,4872	1,2610 ± 0,0361	85
Sosis	1,6398	1,3986 ± 0,0319	85
Atık su 1	0,7761	0,7193 ± 0,0224	93
Atık su 2	0,5609	0,5426 ± 0,0141	97
Atık su 3	2,0136	1,9605 ± 0,0488	97

* Ölçüm sonuçları ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n=3).

Tablo 4.14. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle örneklerde nitrit ölçümü [0,5 U NR; 2 µL PU-L-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C; +0,87 V; DPV].

Örnek	Nitrat		
	Kit Değeri (mM)	Biyosensör Değeri (mM) ± S.S.*	%Yanıt
Sucuk	2,1067	1,5638 ± 0,0162	74
Salam	0,9419	0,7292 ± 0,0049	77
Sosis	0,7032	0,5323 ± 0,0051	76
Atık su 1	0,8475	0,5009 ± 0,0104	59
Atık su 2	2,3258	2,1327 ± 0,0196	92
Atık su 3	2,5387	2,3714 ± 0,0173	93

* Ölçüm sonuçları ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n=3).

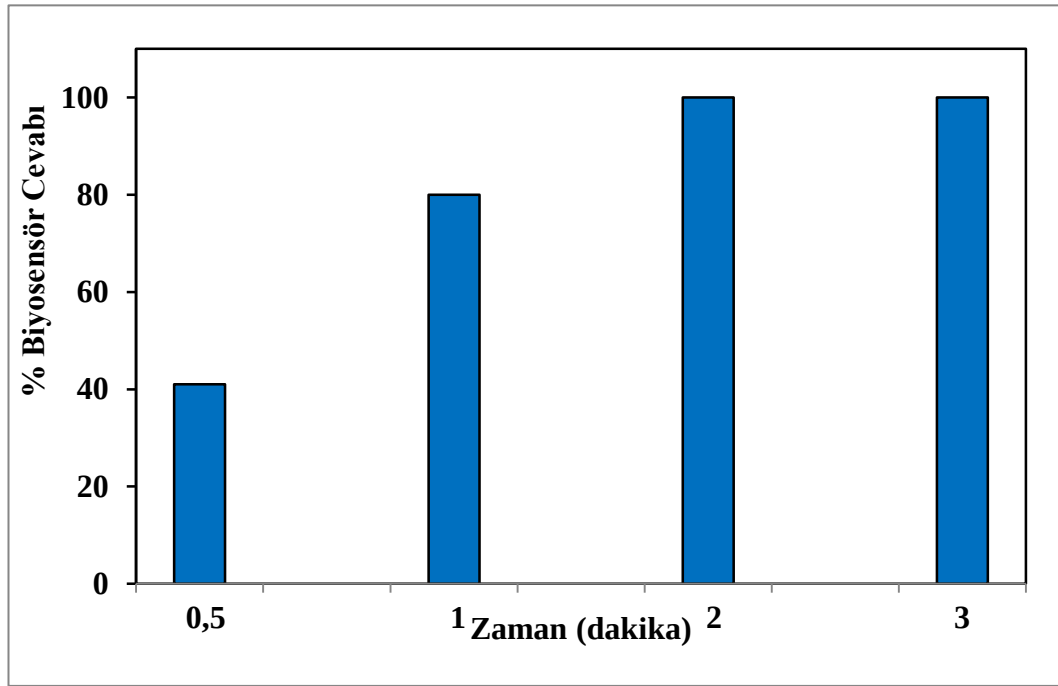
Tablo 4.15. PU-L-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle örneklerde nitrat ölçümü [0,5 U NR; 2 µL PU-L-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C; +0,87 V; DPV].

4.14. PU-X-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörün Optimizasyon Çalışmaları

Biyosensörünün optimizasyon çalışmalarında çeşitli parametrelerin biyosensör cevabına olan etkisi incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda hazırlama koşullarının ve çalışma koşullarının optimizasyonuna yönelik olarak yanıt süresinin, enzim miktarının, koenzim miktarının, pH ve sıcaklığın biyosensör cevabına etkisi araştırılmıştır.

4.14.1. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün nitrat ölçümü için yanıt süresinin belirlenmesi

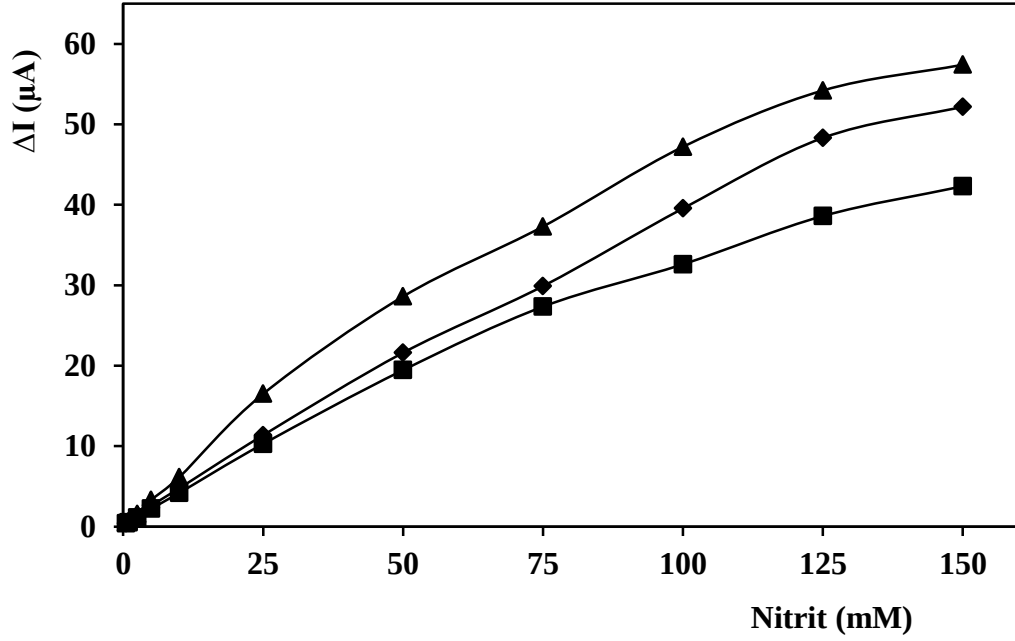
PU-X-%1 biyosensörü ile gerçekleştirilecek olan nitrat ölçümü için biyosensörün maksimum yanıt verdiği sürenin belirlenmesi amacıyla farklı sürelerde 5 mM'lık nitrat derişimleri için ölçümler alınmıştır. Farklı sürelerde elde edilen ölçüm sonuçları Şekil 4.130'da verilmiştir. Biyosensörle farklı zamanlarda gerçekleştirilen ölçümler incelendiğinde 0,5. dakikada biyosensörle % 41'lik bir yanıt alındığı gözlenmiştir. Biyosensörle 1. dakikada alınan nitrat yanıtı ise % 80'dir. Yapılan ölçümler sonucunda en yüksek biyosensör cevabının 2. ve 3. dakikalarda alındığı görülmüştür.



Şekil 4.130. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün nitrat ölçümü için yanıt süresinin belirlenmesi [0,5 U NR; 2 μ L PU-X-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV].

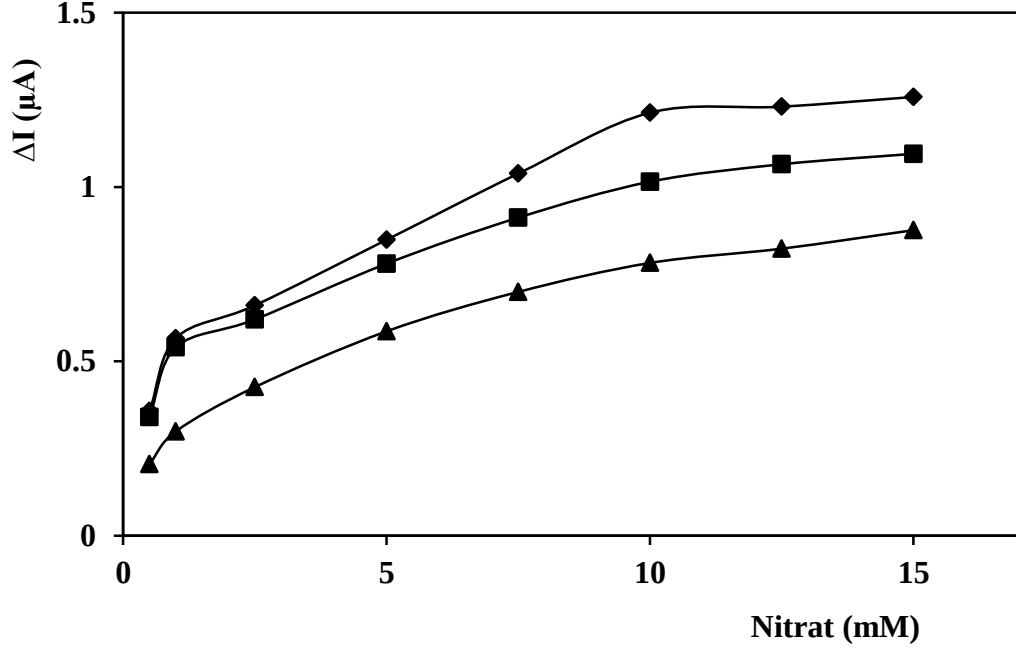
4.14.2. Enzim miktarının PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi

Biyoaktif tabakada bulunan enzim miktarının biyosensör yanıtlarını nasıl etkilediğinin belirlenmesi amacıyla polimer miktarı ve ölçüm şartları sabit tutularak farklı miktarlarda enzim içeren biyosensörlerle nitrit ve nitrat ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada farklı derişimler için nitrit ve nitrat ölçümleri yapıp, akımdaki değışimlere karşılık grafiğē geçirilmiştir. 3 farklı NR enzim miktarı (0,25 U; 0,5 U ve 1 U) ile hazırlanan biyosensörlerle 0,5 mM – 150 mM arasında gerçekleştirilen nitrit ölçümleri Şekil 4.131’de görölmektedir. Grafik incelendiğinde nitrit serisi için en yüksek yanıtın biyoaktif tabakasında 0,25 U NR enzimi bulunan biyosensör ile alındığı görölmektedir. 0,5 U ve 1 U NR enzimiyle hazırlanan biyosensörler için alınan nitrit yanıtlarına bakıldığında yanıtlarda düşüşler gözlenmiştir.



Şekil 4.131. Nitrit ölçümü için enzim miktarının PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi [2 μ L PU-X-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV; $\blacktriangle$ 0,25 U; $\blacklozenge$ 0,5 U; $\blacksquare$ 1 U].

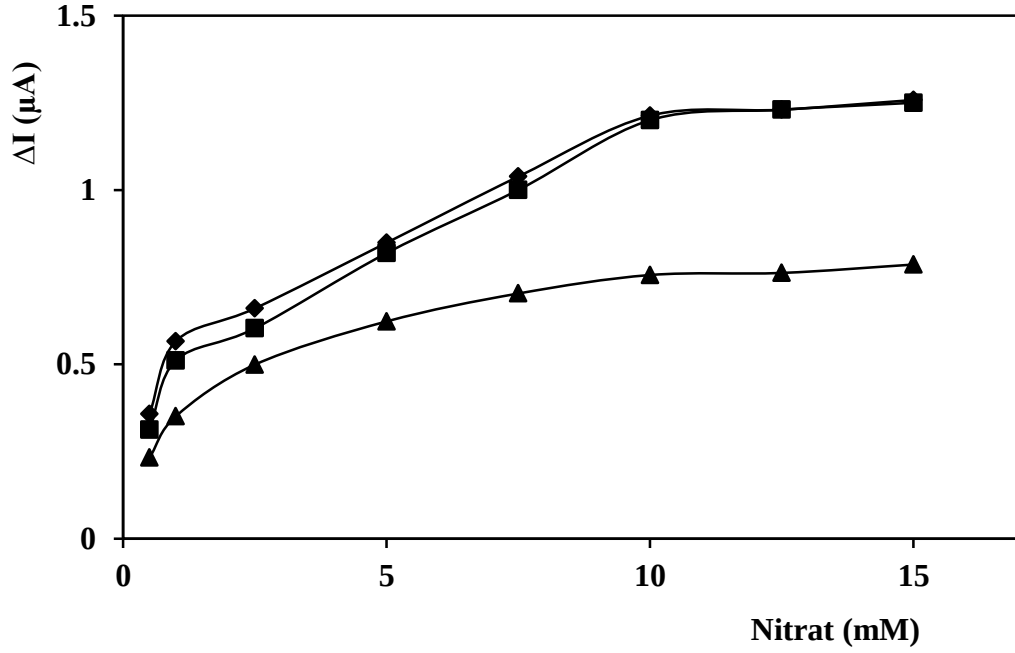
NR enzim miktarı 0,25 U; 0,5 U ve 1 U olacak şekilde hazırlanan PU-X-%1 temelli biyosensörlerle gerçekleştirilen nitrat ölçümleri Şekil 4.132’de görülmektedir. Sonuçlar incelendiğinde nitrat serisiyle yapılan ölçümlerde en düşük biyosensör yanıtlarının biyoaktif tabakasında 0,25 U NR enzimi içeren biyosensörle elde edildiği görülmüştür. Grafik incelendiğinde en yüksek yanıtların 0,5 U NR enzimi içeren biyosensörle alındığı görülmektedir. Fakat enzim miktarı iki katına çıkarılarak (1 U) hazırlanan biyosensör ile gerçekleştirilen ölçümlerde biyosensör yanıtlarında bir düşüş gözlenmiştir.



Şekil 4.132. Nitrat ölçümü için enzim miktarının PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi [2 μ L PU-X-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV; $\blacktriangle$ 0,25 U; $\blacklozenge$ 0,5 U; $\blacksquare$ 1 U].

4.14.3. Koenzim miktarının PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi

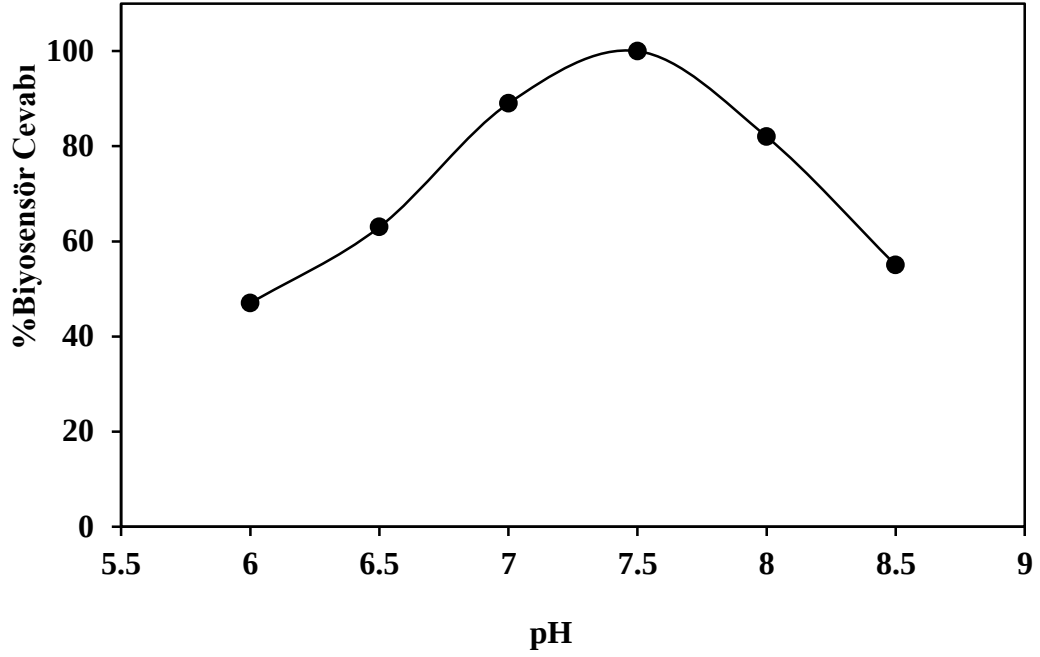
Biyoaktif tabakayı oluşturan bileşenlerden biri olan enzim miktarının optimizasyonundan sonra, NR enziminin aktivite gösterebilmesi için ihtiyaç duyduğu ve koenzimi olan NADPH miktarının optimizasyonuna geçildi. Bu amaç doğrultusunda PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan ve 0,5 U NR enzimi içeren biyosensör ile 0,125 mM; 0,25 mM ve 0,5 mM NADPH varlığında nitrat serisi için ölçümler gerçekleştirilmiş ve ölçüm sonuçları Şekil 4.133’de verilmiştir. Ölçüm sonuçları incelendiğinde en düşük biyosensör yanıtlarının 0,125 mM koenzim varlığında alındığı görülmektedir. Yapılan ölçümlerde nitrat serisi için en yüksek biyosensör cevapları 0,25 mM NADPH ile yapılan çalışmada alınmıştır. Koenzim derişimi 0,5 mM olacak şekilde yapılan nitrat ölçümlerinden elde edilen sonuçların, 0,25 mM koenzim ile yapılan ölçümlere göre azda olsa bir düşüş gösterdiği görülmüştür.



Şekil 4.133. Nitrat ölçümü için koenzim (NADPH) miktarının PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi [0,5 U NR; 2 μ L PU-X-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV; $\blacktriangle$ 0,125 mM; $\blacklozenge$ 0,25 mM; $\blacksquare$ 0,5 mM].

4.14.4. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum pH değerinin belirlenmesi

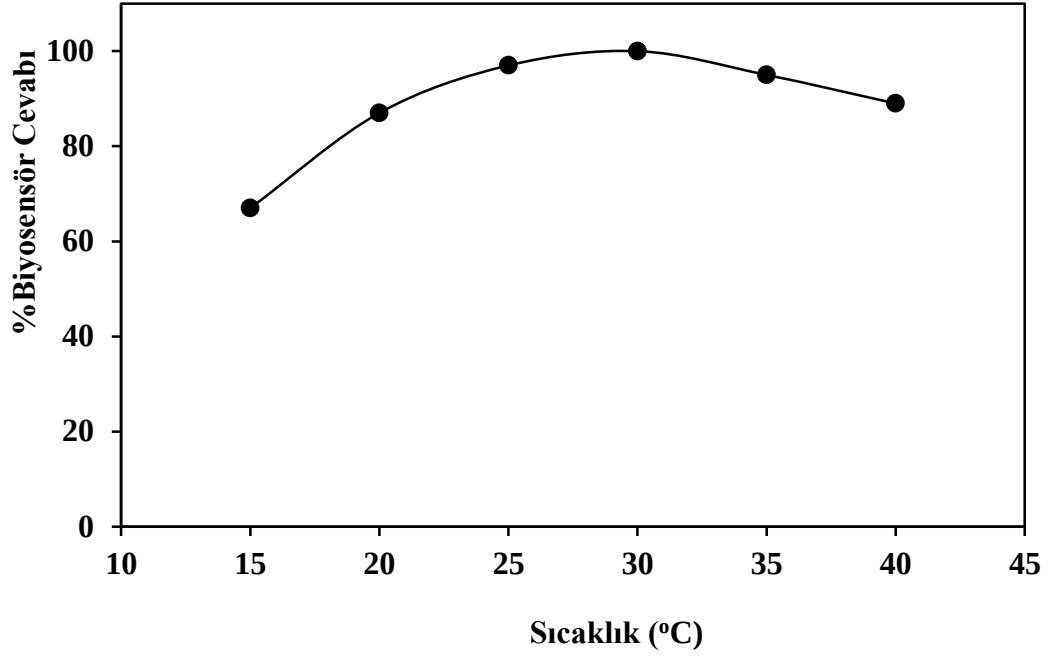
PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum pH' sını belirlemek amacıyla 6 – 8,5 arasında değişen pH'larda fosfat tamponu ile ölçümler gerçekleştirilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda pH ve % biyosensör cevabı arasında çizilen optimum pH grafiği Şekil 4.134'de verilmiştir. Grafik incelendiğinde NR enzimini optimum pH değeri 7,5 olarak görülmektedir. Denenen en düşük pH değeri olan pH 6'da enzim aktivitesinde % 53'lük en yüksek pH değeri olan pH 8,5'te ise % 45'lik bir düşüş gözlenmiştir.



Şekil 4.134. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum pH grafiği [0,5 U NR; 2 μ L PU-X-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 6 – 8,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV].

4.14.5. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum sıcaklığının belirlenmesi

PU-X-%1 polimeri temelli biyosensörün optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 15 °C ile 40 °C arasında değişen sıcaklıklarda nitrat ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler düşük sıcaklıktan başlayarak yüksek sıcaklığa doğru alınmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen sıcaklık ve % biyosensör cevabı arasında çizilen optimum sıcaklık grafiği Şekil 4.135’de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde en yüksek biyosensör cevabı 30 °C’ de alınmıştır. Fakat optimum sıcaklık grafiği incelendiğinde 25 °C ve 30 °C için alınan biyosensör yanıtlarının birbirine yakın olduğu ve aralarında % 3’lük bir fark bulunduğu gözlenmiştir.



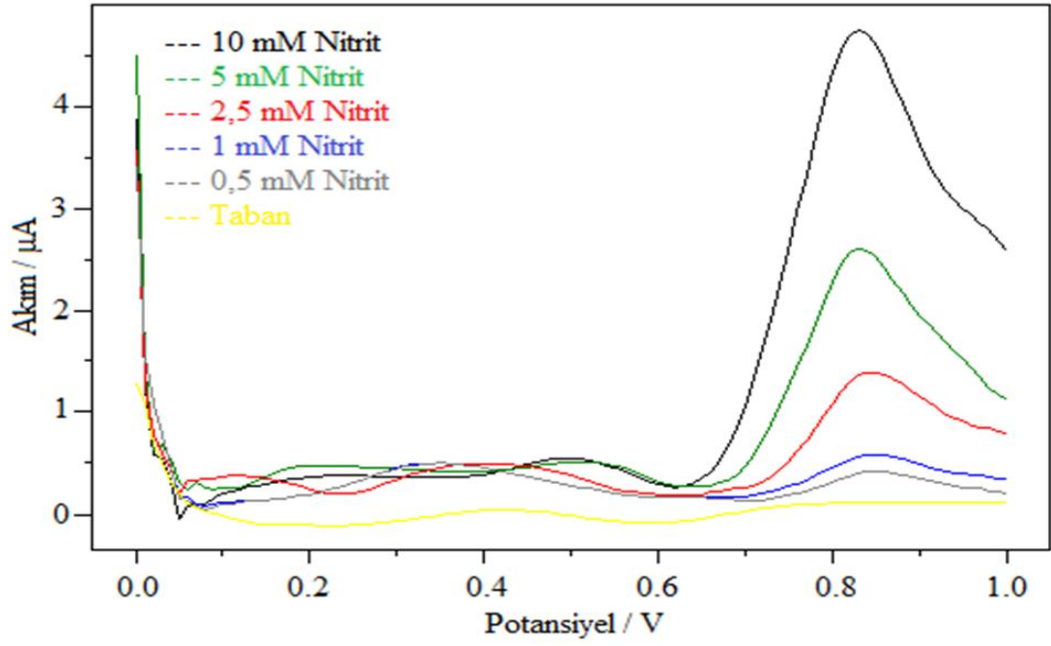
Şekil 4.135. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum sıcaklık grafiği [0,5 U NR; 2 μ L PU-X-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; +0,87 V; DPV].

4.15. PU-X-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları

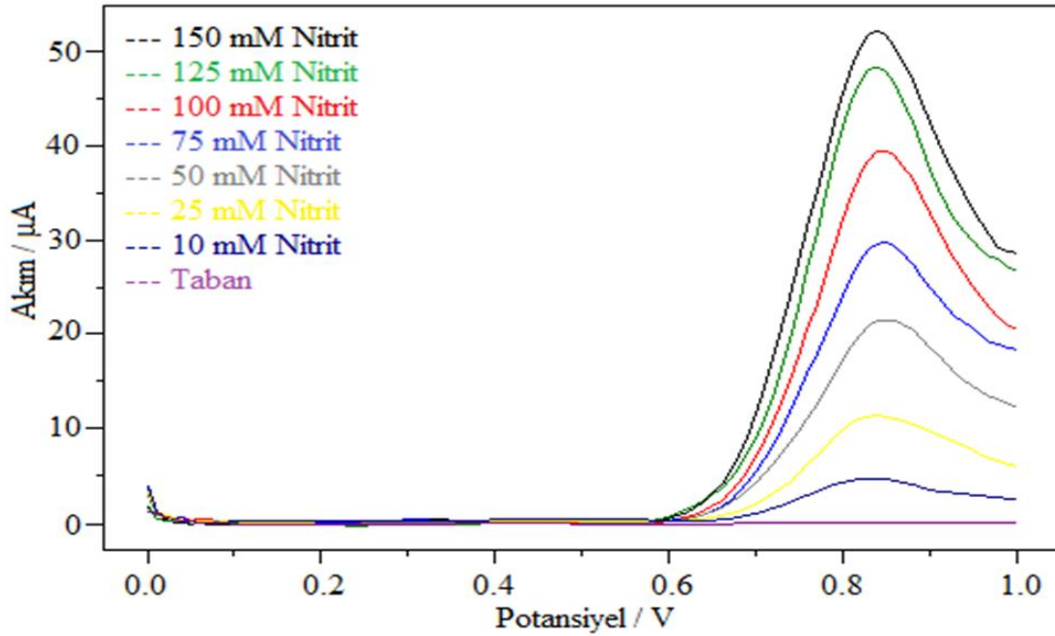
PU-X-%1 polimeri temelli biyosensörün hazırlama ve çalışma koşullarının optimizasyonundan sonra karakterizasyon çalışmalarına geçilmiştir.

4.15.1. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

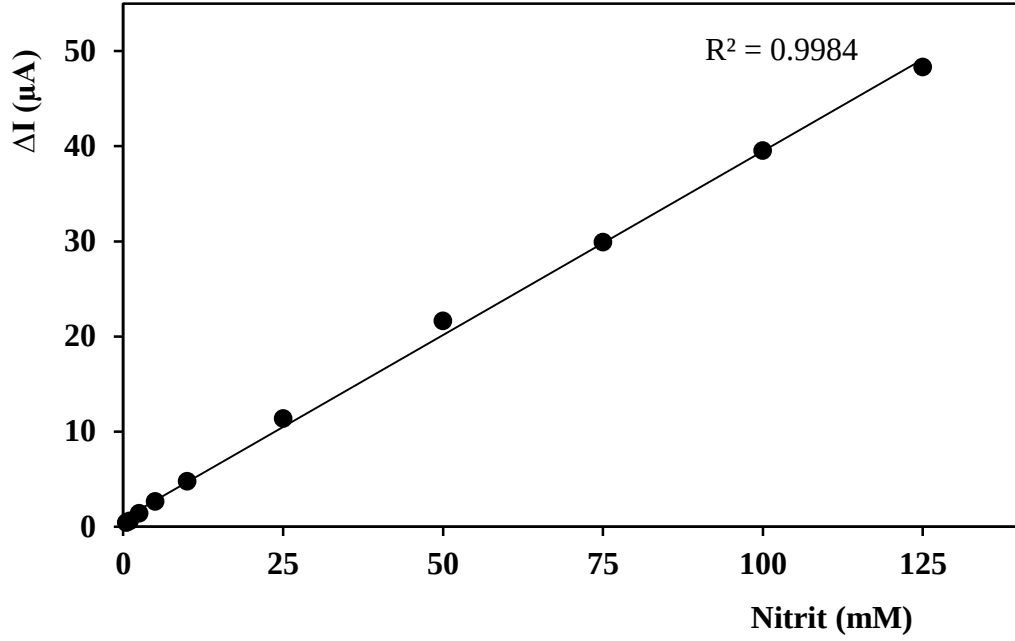
Optimize edilen koşullarda PU-X-%1 polimeri ile kaplanmış biyosensörün farklı nitrit derişimleri için verdiği yanıtlar incelenmiştir. Yapılan ölçümlerde 0,5 mM – 10 mM arasında değişen nitrit derişimleri için elde edilen biyosensör yanıtları Şekil 4.136’da, 10 mM – 150 mM arasında değişen nitrit derişimleri için elde edilen biyosensör yanıtları ise Şekil 4.137’de verilmiştir. Bu ölçümler sonucunda 0,5 mM – 125 mM arasında doğrusal yanıt veren nitrit derişimleri grafiğe geçirilmiş ve Şekil 4.138’deki standart grafiği oluşturulmuştur. Elde edilen standart grafiğinin R^2 değeri ise 0,9984 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.136. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 0,5 mM – 10 mM aralığındaki nitrit derişimleri için alınan DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-X-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



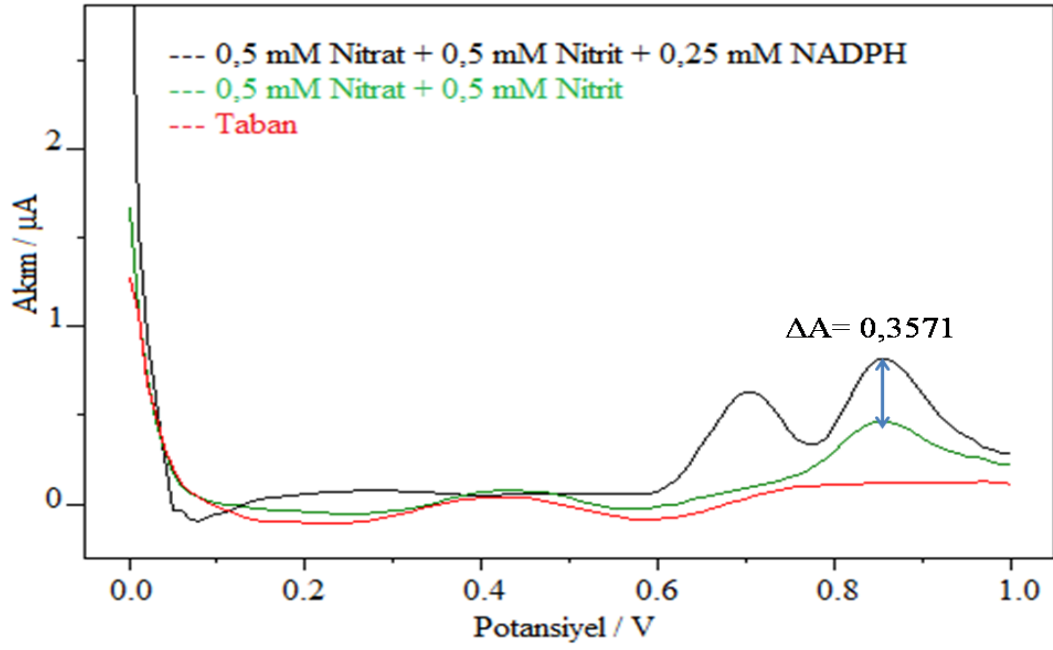
Şekil 4.137. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 10 mM – 150 mM aralığındaki nitrit derişimleri için alınan DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-X-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



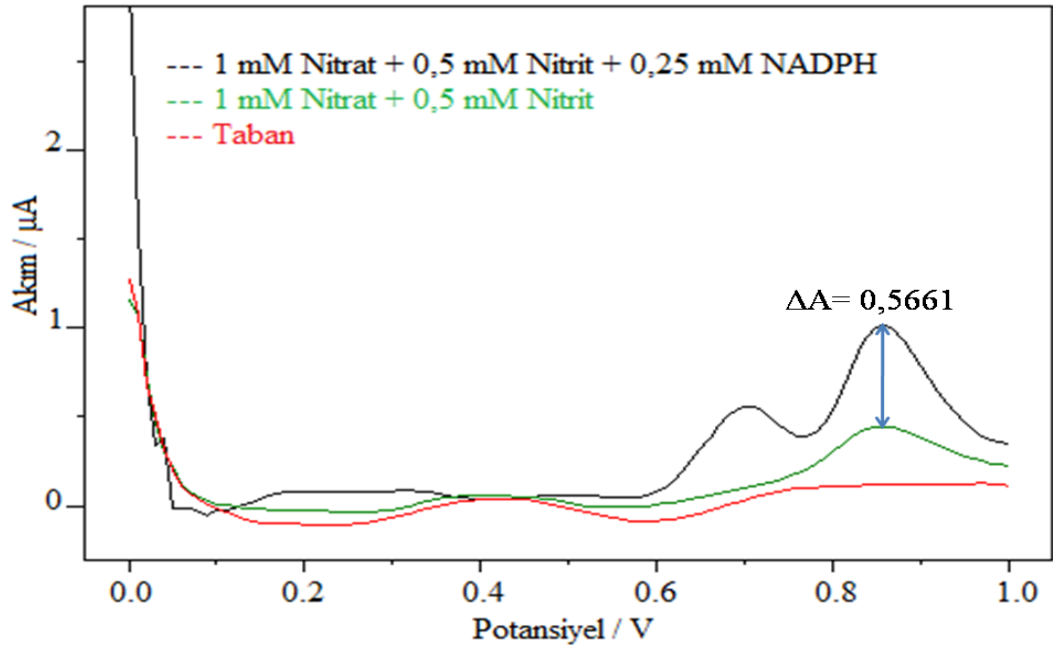
Şekil 4.138. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı [0,5 U NR; 2 μ L PU-X-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV].

4.15.2. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrat tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

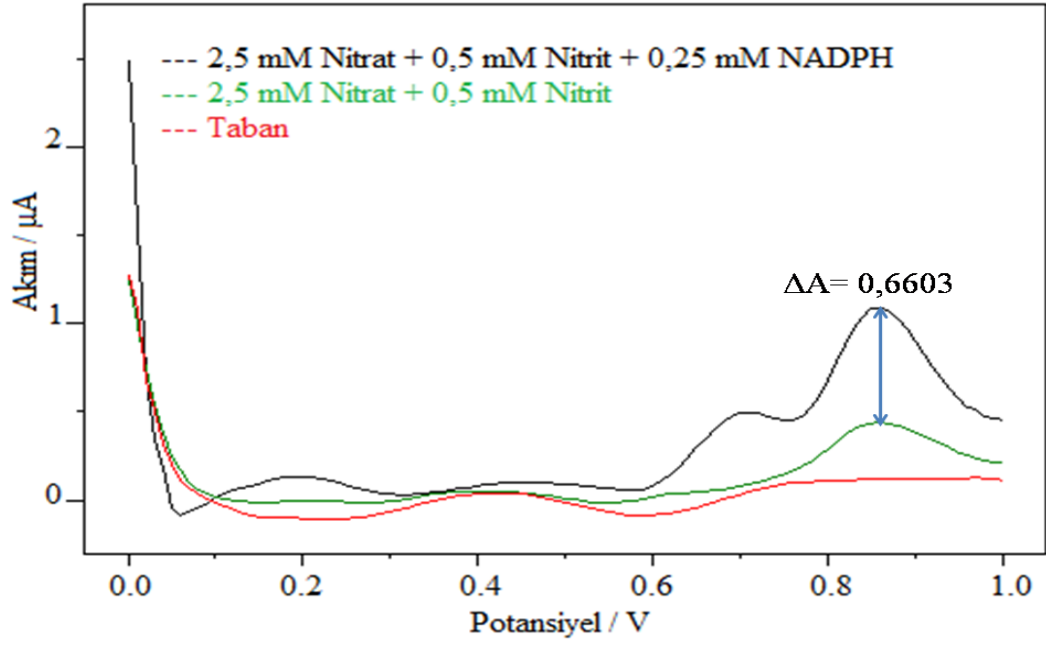
PU-X-%1 polimeri ile hazırlanmış biyosensörün doğrusal nitrat tayin aralığını belirlemek amacıyla, optimize edilen koşullarda 0,5 mM – 15 mM arasında değişen nitrat derişimleri için ölçümler gerçekleştirildi. Her bir nitrat derişimi için biyosensör tarafından elde edilen ölçüm sonuçları Şekil 4.139 ve Şekil 4.146 aralığında verilen şekillerde gösterilmiştir. Ölçülen her bir nitrat derişimi için akımda meydana gelen artışlar bu şekiller üzerinde gösterilmiştir. 1 mM – 10 mM derişim aralığındaki nitrat ölçümleri için elde edilen biyosensör yanıtları grafiğe geçirildiğinde Şekil 4.147’de ki standart grafiği elde edilmiştir. Bu standart grafiğinin R^2 değeri 0,9995 olarak bulunmuştur.



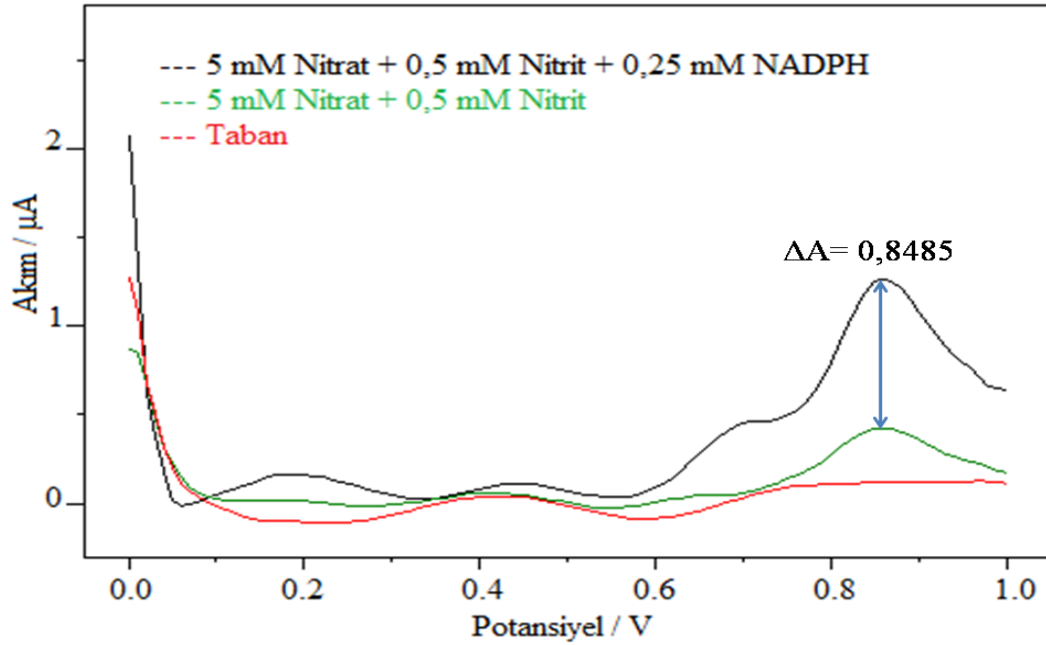
Şekil 4.139. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 0,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-X-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



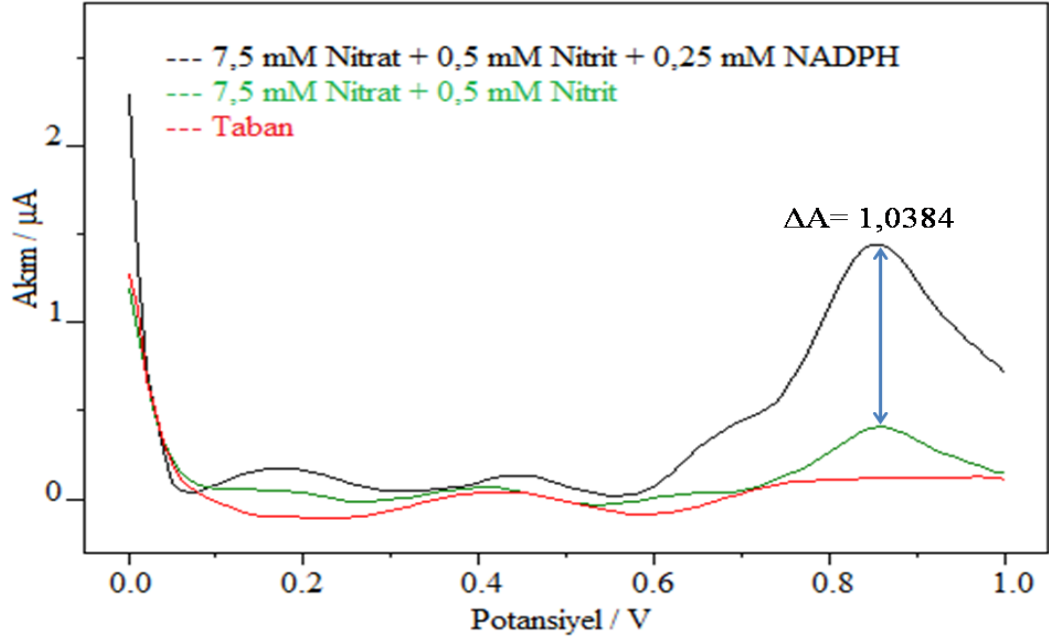
Şekil 4.140. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 1 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-X-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



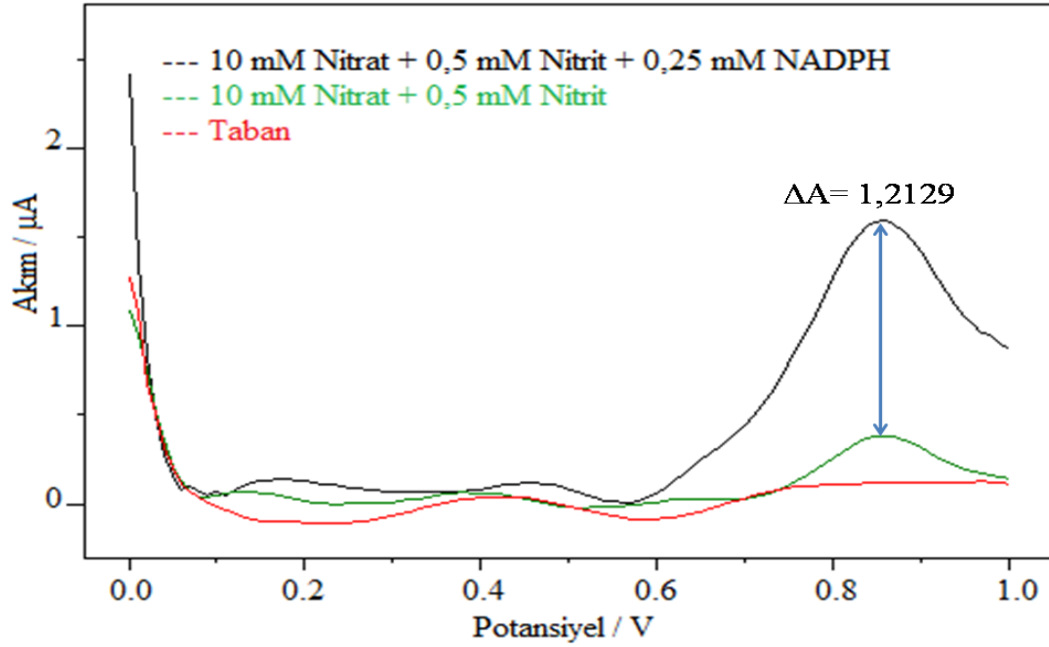
Şekil 4.141. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 2,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-X-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



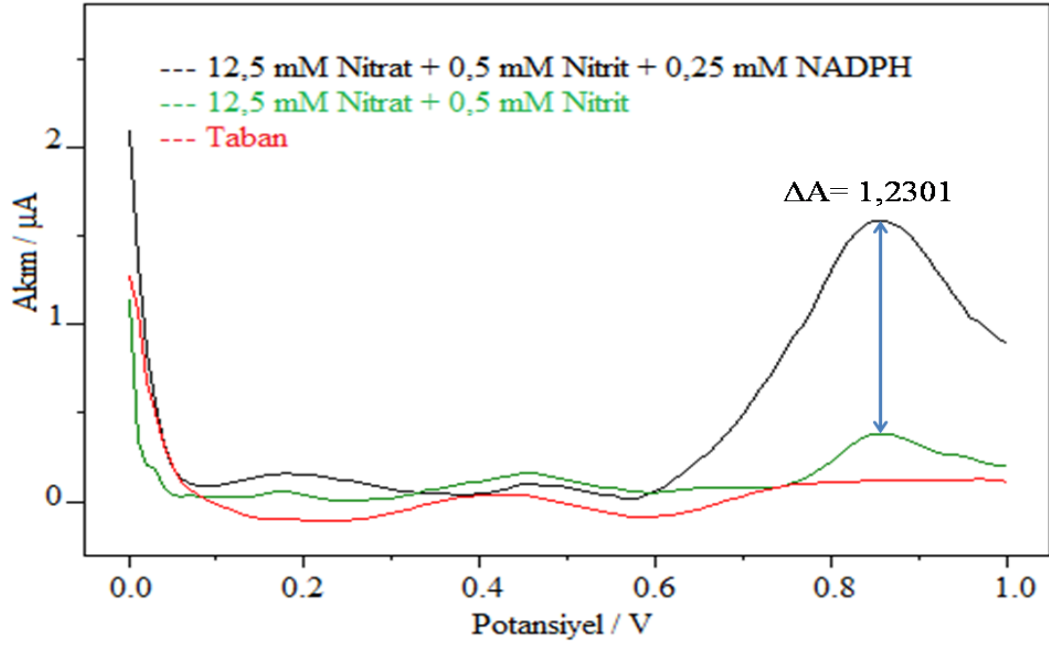
Şekil 4.142. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-X-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



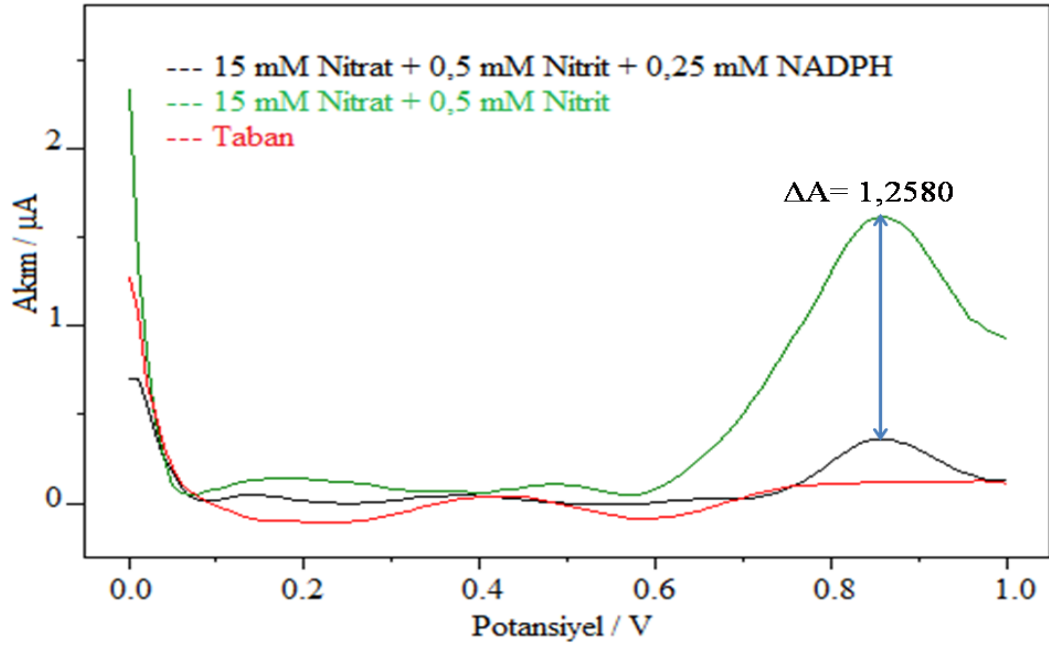
Şekil 4.143. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 7,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 μL PU-X-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C].



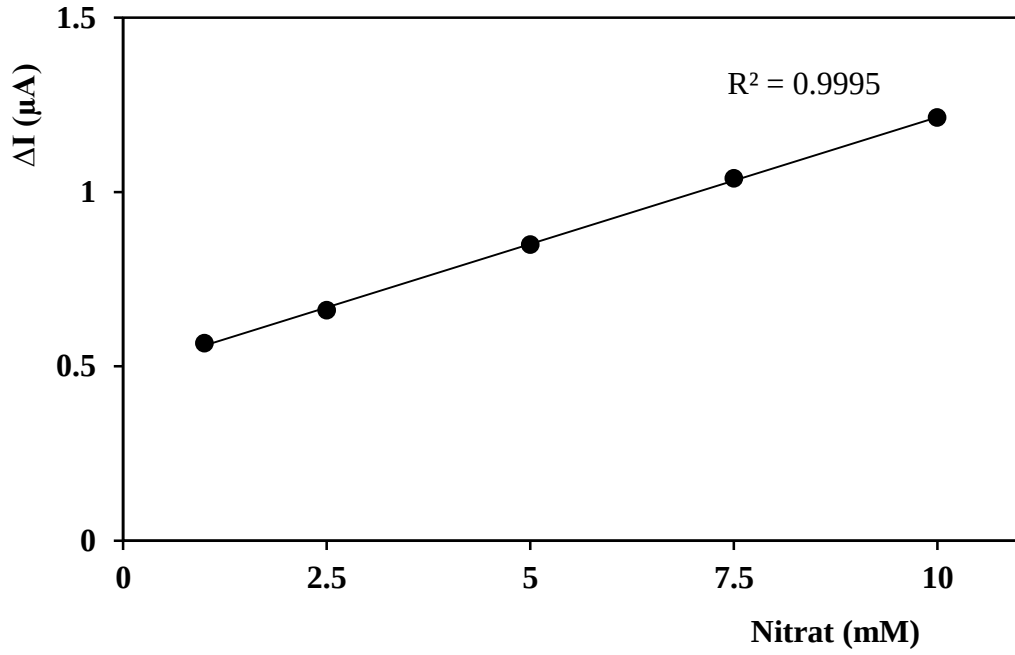
Şekil 4.144. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 10 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 μL PU-X-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C].



Şekil 4.145. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 12,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-X-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



Şekil 4.146. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 15 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-X-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



Şekil 4.147. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrat tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı [0,5 U NR; 2 μ L PU-X-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C; 0,87 V; DPV].

4.15.3. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit ve nitrat ölçümü için tekrarlanabilirlik

Bu bölümde PU-X-%1 temelli biyosensörün nitrit ve nitrat ölçümü için tekrarlanabilirliği incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda hazırlanan biyosensörlerle hem 25 mM'lık nitrit hem de 5 mM'lık nitrat derişimleri için ölçümler alınmıştır. Ölçümler 10 kez tekrarlanmış ve her bir ölçüm sonucu için elde edilen akım farkına karşılık gelen nitrit ve nitrat derişimleri ilgili standart grafiklerinden okunmuştur. Bu ölçümlerden elde edilen veriler ışığında ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. 25 mM'lık nitrit ölçümleri için elde edilen ölçüm sonuçları ile hesaplanan ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri Tablo 4.16'da, 5 mM'lık nitrat ölçümleri için elde edilen ölçüm sonuçları ile hesaplanan ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri ise Tablo 4.17'de verilmiştir.

Ölçüm No	ΔI (μA)	Nitrit (mM)
1	11,114	26,694
2	10,952	26,275
3	10,836	25,974
4	10,674	25,554
5	10,568	25,280
6	10,536	25,197
7	10,486	25,067
8	10,425	24,909
9	10,251	24,459
10	10,124	24,130
Ortalama Değer (mM)		25,354
Standart Sapma (mM)		0,794
Varyasyon Katsayısı (%VK)		3,133

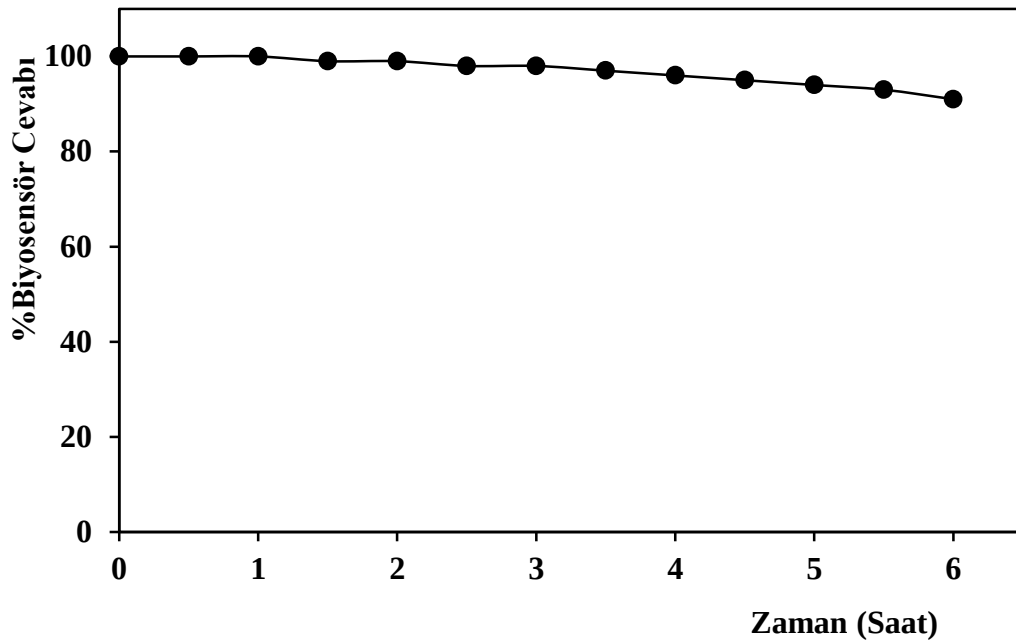
Tablo 4.16. PU-X-%1 polimeriyle hazırlanan biyosensörle 25 mM’lık nitrit ölçümleri için tekrarlanabilirlik sonuçları [0,5 U NR; 2 μL PU-X-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV].

Ölçüm No	ΔI (μA)	Nitrat (mM)
1	0,8672	5,294
2	0,8671	5,293
3	0,8638	5,247
4	0,8593	5,185
5	0,8582	5,169
6	0,8526	5,092
7	0,8492	5,044
8	0,8485	5,035
9	0,8466	5,008
10	0,8392	4,906
Ortalama Değer (mM)		5,127
Standart Sapma (mM)		0,131
Varyasyon Katsayısı (%VK)		2,559

Tablo 4.17. PU-X-%1 polimeriyle hazırlanan biyosensörle 5 mM’lık nitrat ölçümleri için tekrarlanabilirlik sonuçları [0,5 U NR; 2 μL PU-X-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV].

4.15.4. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün operasyonel kararlılığı

NR enzimi temelli biyosensörün operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla optimize edilen ölçüm şartlarında 5 mM'lık nitrat derişimleri için 6 saat süresince 30 dakikada bir ölçümler alındı. Ölçüm sonuçları Şekil 4.148'de ki grafikte verilmiştir.



Şekil 4.148. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün operasyonel kararlılığı [0,5 U NR; 2 µL PU-X-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C; +0,87 V; DPV].

4.15.5. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün girişim etkilerinin incelenmesi

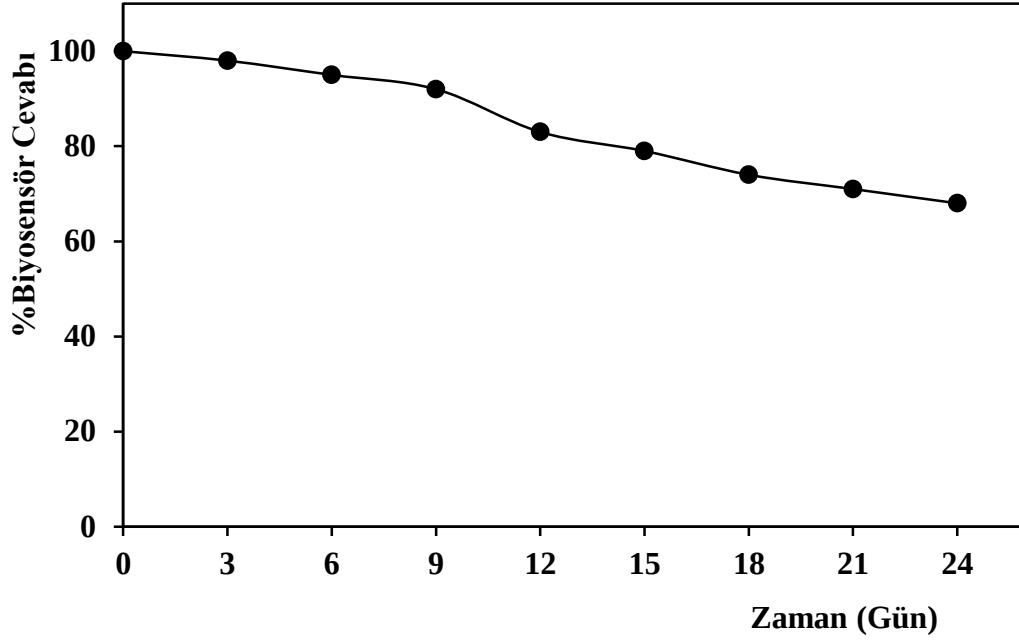
PU-X-%1 polimeri temelli biyosensör ile örnek uygulamaları gerçekleştirilirken ortamda bulunabilecek farklı türlerin biyosensör yanıtlarını nasıl etkilediği incelenmiştir. Girişim etkilerinin incelenmesi amacıyla ortamda 1 mM olacak şekilde fruktoz, maltoz, süktroz, laktoz, glukoz, askorbik asit, oksalik asit ve üre çözeltileri varken 25 mM nitrit ve 5 mM nitrat derişimleri için ölçümler gerçekleştirilmiştir. Ölçüm ortamında bulunan girişim türüne bağlı olarak biyosensör cevabında meydana gelen düşüşler Tablo 4.18'de verilmiştir.

Substrat	%Aktivite	Substrat	%Aktivite
Nitrit	100	Nitrat	100
Nitrit + Fruktoz	94	Nitrat + Fruktoz	88
Nitrit + Maltoz	94	Nitrat + Maltoz	89
Nitrit + Süktroz	95	Nitrat + Süktroz	88
Nitrit + Laktoz	93	Nitrat + Laktoz	87
Nitrit + Glukoz	95	Nitrat + Glukoz	89
Nitrit + Askorbik Asit	98	Nitrat + Askorbik Asit	92
Nitrit + Oksalik Asit	98	Nitrat + Oksalik Asit	93
Nitrit + Üre	95	Nitrat + Üre	91

Tablo 4.18. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün girişim etkilerinin incelenmesi [0,5 U NR; 2 µL PU-X-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C; +0,87 V; DPV].

4.15.6. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün depo kararlılığı

PU-X-%1 temelli biyosensörün depo kararlılığının belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan biyosensör ile başlangıç anında ve üç günlük periyotlar sonunda 5 mM nitrat derişimleri için ölçümler yapılmıştır. Biyosensörün nitrat standardına verdiği cevaplar 24 gün süre ile izlenmiş ve sonuçlar Şekil 4.149’da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde depolama şartlarına bağlı olarak biyosensör cevabında 9 gün sonunda % 8’lik, 24 gün sonunda ise % 32’lik bir düşüş görülmüştür.



Şekil 4.149. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün depo kararlılığı [0,5 U NR; 2 μ L PU-X-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV].

4.16. PU-X-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörle Örnek Uygulamaları

PU-X-%1 polimeri temelli biyosensörün örnek uygulanabilirliğini belirlemek amacıyla ticari örneklerde ve atık su örneklerinde nitrit ve nitrat analizine yönelik ölçümler alınmıştır. Ticari örnek olarak salam, sosis ve sucuk, su örneği olarakta farklı fabrikalardan alınmış 3 adet atık su örneği kullanılmıştır. Bu örneklerde hazırlanan stoklar öncelikle referans yöntem olan nitrit ve nitrat ölçüm kitleriyle okunmuş ve mg/L olarak verilen ölçüm sonuçları mM çevrilerek biyosensör yanıtları ile karşılaştırılmıştır.

Ticari örnekler ve atık su örnekleri hazırlanan biyosensör ile okunmuş ve ilgili standart grafiklerinden örneklerdeki nitrit ve nitrat miktarları hesaplanmıştır. Biyosensör ile yapılan bu ölçümlerde örneklerdeki nitrit ve nitrat düzeyi düşük olduğu için standart katma yöntemi kullanılmıştır.

PU-X-%1 temelli biyosensör ile 6 örnekte gerçekleştirilen nitrit ölçüm sonuçları Tablo 4.19’da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde ticari örnekler olan sucuk, salam ve sosis için gerçekleştirilen ölçüm sonuçları referans yöntem olan kit

ölçümü ile karşılaştırıldığında alınan yanıtlarda % 8 ile % 11 arasında değişen oranlarda düşüşler gözlenmiştir. Atık su örneklerinde gerçekleştirilen nitrit ölçümünde ise yanıtlarda ki düşüş oranının daha az olduğu görülmektedir.

Örnekler için PU-X-%1 polimeri temelli biyosensör ile gerçekleştirilen nitrat ölçüm sonuçları ise Tablo 4.20’de verilmiştir. Ticari örnekler için, biyosensör ile gerçekleştirilen nitrat ölçüm sonuçları, aynı örneklerdeki nitrit ölçüm sonuçları ile karşılaştırıldığında biyosensör yanıtlarında meydana gelen düşüş oranı artmıştır. Ticari örnekler için yapılan nitrat ölçüm sonuçları referans yöntem olan kit ölçümü ile karşılaştırıldığında ise alınan biyosensör yanıtlarında % 18 ile % 22 arasında değişen oranlarda düşüşler meydana geldiği görülmektedir. Bir numaralı atık su örneği ile gerçekleştirilen nitrat ölçümünde ise biyosensör yanıtında % 55’lik bir düşüş gözlenmiştir. 2 ve 3 numaralı atık su örnekleri için alınan biyosensör yanıtlarında ise diğer örneklere göre daha az bir düşüş görülmüştür.

Örnek	Nitrit		
	Kit Değeri (mM)	Biyosensör Değeri (mM) ± S.S.*	%Yanıt
Sucuk	1,3614	1,2088 ± 0,0273	89
Salam	1,4872	1,3571 ± 0,0186	91
Sosis	1,6398	1,5011 ± 0,0224	92
Atık su 1	0,7761	0,7394 ± 0,0129	95
Atık su 2	0,5609	0,5367 ± 0,0108	96
Atık su 3	2,0136	1,9469 ± 0,0293	97

* Ölçüm sonuçları ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n=3).

Tablo 4.19. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle örneklerde nitrit ölçümü [0,5 U NR; 2 µL PU-X-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C; +0,87 V; DPV].

Örnek	Nitrat		
	Kit Değeri (mM)	Biyosensör Değeri (mM) ± S.S.*	%Yanıt
Sucuk	2,1067	1,6506 ± 0,0169	78
Salam	0,9419	0,7688 ± 0,0049	82
Sosis	0,7032	0,5789 ± 0,0042	82
Atık su 1	0,8475	0,3833 ± 0,0135	45
Atık su 2	2,3258	2,1602 ± 0,0138	93
Atık su 3	2,5387	2,4222 ± 0,0157	95

* Ölçüm sonuçları ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n=3).

Tablo 4.20. PU-X-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle örneklerde nitrat ölçümü [0,5 U NR; 2 µL PU-X-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C; +0,87 V; DPV].

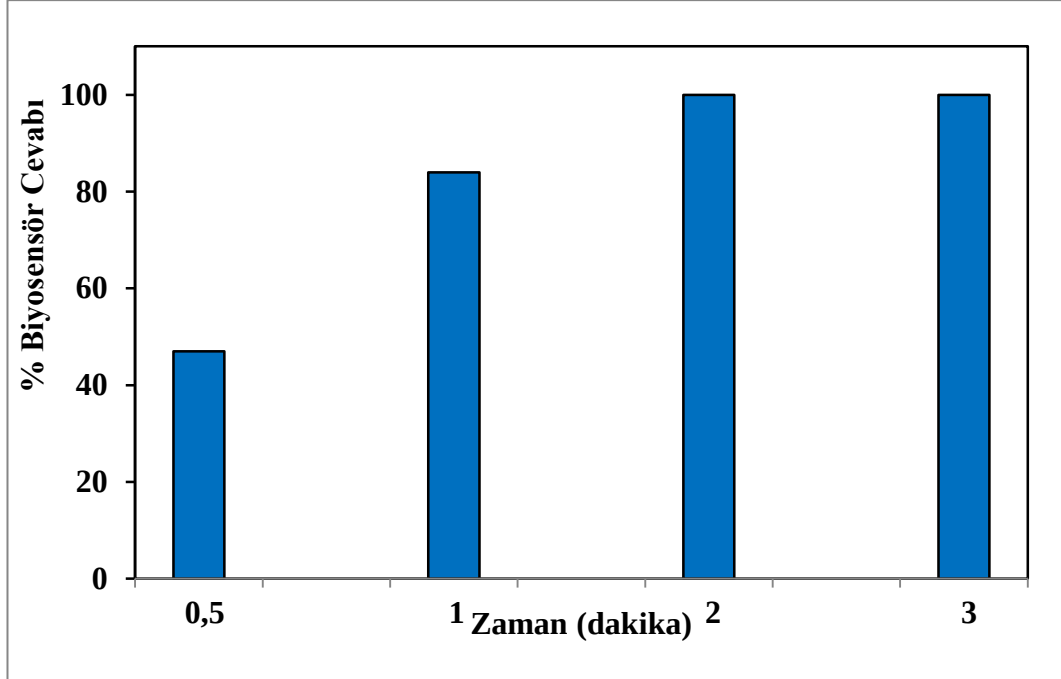
4.17. PU-Maltoz-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörün Optimizasyon Çalışmaları

PU-Maltoz-%1 biyosensörünün optimizasyonuna çalışmalarında çeşitli parametrelerin biyosensör cevabına olan etkisi araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda hazırlama koşullarının ve çalışma koşullarının optimizasyonuna yönelik olarak yanıt süresinin, enzim miktarının, koenzim miktarının, pH ve sıcaklığın biyosensör cevabına etkisi incelenmiştir.

4.17.1. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün nitrat ölçümü için yanıt süresinin belirlenmesi

Biyoaktif tabakasında 0,5 U NR enzimi içeren PU-Maltoz-%1 polimeri temelli biyosensör ile 5 mM'lık nitrat tayini için en yüksek biyosensör yanıtlarının alındığı süreyi tespit etmek amacıyla ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda 0,5; 1; 2 ve 3. dakikalarda biyosensörle nitrat ölçümleri yapılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.150'de verilmiştir. Alınan ölçüm sonuçları kıyaslandığında, en yüksek biyosensör cevabının 2. ve 3. dakikalarda alındığı görülmektedir. PU-Maltoz-%1 polimeri temelli biyosensör ile 0,5. dakikada alınan yanıt enyüksek alınan yanıtla göre % 53'lük bir düşüş göstermiştir. Yine 1. dakikada

alınan biyosensör cevabında 2. ve 3. dakikada alınan yanıtı göre % 16'lık bir düşme gözlenmiştir.

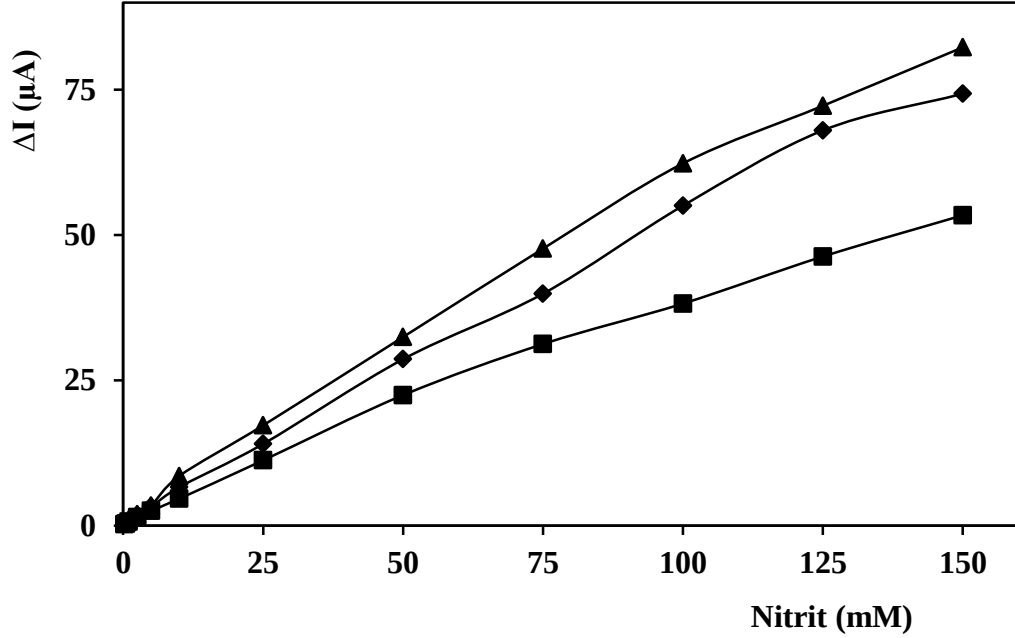


Şekil 4.150. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün nitrat ölçümü için yanıt süresinin belirlenmesi [0,5 U NR; 2 μ L PU-Maltoz-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV].

4.17.2. Enzim miktarının PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi

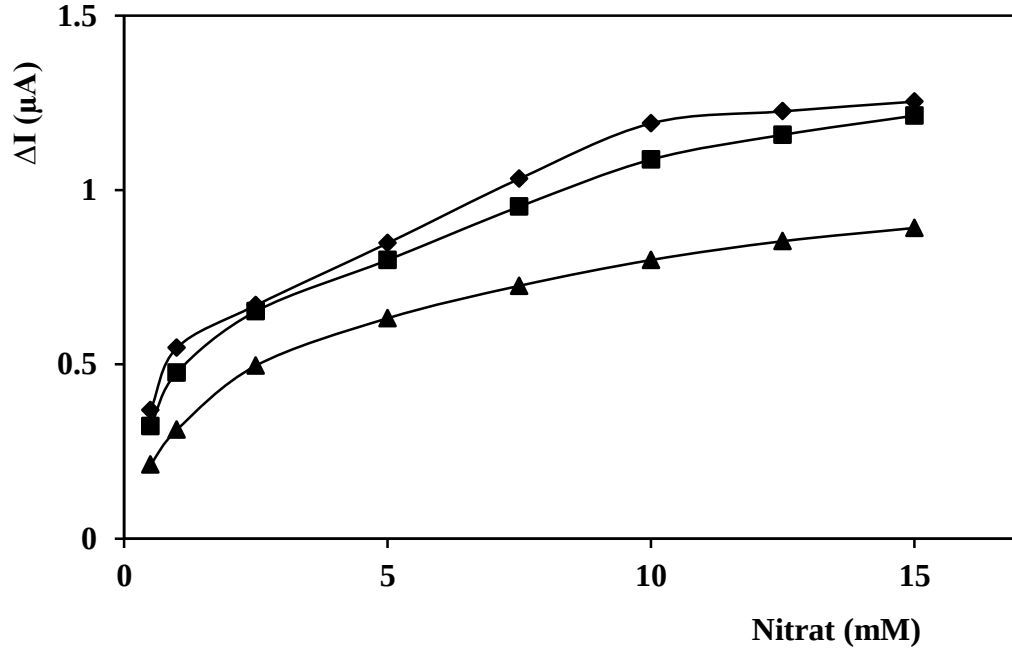
PU-Maltoz-%1 polimeri temelli biyosensörün biyoaktif tabakasını oluşturan türlerden biri olan polimer miktarı sabit tutulmuş ve diğer bir tür olan enzim miktarı değiştirilerek, sabit tutulan ölçüm şartlarında nitrit ve nitrat ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu ölçümlerde elde edilen sonuçlar için nitrit ve nitrat derişimine karşılık akımdaki değişimler grafiğe geçirilmiştir. Biyoaktif tabakasında 0,25 U; 0,5 U ve 1 U NR enzimi içeren biyosensörlerle gerçekleştirilen nitrit ölçümleri Şekil 4.151'de görölmektedir. 3 farklı enzim miktarı için hazırlanan PU-Maltoz-%1 biyosensörleri ile nitrit serisi için en yüksek yanıtlar biyoaktif tabakasında 0,25 U NR enzimi bulduran elektrot ile alınmıştır. 0,5 U ve 1 U NR

enzimiyle hazırlanan biyosensörler için alınan nitrit yanıtlarına bakıldığında yanıtlarda düşüşler gözlenmiştir.



Şekil 4.151. Nitrit ölçümü için enzim miktarının PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi [2 μ L PU-Maltoz-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV; $\blacktriangle$ 0,25 U; $\blacklozenge$ 0,5 U; $\blacksquare$ 1 U].

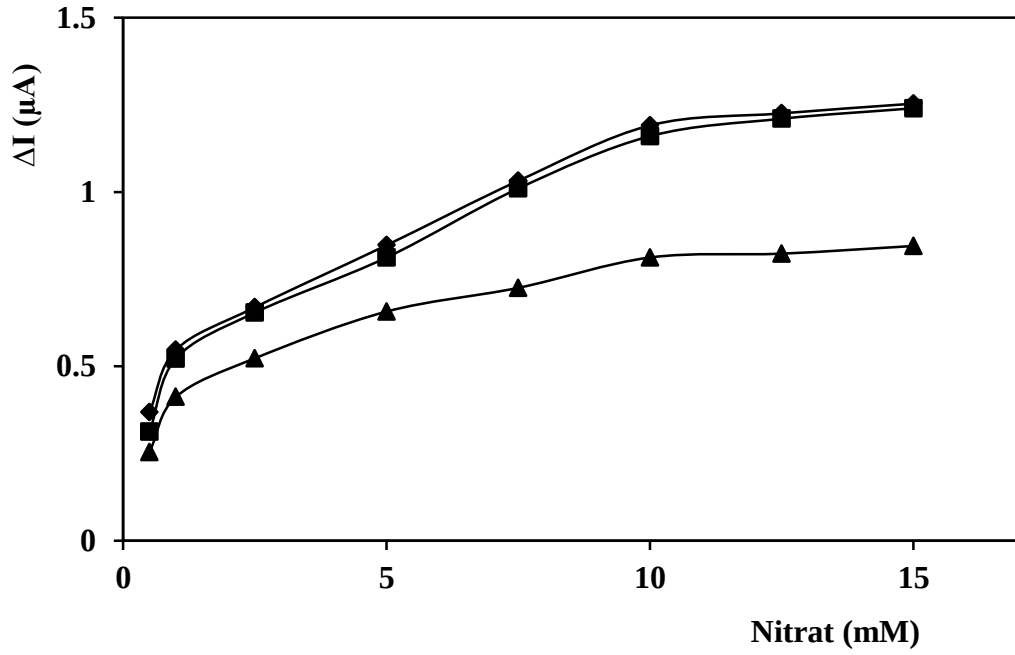
Biyoaktif tabakasında 0,25 U; 0,5 U ve 1 U NR enzimi içeren biyosensörlerle gerçekleştirilen nitrat ölçüm sonuçları ise Şekil 4.152’de görülmektedir. Nitrat serisiyle yapılan ölçümlerde en düşük biyosensör yanıtları biyoaktif tabakasında 0,25 U NR enzimi içeren biyosensörler ile alınmıştır. Biyoaktif tabakada ki enzim miktarı arttıkça alınan biyosensör yanıtları da artmıştır. 0,5 U NR enzimi içeren biyosensörle yapılan ölçümler incelendiğinde 0,25 U enzim içeren biyosensöre göre daha yüksek yanıtlar elde edilmiştir. Biyoaktif tabakada ki NR enzim miktarı 1 U yapıldığında ise biyosensör yanıtlarında düşmeler gözlenmiştir.



Şekil 4.152. Nitrat ölçümü için enzim miktarının PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi [2 μ L PU-Maltoz-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV; $\blacktriangle$ 0,25 U; $\blacklozenge$ 0,5 U; $\blacksquare$ 1 U].

4.17.3. Koenzim miktarının PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi

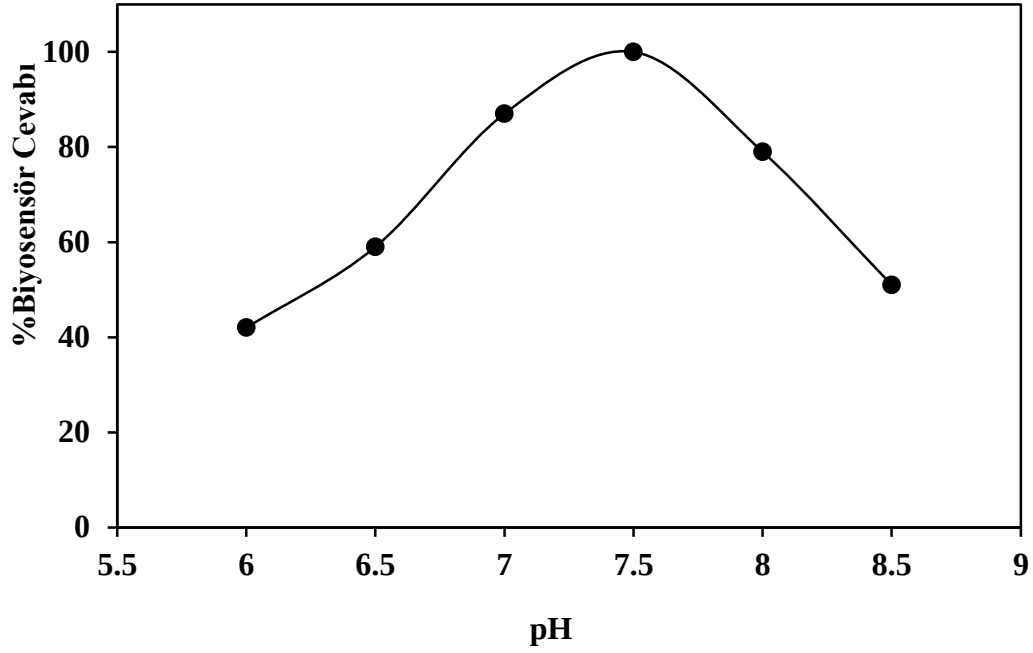
PU-Maltoz-%1 polimeri temelli biyosensörün biyoaktif tabakasını oluşturan enzim miktarının optimizasyonundan sonra, enzimin koenzimi olan NADPH miktarının optimizasyonuna geçildi. Bu amaç doğrultusunda, 0,5 U NR enzimi içeren biyosensör ile 0,125 mM; 0,25 mM ve 0,5 mM NADPH varlığında nitrat serisi için ölçümler gerçekleştirilmiş ve ölçüm sonuçları Şekil 4.153’de verilmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde en düşük biyosensör yanıtlarının 0,125 mM koenzim varlığında alındığı görülmektedir. Yapılan ölçümlerde nitrat serisi için en yüksek biyosensör cevaplarının 0,25 mM NADPH ile yapılan çalışmada alındığı görülmüştür. Koenzim derişimi 0,5 mM olacak şekilde arttırıldığında ise 0,25 mM koenzim ile yapılan ölçümlere göre çok azda olsa bir düşüş gözlenmiştir.



Şekil 4.153. Nitrat ölçümü için koenzim (NADPH) miktarının PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör cevabına etkisi [0,5 U NR; 2 μ L PU-Maltoz-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV; ▲ 0,125 mM; ◆ 0,25 mM; ■ 0,5 mM].

4.17.4. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum pH değerinin belirlenmesi

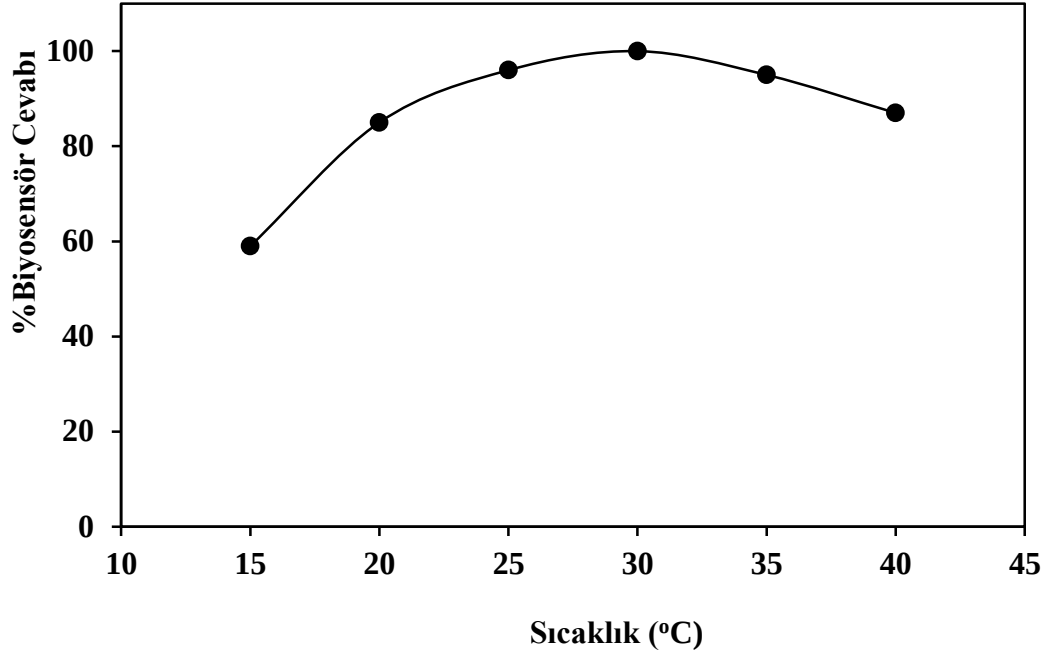
PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum pH' sını belirlemek amacıyla 6 – 8,5 arasında değişen pH'larda fosfat tamponu ile ölçümler gerçekleştirilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda pH ve % biyosensör cevabı arasında çizilen optimum pH grafiği Şekil 4.154'de verilmiştir. Grafik incelendiğinde NR enzimini optimum pH değeri 7,5 olarak görülmektedir. Denenen en düşük pH değeri olan pH 6'da enzim aktivitesinde % 58'lik en yüksek pH değeri olan pH 8,5'te ise % 49'luk bir düşüş gözlenmiştir.



Şekil 4.154. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum pH grafiği [0,5 U NR; 2 μ L PU-Maltoz-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 6 – 8,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV].

4.17.5. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum sıcaklığının belirlenmesi

Biyoaktif tabakasında enzim bulunan PU-Maltoz-%1 polimeri temelli biyosensörün en uygun çalışma sıcaklığının belirlenmesi amacıyla 15 °C ile 40 °C arasında değişen sıcaklıklarda nitrat ölçümleri alınmıştır. En düşük sıcaklıktan başlayarak en yüksek sıcaklığa doğru gerçekleştirilen bu ölçüm sonuçları ile elde edilen ve sıcaklık ile % biyosensör cevabı arasında çizilen optimum sıcaklık grafiği Şekil 4.155’de verilmiştir. Yapılan ölçümlerde en yüksek biyosensör cevabının 30 °C’ de alındığı görülmektedir. Fakat optimum sıcaklık grafiği incelendiğinde 25 °C ve 30 °C için alınan biyosensör yanıtlarının birbirine yakın olduğu ve aralarında % 4’lük bir fark bulunduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.155. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün optimum sıcaklık grafiği [0,5 U NR; 2 μ L PU-Maltoz-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; +0,87 V; DPV].

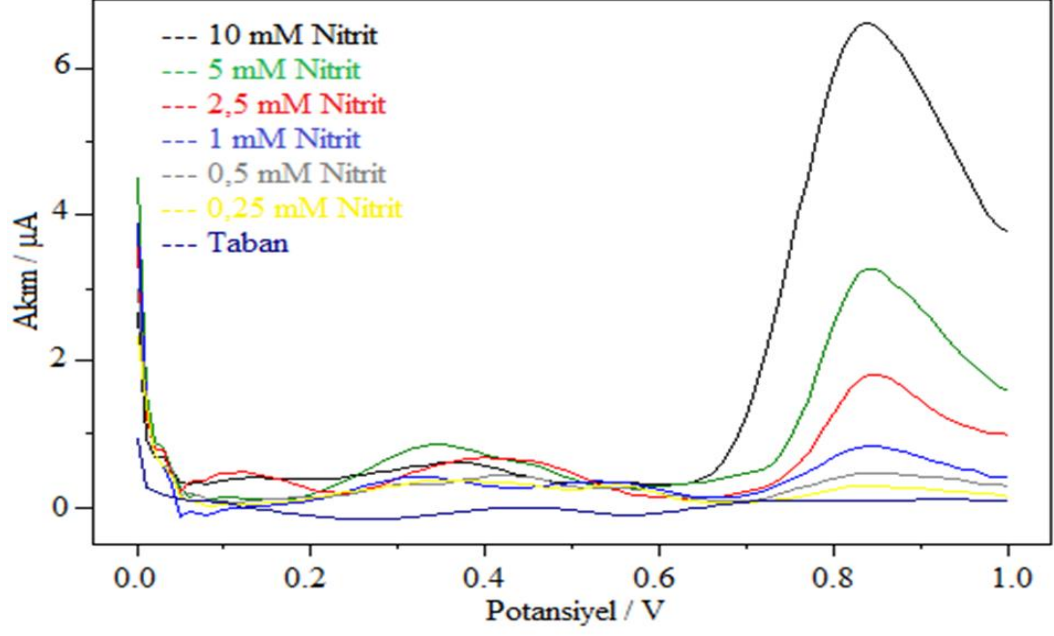
4.18. PU-Maltoz-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları

Enzim temelli biyosensörün hazırlama ve çalışma koşullarının optimizasyonundan sonra karakterizasyon çalışmalarına geçilmiştir.

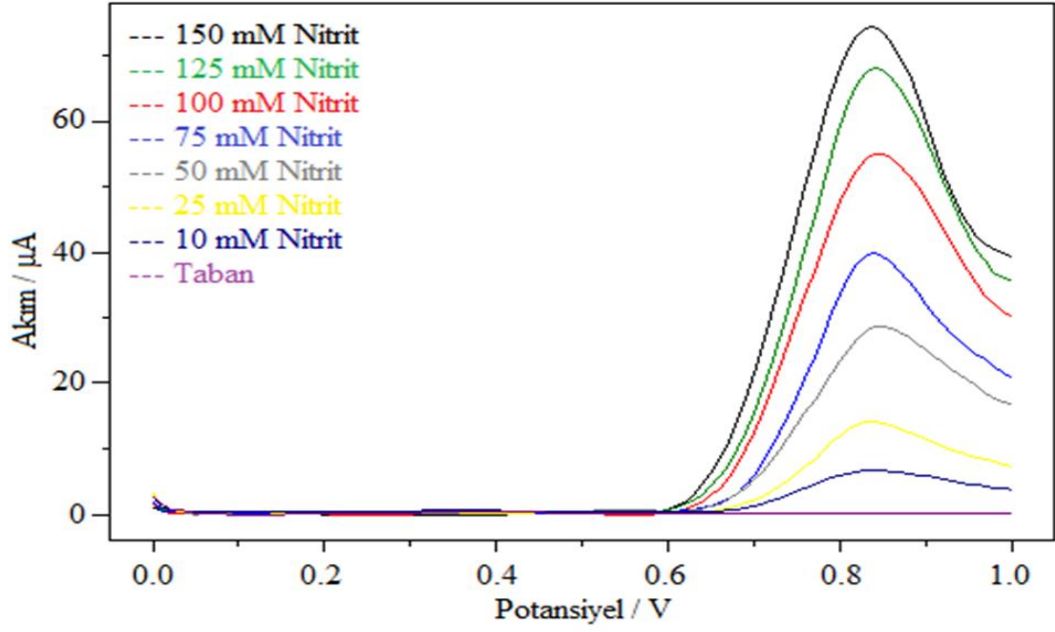
4.18.1. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Bu amaç doğrultusunda optimize edilen koşullarda PU-Maltoz-%1 polimeri temelli biyosensör ile 0,25 mM – 150 mM arasında değişen derişimlerde nitrit ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümlerde 0,25 mM – 10 mM arasındaki nitrit ölçümleri için elde edilen biyosensör yanıtları Şekil 4.156’da, 10 mM – 150 mM arasındaki nitrit ölçümleri için elde edilen biyosensör yanıtları ise Şekil 4.157’de verilmiştir. Bu ölçümler sonucunda 0,25 mM – 125 mM arasındaki nitrit derişimlerine karşılık taban akıma göre meydana gelen değişmeler grafiğe

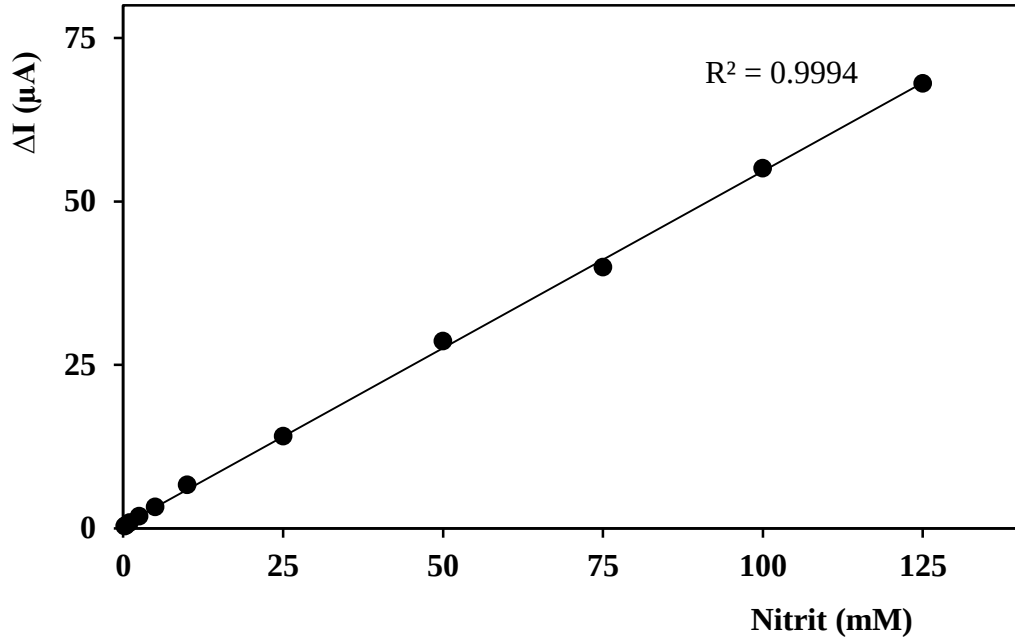
geçirildiğinde Şekil 4.158'deki standart grafiği oluşturulmuştur. Elde edilen standart grafiğinin R^2 değeri ise 0,9994 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.156. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 0,5 mM – 10 mM aralığındaki nitrit derişimleri için alınan DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-Maltoz-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



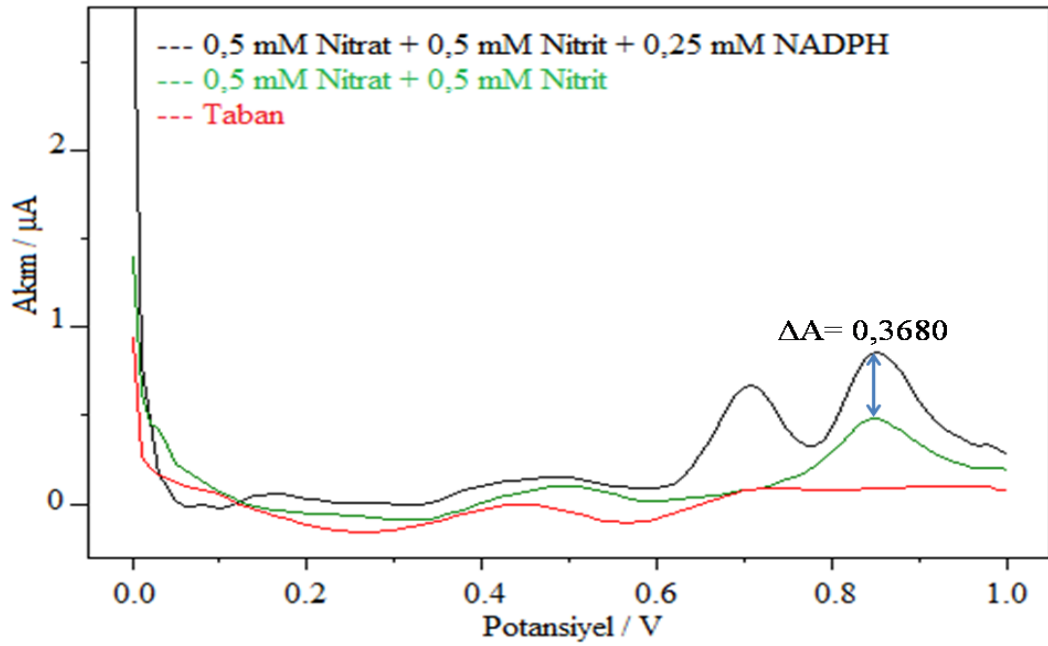
Şekil 4.157. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 10 mM – 150 mM aralığındaki nitrit derişimleri için alınan DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 μL PU-Maltoz-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 $^{\circ}\text{C}$].



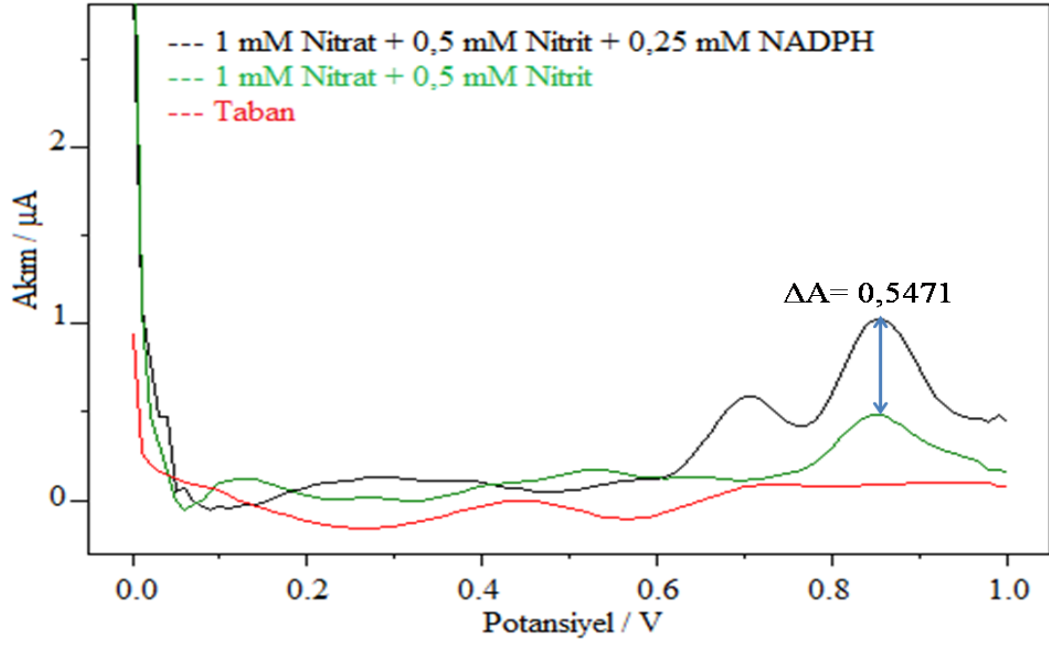
Şekil 4.158. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı [0,5 U NR; 2 μL PU-Maltoz-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 $^{\circ}\text{C}$; +0,87 V; DPV].

4.18.2. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrat tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

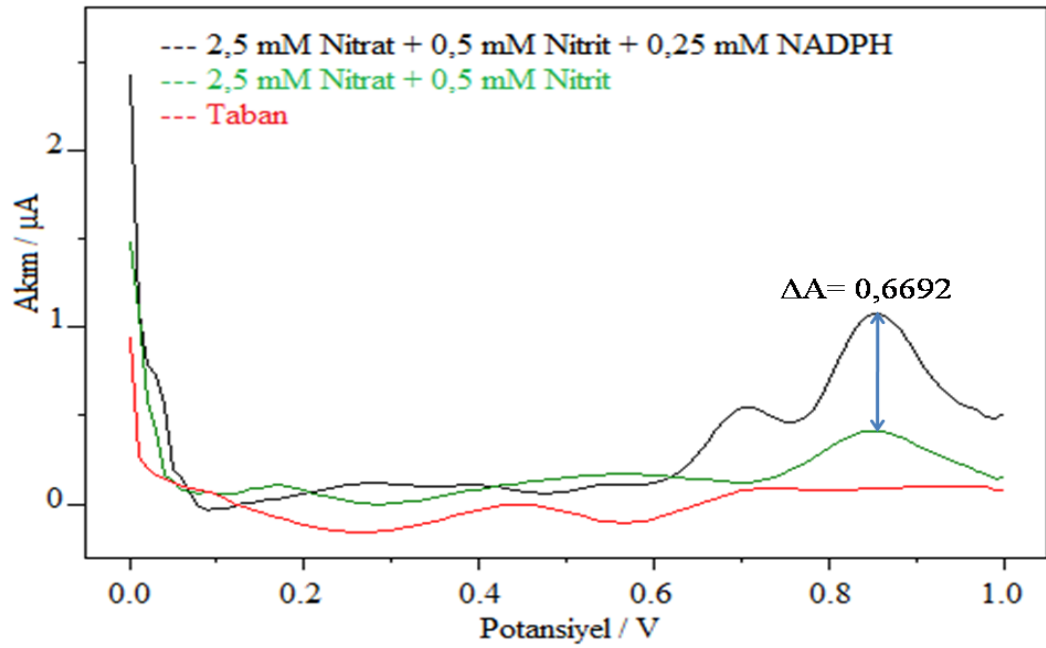
Biyosensörün doğrusal nitrat tayin aralığını belirlemek amacıyla, optimize edilen koşullarda 0,5 mM – 15 mM arasında değişen nitrat derişimleri için ölçümler gerçekleştirildi. Her bir nitrat derişimi için biyosensör tarafından elde edilen ölçüm sonuçları Şekil 4.159 ve Şekil 4.166 aralığında verilen şekillerde gösterilmiştir. Ölçülen her bir nitrat derişimi için akımda meydana gelen artışlar bu şekiller üzerinde gösterilmiştir. 1 mM – 10 mM derişim aralığındaki nitrat ölçümleri için elde edilen biyosensör yanıtları grafiğe geçirildiğinde Şekil 4.167’de ki standart grafiği elde edilmiştir. Bu standart grafiğinin R^2 değeri 0,9988 olarak bulunmuştur.



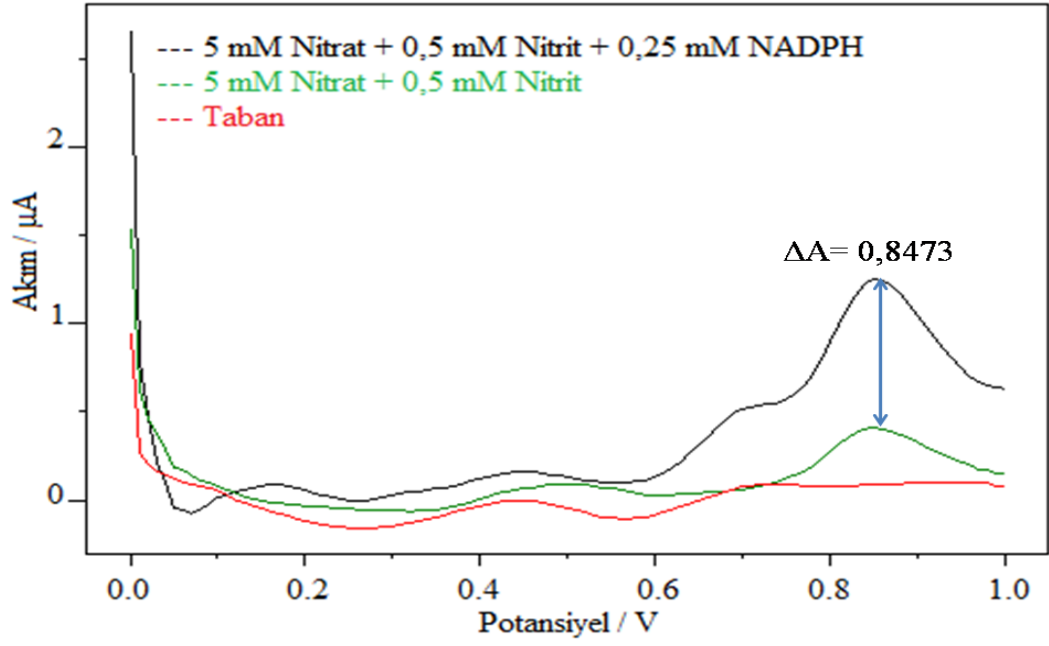
Şekil 4.159. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 0,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-Maltoz-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



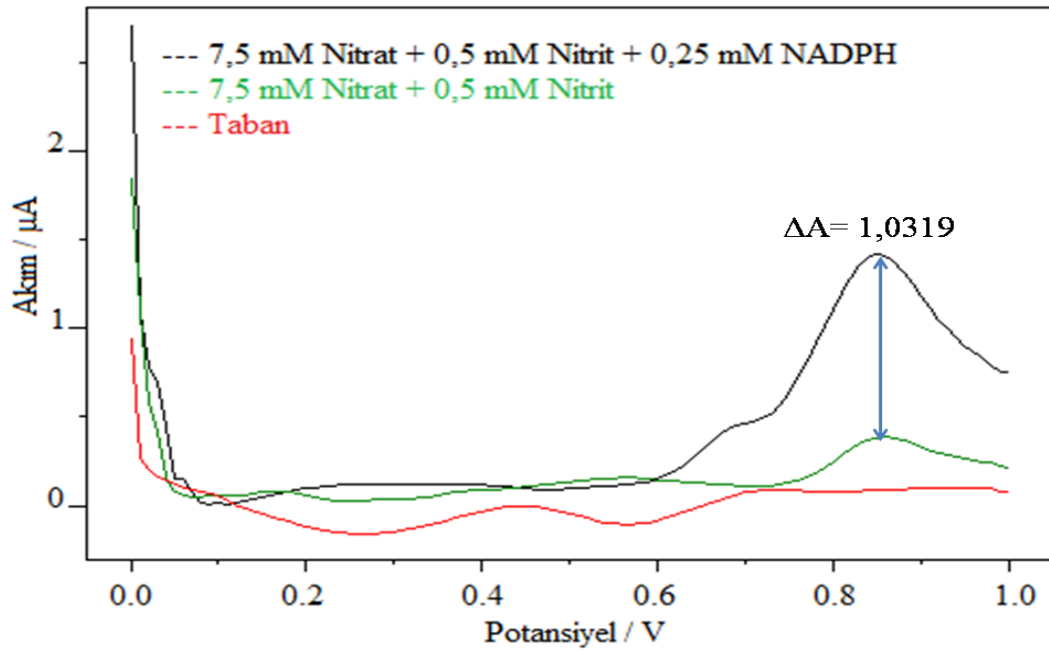
Şekil 4.160. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 1 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-Maltoz-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



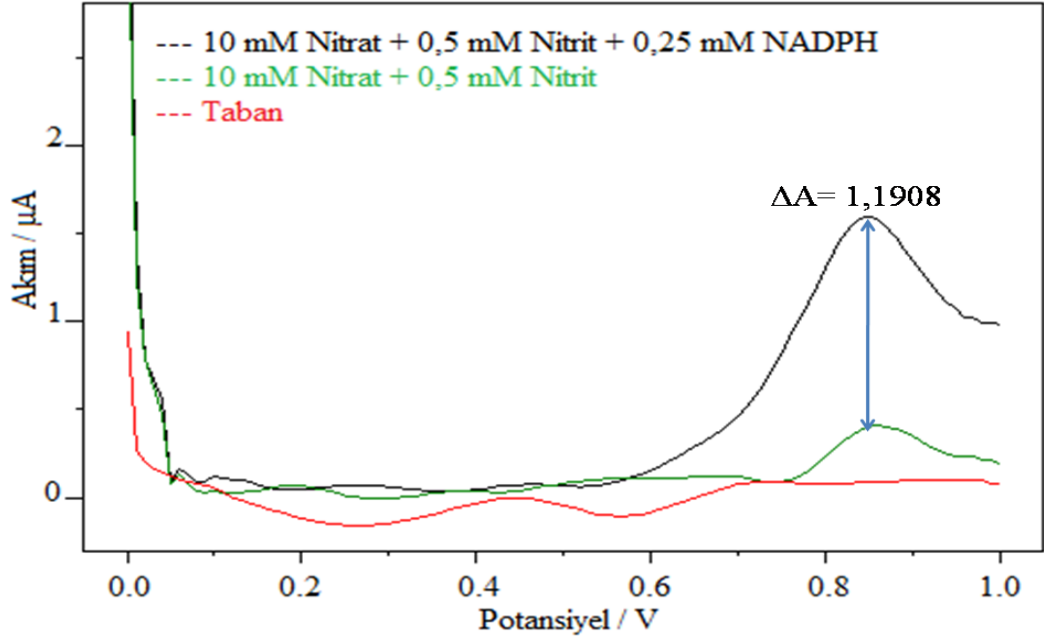
Şekil 4.161. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 2,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-Maltoz-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



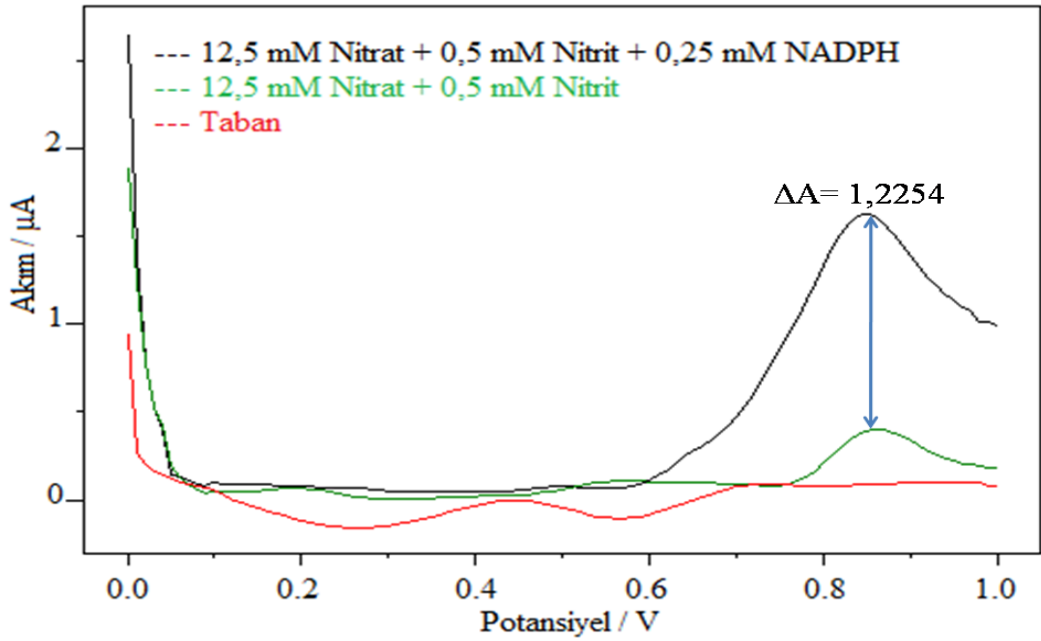
Şekil 4.162. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-Maltoz-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



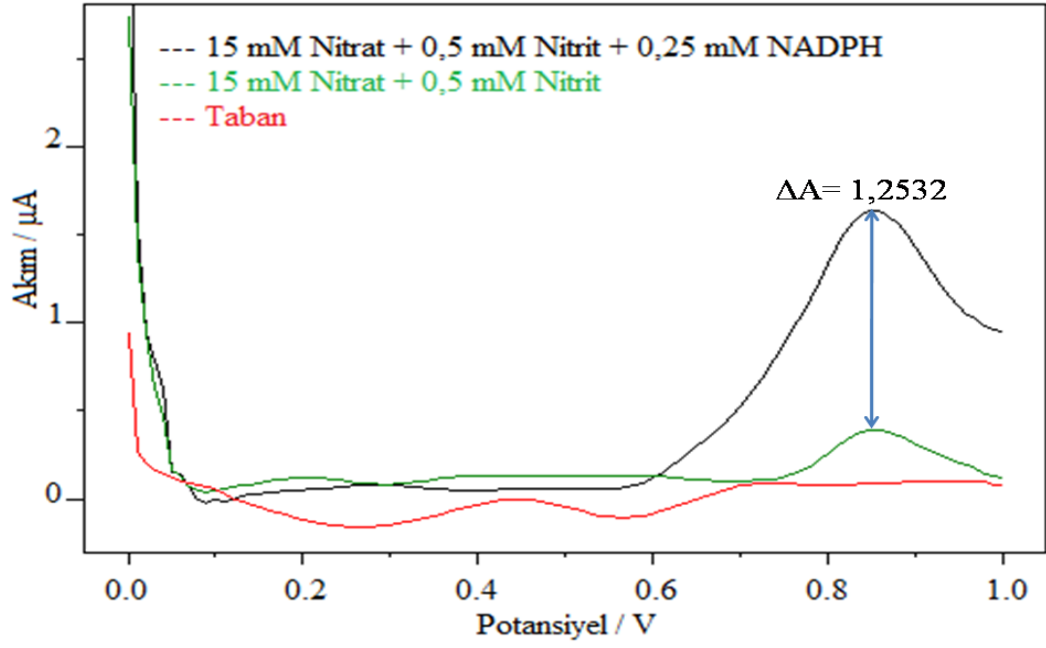
Şekil 4.163. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 7,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-Maltoz-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



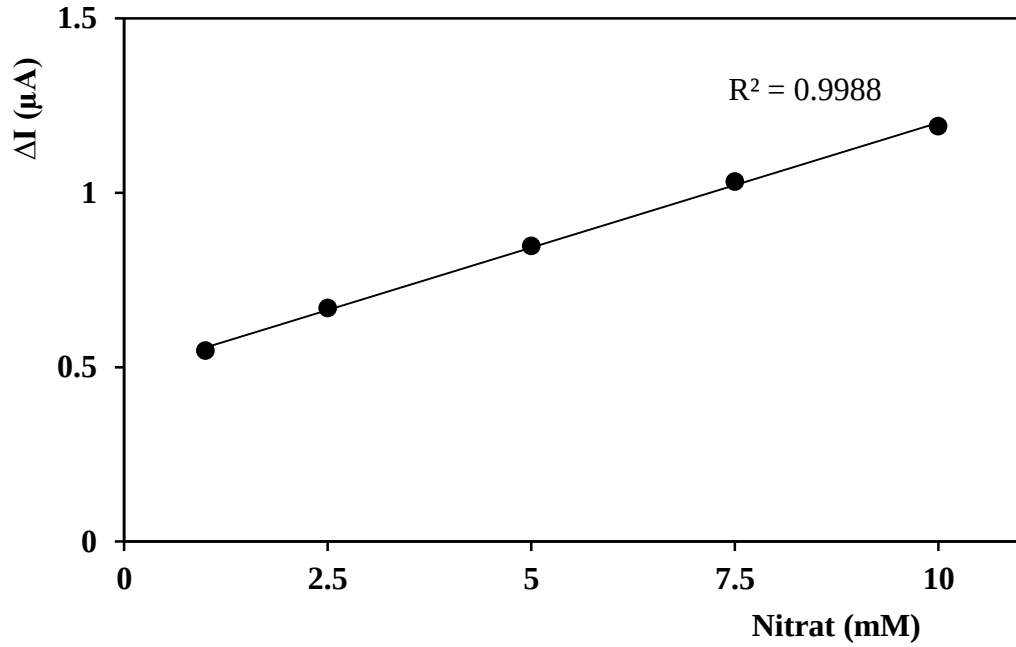
Şekil 4.164. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 10 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-Maltoz-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



Şekil 4.165. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 12,5 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 µL PU-Maltoz-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C].



Şekil 4.166. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 15 mM nitrat tayini için DPV eğrileri [0,5 U NR; 2 μ L PU-Maltoz-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C].



Şekil 4.167. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrat tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı [0,5 U NR; 2 μ L PU-Maltoz-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; 0,87 V; DPV].

4.18.3. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle nitrit ve nitrat ölçümü için tekrarlanabilirlik

PU-Maltoz-%1 polimeri temelli biyosensör ile nitrit ve nitrat ölçümünde tekrarlanabilir sonuçlar alınıp alınmadığı bu çalışma ile incelenmiştir. Bu çalışmada hazırlanan biyosensörlerle hem 25 mM'lık nitrit hem de 5 mM'lık nitrat derişimleri için ölçümler alınmıştır. 10 kez tekrarlanan bu ölçümler sonucunda elde edilen akım farklarına karşılık gelen nitrit ve nitrat derişimleri ilgili standart grafiklerinden okunmuştur. Bu ölçümlerden elde edilen veriler ışığında ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. 25 mM'lık nitrit ölçümleri için elde edilen ölçüm sonuçları, ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri Tablo 4.21'de verilmiştir. 5 mM'lık nitrat ölçümleri için elde edilen ölçüm sonuçları, ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri ise Tablo 4.22'de verilmiştir.

Ölçüm No	ΔI (μA)	Nitrit (mM)
1	14,045	25,065
2	13,989	24,961
3	13,926	24,844
4	13,918	24,830
5	13,876	24,752
6	13,869	24,739
7	13,843	24,691
8	13,654	24,341
9	13,618	24,274
10	13,583	24,209
Ortalama Değer (mM)		24,671
Standart Sapma (mM)		0,295
Varyasyon Katsayısı (%VK)		1,198

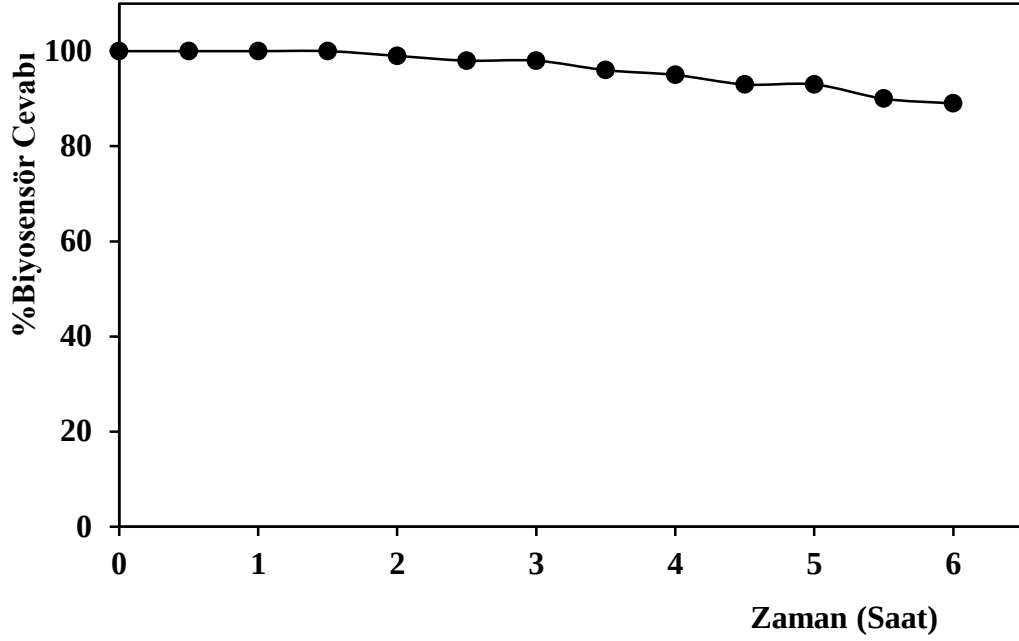
Tablo 4.21. PU-Maltoz-%1 polimeriyle hazırlanan biyosensörle 25 mM'lık nitrit ölçümleri için tekrarlanabilirlik sonuçları [0,5 U NR; 2 μ L PU-Maltoz-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C; +0,87 V; DPV].

Ölçüm No	ΔI (μA)	Nitrat (mM)
1	0,8472	5,101
2	0,8468	5,096
3	0,8457	5,080
4	0,8438	5,054
5	0,8425	5,035
6	0,8412	5,017
7	0,8395	4,993
8	0,8356	4,938
9	0,8314	4,879
10	0,8267	4,813
Ortalama Değer (mM)		5,001
Standart Sapma (mM)		0,097
Varyasyon Katsayısı (%VK)		1,931

Tablo 4.22. PU-Maltoz-%1 polimeriyle hazırlanan biyosensörle 5 mM’lık nitrat ölçümleri için tekrarlanabilirlik sonuçları [0,5 U NR; 2 μ L PU-Maltoz-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 $\pm$ 2 °C; +0,87 V; DPV].

4.18.4. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün operasyonel kararlılığı

PU-Maltoz-%1 polimeri temelli biyosensörün operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla optimize edilen ölçüm şartlarında 5 mM’lık nitrat derişimleri için 6 saat süresince 30 dakikada bir ölçümler alınmıştır. Yapılan ölçüm sonuçları Şekil 4.168’de verilmiştir.



Şekil 4.168. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün operasyonel kararlılığı [0,5 U NR; 2 μ L PU-Maltoz-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25 ± 2 °C; +0,87 V; DPV].

4.18.5. PU-Maltoz-%1 Polimeri ile hazırlanan biyosensörün girişim etkilerinin incelenmesi

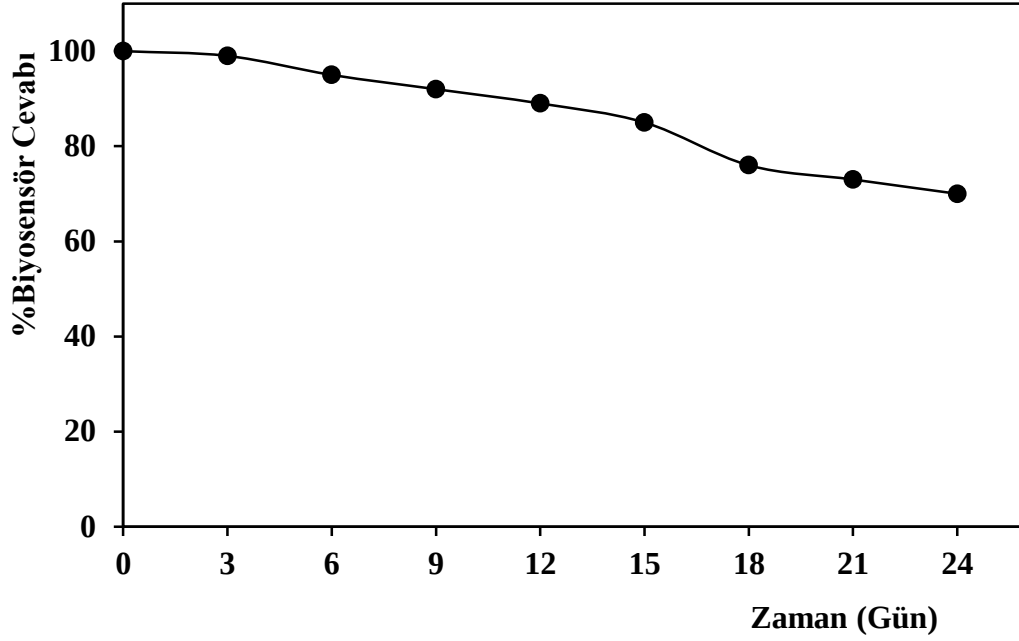
PU-Maltoz-%1 polimeri temelli biyosensörün nitrit ölçümü için girişim etkilerinin incelenmesi amacıyla 25 mM nitrit bulunan ölçüm çözeltisine 1 mM olacak şekilde girişim türleri eklenerek ölçümler alınmıştır. Nitrat ölçümüne girişim türlerinin etkisini incelemek için ise 5 mM nitrat bulunan ölçüm çözeltilerine 1 mM olacak şekilde girişim türleri eklenerek ölçümler alınmıştır. Bu amaç doğrultusunda yapılan ölçümlerde fruktoz, maltoz, sükroz, laktoz, glukoz, askorbik asit, oksalik asit ve üre çözeltileri girişim türü olarak kullanılmıştır. Girişim türlerine bağlı olarak biyosensör cevabında meydana gelen düşüşler Tablo 4.23’de verilmiştir.

Substrat	%Aktivite	Substrat	%Aktivite
Nitrit	100	Nitrat	100
Nitrit + Fruktoz	93	Nitrat + Fruktoz	89
Nitrit + Maltoz	94	Nitrat + Maltoz	89
Nitrit + Süktroz	94	Nitrat + Süktroz	87
Nitrit + Laktoz	93	Nitrat + Laktoz	88
Nitrit + Glukoz	94	Nitrat + Glukoz	89
Nitrit + Askorbik Asit	97	Nitrat + Askorbik Asit	93
Nitrit + Oksalik Asit	98	Nitrat + Oksalik Asit	93
Nitrit + Üre	94	Nitrat + Üre	90

Tablo 4.23. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün girişim etkilerinin incelenmesi [0,5 U NR; 2 µL PU-Maltoz-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C; +0,87 V; DPV].

4.18.6. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün depo kararlılığı

PU-Maltoz-%1 polimeri temelli biyosensörün depo kararlılığının belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan biyosensör ile başlangıç anında ve üç günlük periyotlar sonunda 5 mM nitrat derişimleri için ölçümler alınmıştır. Biyosensörün nitrat standardına verdiği cevaplar 24 gün süre ile izlenmiş ve sonuçlar Şekil 4.169’da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde depolama şartlarına bağlı olarak biyosensör cevabında 12 gün sonunda % 11’lik, 24 gün sonunda ise % 30’luk bir düşüş görülmüştür. Biyosensör depolama süresince fosfat tamponu içerisinde ve +4 °C’de tutulmuştur.



Şekil 4.169. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörün depo kararlılığı [0,5 U NR; 2 µL PU-Maltoz-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C; +0,87 V; DPV].

4.19. PU-Maltoz-%1 Polimeri ile Hazırlanan Biyosensörle Örnek Uygulamaları

PU-Maltoz-%1 polimeri temelli biyosensörün optimizasyon ve karakterizasyon ölçümleri tamamlandıktan sonra optimum koşullar belirlenmiş ve bu biyosensörle optimum şartlarda örnek uygulaması yapılmıştır. Örnek uygulanabilirliğini belirlemek amacıyla ticari örneklerde ve atık su örneklerinde nitrit ve nitrat analizine yönelik ölçümler alınmıştır. Ticari örnek olarak salam, sos ve sucuk, su örneği olarak farklı fabrikalardan alınmış 3 adet atık su örneği kullanılmıştır. Bu örneklerde hazırlanan stoklar öncelikle referans yöntem olan nitrit ve nitrat ölçüm kitleriyle okunmuş ve mg/L olarak verilen ölçüm sonuçları mM çevrilerek biyosensör yanıtları ile karşılaştırılmıştır.

Stok çözeltileri hazırlanan bu 6 adet örnek içerisindeki nitrit ve nitrat miktarı biyosensör ile okunmuş ve karakterizasyon çalışmasında oluşturulan standart grafiklerinden örneklerdeki nitrit ve nitrat miktarları hesaplanmıştır. Kit ile gerçekleştirilen ölçümlerde örneklerdeki nitrit ve nitrat derişimleri mM olarak hesaplandığında bu değerlerin bazılarının biyosensörün tayin sınırı dışına çıktığı

gözlenmiştir. Bu nedenle biyosensör ile gerçekleştirilen örnek ölçümlerinde standart katma yöntemi kullanılmıştır.

PU-Maltoz-%1 polimeri temelli biyosensör ile ticari örneklerde ve atık su örneklerinde gerçekleştirilen nitrit ölçüm sonuçları Tablo 4.24’de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde ticari örnekler olan sucuk, salam ve sosis için gerçekleştirilen ölçüm sonuçları referans yöntem olan kit ölçümü ile karşılaştırıldığında alınan yanıtlarda % 7 ile % 10 arasında değişen oranlarda düşüşler gözlenmiştir. Atık su örneklerinde gerçekleştirilen nitrit ölçümünde ise yanıtlarda ki düşüş oranının daha az olduğu görülmektedir.

Örneklerde gerçekleştirilen nitrat ölçümleri için elde edilen biyosensör yanıtlarından hesaplanan ölçüm sonuçları ise Tablo 4.25’de verilmiştir. Ticari örnekler için, biyosensör ile gerçekleştirilen nitrat ölçüm sonuçları, aynı örneklerdeki nitrit ölçüm sonuçları ile karşılaştırıldığında biyosensör yanıtlarında meydana gelen düşüş oranı artmıştır. Ticari örneklerdeki nitrat ölçüm sonuçları referans yöntem olan kit ölçümü ile karşılaştırıldığında, alınan biyosensör yanıtlarında % 17 ile % 19 arasında değişen oranlarda düşüşler meydana geldiği görülmektedir. Bir numaralı atık su örneği ile gerçekleştirilen nitrat ölçümünde ise biyosensör yanıtında % 58’lik bir düşüş gözlenmiştir. 2 ve 3 numaralı atık su örnekleri için alınan biyosensör yanıtlarında ise diğer örneklerle göre daha az bir düşüş görülmüştür.

Örnek	Nitrit		
	Kit Değeri (mM)	Biyosensör Değeri (mM) ± S.S.*	%Yanıt
Sucuk	1,3614	1,2296 ± 0,0257	90
Salam	1,4872	1,3810 ± 0,0175	93
Sosis	1,6398	1,5122 ± 0,0298	92
Atık su 1	0,7761	0,7305 ± 0,0061	94
Atık su 2	0,5609	0,5402 ± 0,0053	96
Atık su 3	2,0136	1,9311 ± 0,0308	96

* Ölçüm sonuçları ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n=3).

Tablo 4.24. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle örneklerde nitrit ölçümü [0,5 U NR; 2 µL PU-Maltoz-%1; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C; +0,87 V; DPV].

Örnek	Nitrat		
	Kit Değeri (mM)	Biyosensör Değeri (mM) ± S.S.*	%Yanıt
Sucuk	2,1067	1,7140 ± 0,0219	81
Salam	0,9419	0,7793 ± 0,0057	83
Sosis	0,7032	0,5832 ± 0,0038	83
Atık su 1	0,8475	0,3641 ± 0,0121	42
Atık su 2	2,3258	2,1894 ± 0,0192	94
Atık su 3	2,5387	2,3552 ± 0,0153	93

* Ölçüm sonuçları ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n=3).

Tablo 4.25. PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle örneklerde nitrat ölçümü [0,5 U NR; 2 µL PU-Maltoz-%1; 0,25 mM NADPH; 100 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 25±2 °C; +0,87 V; DPV].

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Nitrit ve nitrat genel olarak kürlenmiş etlerde lezzet arttırıcı, renk verici ve antimikrobiyal ajan olarak kullanılmaktadır. Nitrit oldukça aktif bir kimyasaldır ve gıda ürünlerinde çok sayıda reaksiyonda yer almaktadır. Özellikle gıdalarda bulunan aminler ve diğ r azotlu bileşiklerle reaksiyona girerek kanserojen nitrozaminleri meydana getirmektedir. Yüksek miktarda nitrit ve nitrat v coda alındığında birçok sağlık problemine yol açmaktadır. Nitrat iyonları doğrudan toksik etkiye sahip değildir fakat bakteriyel nitrat redüktaz aktivitesi vasıtasıyla zararlı nitrit iyonlarına dönüşmektedir. Özellikle bebeklerde nitrit kandaki hemoglobin ile reaksiyona girerek methemoglobin oluşturmaktadır. Bu durum bebeklerde mavi bebek sendromu olarak bilinen “methemoglobinemi” meydana getirmektedir. Nitrik oksit vücut içerisinde birçok fizyolojik ve biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Nitrik oksit kısa yarı ömrü ve hızlı metabolizması nedeniyle nitrit ve nitrat metabolitlerine kolayca yükseltgenir. Dolayısıyla nitrik oksit seviyesi genel olarak, plazma nitrit ve nitrat derişimlerinin belirlenmesiyle değerlendirilir. İnsan sağlığı üzerine olan olumsuz etkilerinden dolayı nitrit ve nitrat tayini  evre kirliliği, tarım, su analizi ve gıda analizlerinde önemlidir.

Nitrit ve nitrat tayinini için Griess kolorimetrik analizi, florometrik ve kemilüminesans yöntemler uygulanmıştır. Nitrit ve nitrat miktarının tayini önemli hale geldikçe yeni yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin çoğu eğitimli bireyler tarafından kullanılan pahalı ekipman gerektiren ve zaman alıcı bir örnek hazırlığı olan karmaşık kromatografik veya spektroskopik tekniklerdir. Ayırma temelli yöntemlerden gaz kromatografisi-kütle spektrofotometresi (GC-MS) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile çeşitli dedektör sistemleri birleştirilerek yeni teknikler geliştirilmiştir. Son zamanlarda, elektrokimyasal biyosensör tekniklerinin çalışma kolaylığı, düşük üretim gideri ve real-time analize uygunluğu gibi sağladığı çeşitli pratik avantajlardan dolayı, nitrit ve nitrat ölçümü için etkili bir araç olduğu kanıtlanmıştır.

Bu  alışma kapsamında nitrit ve nitratın tek elektrot ile tayini amacıyla immobilize nitrat redüktaz enzimi içeren biyosensörler geliştirilmiştir. Platin elektrot yüzeyine hazırlanan bu biyosensörlerle nitritin +0,87 V’da izlenmesi temel alınmıştır. Biyosensörler hazırlanırken fruktoz (PU-F-%), maltoz (PU-M-%), laktoz

(PU-L-%), ksiloz (PU-X-%) ve gliserol içermeyen maltoz (PU-Maltoz-%) temelli 5 farklı polimer serisi kullanılmıştır. Farklı poliüretan polimerlerle hazırlanan biyosensörlerin optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları doğrultusunda nitrat ve nitrit için doğrusal tayin aralıkları, biyosensörün yanıt süresi, enzim ve koenzim miktarının biyosensör yanıtı üzerine etkisi, optimum pH, optimum sıcaklık, tekrarlanabilirlik, girişim etkileri, operasyonel ve depo kararlılığı belirlenmiştir. Ayrıca bu biyosensörler ile optimize edilen koşullarda salam, sosıs, sucuk ve atık su örneklerinde nitrit ve nitrat tayini yapılmış ve gerçek değerlerle karşılaştırılmıştır.

Yanıt süresinin belirlenmesi amacıyla beş farklı poliüretan temelli polimer kullanılarak hazırlanan biyosensörler için en düşük yanıtlar 0,5. dakikada alınmıştır. Bu sürede alınan düşük biyosensör cevabının nedeni substratın polimer tabakasını geçerek enzime ulaşması ve ürüne dönüştürülmesi için bu sürenin kısa bir zaman olmasıdır. Yine biyosensörler için alınan 1. dakikadaki yanıtlar 0,5. dakikaya göre yüksek fakat 2. ve 3. dakikadaki biyosensör yanıtlarına oranla düşüktür. Bu sürede biyoaktif tabakaya ulaşan substratlar ürüne yani nitrite dönüştürülse de platin elektrot yüzeyinde maksimum nitrit yoğunluğu sağlanamamıştır ve biyosensör cevabı düşük olmuştur.

PU-F-%1, PU-X-%1 ve PU-Maltoz-%1 polimerleri ile hazırlanan biyosensörlerde 2. dakikada ve 3. dakikada alınan biyosensör yanıtları birbirine eşit ve en yüksek çıkmışlardır. Bunun nedeni elektrot yüzeyi ulaşabileceği maksimum nitrit yoğunluğuna 2. dakikada ulaşmıştır. 3.dakikada elde edilen biyosensör cevabının 2. dakikayla kıyaslandığında daha yüksek olması beklenirdi fakat enzim tarafından biyoaktif tabakada ve elektrot yüzeyinde oluşturulan nitritler karıştırmanın etkisiyle azda olsa polimer içerisinden ölçüm çözeltisine geçmektedir. Böylece elektrot yüzeyindeki nitrit yoğunluğu değişmemektedir. Biyosensör ölçümlerinde yanıt süresi önemli bir parametredir ve ölçüm süresinin kısa olması istenir. Sonuçta ölçüm süresine karar verilirken bu da göz önünde bulundurulmuş ve en yüksek biyosensör cevabının alındığı süreler içerisinde 2. dakikaya karar verilmiştir.

PU-M-%1 ve PU-L-%1 polimerleri ile 2. dakikada alınan biyosensör yanıtıyla 3. dakikada alınan biyosensör yanıtları birbirine yakın olsa da aralarında sırasıyla % 2 ve %5'lik bir fark vardır. En yüksek yanıtın alındığı 3. dakikada elektrot yüzeyi ulaşabileceği maksimum nitrit yoğunluğuna ulaşmıştır. Biyosensör

ölçümlerinde yanıt süresi önemli bir parametredir ve ölçüm süresinin kısa olması istenir. Sonuçta ölçüm süresine karar verilirken bu da göz önünde bulundurulmuş ve en yüksek biyosensör cevabının alındığı 3. dakika yerine yine maksimuma yakın bir yanıt veren 2. dakikaya karar verilmiştir.

Beş farklı poliüretan temelli polimer kullanılarak hazırlanan biyosensörler için enzim miktarının nitrit ölçümü için biyosensör cevabına etkisi incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda 0,25 U; 0,5 U ve 1 U NR enzimi içeren biyosensörlerle nitrit ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerde nitrit serisi için en yüksek yanıtların biyoaktif tabakasında 0,25 U NR enzimi bulunan biyosensörler ile alındığı görülmektedir. Bu biyosensörler ile yüksek yanıtlar alınmasının iki nedeni vardır. Bunlardan birincisi biyoaktif tabakada enzim miktarı az olduğu için daha ince bir difüzyon tabakası oluşmuş ve nitritler kolaylıkla elektrot yüzeyine ulaşmıştır. İkinci neden ise biyosensörler hazırlanırken elektrot yüzeyine az miktarda enzim damlatılıp kurutulduğu için daha açık bir elektrot yüzeyi oluşmuş ve bu yüzey daha çok nitritin yükseltgenmesine ve dolayısıyla akım farkının artmasına neden olmuştur. NR enzim miktarı 0,5 U ve 1 U yapıldığında biyosensörler için alınan nitrit yanıtlarında düşüşler görülmüştür. Bunun sebebi ise, biyosensörler hazırlanırken platin elektrot yüzeyine damlatılan enzim miktarının artışından kaynaklanmıştır. Bu artış hem biyoaktif tabakayı kalınlaştırmış hem de elektrot yüzeyini daha çok enzimle kapattığı için yanıtlarda düşüşler olmuştur. Ölçüm sonuçları incelendiğinde en yüksek yanıtın alındığı 0,25 U NR enzimi ile hazırlanan biyosensörlerle devam edilecek gibi görünse de, 0,25 U NR enzimi ile hazırlanan biyosensörlerin nitrat ölçümü için verdiği yanıtlar incelendiğinde bundan vazgeçilmiştir. Nitrat ölçümü için en yüksek yanıtı veren 0,5 U NR enzimi ile devam edilmeye karar verilmiştir.

Enzim miktarının nitrat ölçümüne etkisinin incelenmesi amacıyla 0,25 U; 0,5 U ve 1 U NR enzimi içeren biyosensörlerle nitrat ölçümleri yapılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde nitrat serisiyle yapılan ölçümlerde en düşük biyosensör yanıtlarının biyoaktif tabakasında 0,25 U NR enzimi içeren biyosensörlerle elde edildiği görülmüştür. Diğer biyosensörlere göre bu biyosensörün biyoaktif tabakasında enzim miktarı az olduğu için bu beklenen bir sonuçtur. Enzim miktarı az olduğu için biyoaktif tabakada enzim tarafından nitrite dönüştürülen nitrat miktarı az olacaktır. Böylece platin elektrot yüzeyinde enzim tarafından oluşturulan nitrit miktarı az olacağı için biyosensör cevapları da düşük bulunmuştur. Beş farklı poliüretan temelli

polimer kullanılarak hazırlanan biyosensörler ile alınan sonuçlar incelendiğinde en yüksek yanıtların 0,5 U NR enzimi içeren biyosensörlerle alındığı görülmektedir. Biyoaktif tabakasında 0,25 U enzim içeren biyosensöre göre enzimdeki artışın yanıtları arttırması beklenen bir sonuçtur. Çünkü biyoaktif tabakada artan enzim miktarına bağlı olarak elektrot yüzeyinde enzim tarafından oluşturulan nitrit miktarı ve dolayısıyla alınan yanıtlar artacaktır. Fakat enzim miktarı iki katına çıkarılarak (1 U) hazırlanan biyosensörler ile gerçekleştirilen ölçümlerde biyosensör yanıtlarında bir düşüş gözlenmiştir. Bunun nedeni enzim artışına bağlı olarak kalınlaşan biyoaktif tabakadan substrat ve koenzim difüzyonunun zorlaşmasıdır. Nitratların bu tabakayı geçerek enzime ulaşması ve nitrite dönüştürülmesi daha uzun bir zaman almakta ve ölçüm süresi olan 2 dakika bunun için yeterli olmamaktadır. Bu sebeple 2 dakika içerisinde elektrot yüzeyinde oluşturulan nitrit miktarı ve dolayısıyla biyosensör yanıtları düşmektedir. Sonuçlar incelendiğinde 0,5 U NR enzimi ile bundan sonraki ölçümlere devam edilmesine karar verilmiştir.

Beş farklı poliüretan temelli polimer kullanılarak hazırlanan biyosensörler için koenzim miktarının nitrat ölçümü için biyosensör cevabına etkisi incelendiğinde beş biyosensörde de en düşük yanıtların 0,125 mM NADPH varlığında alındığı görülmüştür. Bunun nedeni, ortamdaki koenzim miktarı düşükken enzim yeterince aktivite gösterememiş ve yeterince nitratı nitrite çeviremediği için alınan biyosensör yanıtları da düşmüştür. Yapılan ölçümlerde nitrat serisi için en yüksek biyosensör cevapları 0,25 mM NADPH ile alınmıştır. Koenzim derişimi 0,5 mM olacak şekilde yapılan nitrat ölçümlerinden elde edilen sonuçların, 0,25 mM koenzim ile yapılan ölçümlere göre azda olsa bir düşüş gösterdiği görülmüştür. 0,25 mM koenzim ile alınan ölçümlerde NR enziminin zaten maksimum aktivite göstermesi için gerekli olan koenzim derişimine ulaşmış olduğu görülmektedir. Yani ortamdaki koenzim derişimi arttırılsa da enzim zaten maksimum aktiviteye 0,25 mM ile ulaştığı için yanıtlarda bir artış görülmemiştir. Fakat artan koenzim derişimi ile (0,5 mM NADPH) azda olsa biyosensör yanıtlarında bir düşüş gözlenmiştir. Bu düşüşün nedeni ise, ortamda fazla miktarda var olan koenzimin, substratın enzime ulaşmasını sterik olarak engellemesinden kaynaklanmaktadır.

Biyosensörlerin performansının NR enzimi ile doğrudan bağlantılı olması optimum pH çalışmasını gerekli kılmıştır. Enzimler, protein yapısında moleküller oldukları için katalitik aktiviteleri çevre koşullarından önemli oranda

etkilenmektedir. Biyoaktif tabakasında NR enzimini bulunduran biyosensörlerin, ortamın pH' sına bağlı olarak verdiği yanıtlarda nasıl bir değişim gösterdiğini incelemek amacıyla farklı pH' larda nitrat ölçümleri alınmıştır. Bu ölçümler içerisinde enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değeri ise optimum pH olarak belirlenmiştir. Beş farklı poliüretan temelli polimer kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin hepsi için optimum pH değeri 7,5 olarak bulunmuştur. Bu sonuç NR enziminin literatür taramaları sonucunda belirlenen optimum pH değeri ile de uyumludur. Bu pH değerinden daha asidik ve daha bazik bölgelere gidildikçe biyosensör yanıtında düşüşler gözlenmiştir.

Biyosensörlerin biyoaktif tabakasında enzim bulunduğundan dolayı performanslarının ve kararlılıklarının sıcaklığa bağımlılıkları çok iyi bilinmektedir. Bu nedenle en uygun çalışma sıcaklığının belirlenmesi oldukça önemlidir. Biyosensörlerin sıcaklık ve % biyosensör cevabı arasında çizilen optimum sıcaklık grafikleri incelendiğinde en yüksek biyosensör cevabının 30 °C' de alındığı görülmektedir. Fakat 25 °C ve 30 °C için alınan biyosensör yanıtlarının birbirine yakın olduğu ve aralarında küçük farklılıklar bulunduğu gözlenmiştir. Bundan önceki biyosensör ölçümleri klima ile ortam sıcaklığı 25±2 °C' de sabit tutulan laboratuvar ortamında gerçekleştirildiği için bundan sonraki ölçümlere de 25±2 °C ile devam edilmiştir.

Poliüretan temelli biyosensörlerin nitrit ölçümü için doğrusal tayin aralıklarının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen ölçümlerde en geniş doğrusal tayin aralığı PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 0,25 mM - 125 mM aralığında alınmıştır. Diğer polimerlerle hazırlanan biyosensörler için doğrusal tayin aralıklarına bakıldığında, PU-X-%1 polimeri kullanılarak hazırlanan biyosensörle 0,5 mM - 125 mM, PU-F-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensörle 0,5 mM - 100 mM, PU-M-%1 ve PU-L-%1 polimerleri ile hazırlanan biyosensörlerle ise 0,5 mM - 75 mM olarak belirlenmiştir. Çıplak platin elektrot ile gerçekleştirilen nitrit ölçümünde 0,1 mM - 100 mM aralığında doğrusal yanıtlar alındığı belirlenmişti. Yüzeyin polimerle kaplanması nitritlerin elektrot yüzeyine ulaşmasını sterik olarak engellediği için alt tayin sınır değerini arttırmış ve PU-Maltoz-%1 polimeri ile hazırlanan biyosensör de 0,25 mM yapmıştır. Diğer biyosensörler için ise bu değer daha da artarak 0,5 mM olmuştur.

Biyosensörlerin doğrusal nitrat tayin aralıklarını belirlemek amacıyla, optimize edilen koşullarda gerçekleştirilen ölçümlerde ise beş biyosensör içinde 1 mM – 10 mM arasında değişen nitrat derişimleri için doğrusal sonuçlar elde edilmiştir. Bu biyosensörlerle yapılan nitrat ölçümlerinde 1mM'ın altındaki ve 10 mM'ın üstündeki nitrat derişimlerinde doğrusallıktan sapmalar meydana gelmiştir.

Bir biyosensörden beklenen en iyi performans kriterlerinden birisi de onun tekrarlanabilir sonuçlar veriyor olmasıdır. Tekrarlanabilirlik en genel anlamıyla ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının bir ifadesidir ve ölçüm sonuçlarının standart sapması hesaplanarak ifade edilir. Hazırlanan biyosensörlerle hem 25 mM'lık nitrit hem de 5 mM'lık nitrat derişimleri için ölçümler alınmış ve ölçümlerden elde edilen veriler ışığında ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır.

Biyosensörlerin çalışma koşullarına bağlı olarak yanıtlarında ne kadarlık bir düşüş olduğunun tespiti amacıyla optimize edilen ölçüm şartlarında 5 mM'lık nitrat derişimleri için 6 saat süresince 30 dakikada bir ölçümler alınmıştır. Bu süre içerisinde biyoaktif tabakadaki enzim aktivitesinde meydana gelen kayıplardan dolayı biyosensör yanıtlarında düşüşler gözlenmiştir. 6 saatlik süre sonunda en az düşüş % 8 ile PU-F-%1 polimeriyle hazırlanan biyosensörde gözlenmiştir. PU-X-%1, PU-M-%1 PU-Maltoz-%1 ve PU-L-%1 polimerleri ile hazırlanan biyosensör yanıtlarında ise sırasıyla % 9, %10, % 11 ve % 12 düşüş gözlenmiştir.

Beş farklı poliüretan temelli polimer kullanılarak hazırlanan biyosensörler için ölçüm ortamında bulunabilecek farklı türler her zaman ölçüm sonuçlarını etkilemektedirler. Bundan dolayı hazırlanan biyosensörlerin farklı türler yanındaki davranışları incelenmiştir. Girişim etkilerinin incelenmesi amacıyla ortamda farklı türler varken 25 mM nitrit ve 5 mM nitrat derişimleri için ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda yapılan ölçümlerde ortamda 1 mM olacak şekilde fruktoz, maltoz, süktroz, laktoz, glukoz, askorbik asit, oksalik asit ve üre çözeltileri kullanılmıştır. Girişim türüne bağlı olarak biyosensör cevaplarında farklı oranlarda düşüşler gözlenmiştir. Farklı polimerlerle hazırlanan biyosensörler için, girişim türlerinin nitrat ölçümlerinden elde edilen biyosensör yanıtlarını daha çok etkilediği gözlenmiştir. Bunun nedeni nitrat ölçümünün 5 mM, nitrit ölçümünün ise 25 mM'lık derişim için yapılması olabilir. Çünkü ortama eklenen 1 mM'lık

girişim türü düşük derişimli nitrat ölçümünü daha çok etkilemektedir. Girişim türlerine bakıldığında ise hem nitrit hem de nitrat için en az aktivite kaybı askorbik asit ve oksalik asit varlığında gerçekleştirilen biyosensör ölçümlerinde alınmıştır. Ölçüm ortamında şeker türleri varken alınan biyosensör yanıtlarında daha çok aktivite kaybı olmuştur. Bunun nedeni ortama eklenen şekerlerin çözeltinin iletkenliğini azaltmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca girişim türleri nitrat ölçümünde substratın ve koenzimin enzime ulaşmasını, nitrit ölçümünde ise nitritlerin elektrot yüzeyine ulaşmasını sterik olarak engellediği için de aktivitede kayıp olmuştur.

Biyoaktif tabakasında enzim içeren biyosensörler, ölçüm alınmadığı zamanlarda tampon içerisinde ve +4 °C' de saklanırlar. Saklama koşullarına ve süresine bağlı olarak enzimin aktivitesi ve dolayısıyla biyosensör yanıtı azalmaktadır. Biyosensörlerin depolama süresine bağlı olarak yanıtlarındaki azalmalar incelenmiştir. Beş farklı poliüretan temelli polimer kullanılarak hazırlanan biyosensörler ile 24 günlük periyot sonunda depolama şartlarına bağlı olarak % 30 ile % 41 arasında değişen oranlarda yanıtlarda düşüşler gözlenmiştir. Genel olarak biyosensörler uzun süre depolandıktan sonra, biyoaktif tabakasında denatürasyon, inhibisyon, polimer tabakasında deformasyon ve böylece enzim kaçakları oluşabilmektedir. Depolama süresince her ölçümden önce biyoaktif tabakalar incelenmiş ve deformasyon olup olmadığına bakılmıştır. 9 günden sonra biyoaktif tabakalarda deformasyonlar gözlenmiş buda enzim kayıplarına ve dolayısıyla biyosensör yanıtlarında daha fazla düşüşe neden olmuştur.

Biyosensörlerin nitrit ve nitrat analizine yönelik uygulanabilirliğini izlemek amacıyla ticari örneklerde ve atık su örneklerinde ölçümler alınmıştır. Ticari örnek olarak salam, sos ve sucuk kullanılmıştır. Ayrıca 3 adette atık su örneğinde analiz yapılmıştır. Hazırlanan örnek stokları öncelikle referans yöntem olarak nitrit ve nitrat ölçüm kitleriyle okunmuş daha sonra hazırlanan beş farklı biyosensör ile ölçülerek karşılaştırma yapılmıştır. Biyosensörlerle örneklerde gerçekleştirilen nitrit ölçümünde kit değerlerine göre düşüşler gözlenmiştir. Bunun nedeni nitrit ve nitrat bu örneklerden ekstrakte edilirken ortamda bulunabilecek ve ölçüm sonuçlarını etkileyecek diğer türlerin nitrit ve nitrat bulunan ortamdan ayrılması için ayrı bir yöntem kullanılmamıştır. Bu nedenle ortamda bulunan girişim türleri ölçüm sonuçlarını etkilemiş ve yanıtlarda düşmeler görülmüştür. Atık su örneklerinde

gerçekleştirilen nitrit ölçümünde ise yanıtlarda ki düşüş oranının daha az olduğu görülmüştür.

Ticari örnekler için, biyosensörler ile gerçekleştirilen nitrat ölçüm sonuçları, aynı örneklerdeki nitrit ölçüm sonuçları ile karşılaştırıldığında biyosensör yanıtlarında meydana gelen düşüş oranı artmıştır. Bunun nedeni ticari örnek ekstraktlarında, ortamda bulunabilecek ve enzimin aktivitesini ve dolayısıyla biyosensörün ölçüm sonucunu etkileyecek girişim yaratan türlerin ortamda bulunmasıdır. Bu türler enzimin aktivitesini etkileyeceği gibi polimer gözeneklerini kapatarak ya da sterik engelleme yaparak substratın enzime ulaşmasında engellemektedirler. Bir numaralı atık su örneği ile gerçekleştirilen nitrat ölçümünde ise biyosensör yanıtında yaklaşık olarak yarı yarıya bir düşüş gözlenmiştir. Bunun nedeninin atık su ortamında bulunan bir türün enzim aktivitesini kısmen inhibe ettiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, çeşitli poliüretan temelli polimerler kullanılarak platin elektrot yüzeyine nitrat redüktaz enzimi immobilize edilmiş ve hazırlanan biyosensörlerle hem nitrit iyonu hem de nitrat iyonu aynı anda tayin edilmiştir. Kullanılan polimerlerle ortamdaki girişimler engellenmiş ve seçiciliği daha yüksek bir biyosensör geliştirilmiştir. Ayrıca bu biyosensörlerin çeşitli örneklerde (et ürünlerinde, atık sularda) nitrit ve nitrat ölçümü için kullanılabilirliği ortaya konmuştur.

6. KAYNAKLAR

- Adeloju, S.B., Sohail, M. (2011). Polypyrrole-based bilayer nitrate amperometric biosensor with an integrated permselective poly-ortho-phenylenediamine layer for exclusion of inorganic interferences. *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 4270-4275.
- Aiken, A.M., Peyton, B.M., Apel, W.A., Petersen, J.N. (2003). Heavy metal-induced inhibition of *Aspergillus niger* nitrate reductase: applications for rapid contaminant detection in aqueous samples. *Analytica Chimica Acta*, 480, 131-142.
- Amman, M. (2014). Electrochemical and electrophoretic deposition of enzymes: principles, differences and application in miniaturized biosensor and biofuel cell electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 58, 121-131.
- Ata, Ş. (2010). Biyolojik, gıda ve çevre örneklerindeki nitrit, nitrat, sekonder amin ve nitrozaminler. Doktora Tezi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Zonguldak.
- Bankar, S.B., Bule, M.V., Singhal, R.S., Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase-An overview. *Biotechnol. Adv.*, 27, 489-501.
- Biswas, S., Chowdhury, B., Ray, B.C. (2004). A novel spectrofluorimetric method for the ultra trace analysis of nitrite and nitrate in aqueous medium and its application to air, water, soil and forensic samples. *Talanta*, 64, 308-312.
- Brogan, K.L., Walt, D.R. (2005). Optical fiber-based sensors: application to chemical biology. *Current Opin. Chem. Biol.*, 9, 494-500.
- Burakhama, R., Oshimab, M., Grudpan, K., Motomizu, S. (2004). Simple flow-injection system for the simultaneous determination of nitrite and nitrate in water samples. *Talanta*, 64, 1259-1265.
- Can, F., Ozoner, S.K., Ergenekon, P., Erhan, E. (2012). Amperometric nitrate biosensor based on carbon nanotube/polypyrrole/nitrate reductase biofilm electrode. *Materials Science and Engineering C*, 32, 18-23.
- Cemek, M., Akkaya, L., Birdane, Y.O., Seyrek, K., Bulut, S., Konuk, M. (2007). Nitrate and nitrite levels in fruity and natural mineral waters marketed in western Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 236-240.
- Chan, T.Y.K. (2011). Vegetable-borne nitrate and nitrite and the risk of methaemoglobinemia. *Toxicology Letters*, 200, 101-108.
- Chaubey, A., Malhotra, B.D., (2002). Mediated Biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, 17, 441-456.
- Chen, H., Mousty C., Chen, L., Cosnier, S. (2008). A new approach for nitrite determination based on a HRP/catalase biosensor. *Materials Science and Engineering*, 28, 726-730.

- Chen, H., Mousty, C., Chen, L., Cosnier, S. (2008). A new approach for nitrite determination based on a HRP/catalase biosensor. *Materials Science and Engineering C*, 28, 726-730.
- 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.
- Chen, Q., Ai, S., Zhu, X., Yin, H., Ma, Q., Qiu, Y. (2009). A nitrite biosensor based on the immobilization of cytochrome c on multi-walled carbon nanotubes-PAMAM-chitosan nanocomposite modified glass carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 2991-2996.
- Cockburn, A., Brambilla, G., Fernández, M.L., Arcella, D., Bordajandi, L.R., Cottrill, B., van Peteghem, C., Dorne, J.L. (2013). Nitrite in feed: from animal health to human health. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 270(3), 209-217.
- Connolly, D., Paul, B. (2001). Rapid determination of nitrate and nitrite in drinking water samples using ion-interaction liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 441, 53-62.
- Cosnier, S., Da Silva, S., Shan, D., Gorgy, K. (2008). Electrochemical nitrate biosensor based on poly(pyrrole-viologen) film-nitrate reductase-clay composite. *Bioelectrochemistry*, 74, 47-51.
- Çete, S., Yaşar, A., Arslan, F. (2006). An amperometric biosensor for uric acid determination prepared from uricase immobilized in polypyrrole film. *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*, 34, 367-380.
- Çimen, B. (1996). Sığır karaciğeri ve insan pankreası organik nitrat redüktazın saflaştırılması ve bazı kinetik özelliklerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.
- Da Silva, S., Shan, D., Cosnier, S. (2004). Improvement of biosensor performances for nitrate determination using a new hydrophilic poly(pyrrole-viologen) film. *Sensor and Actuators B*, 103, 397-402.
- Dahlin, A.B., (2012). Size matters: problems and advantages associated with highly miniaturized sensors. *Sensors*, 12(3), 3018-3036.
- Dai, Z., Bai, H., Hong, M., Zhu, Y., Bao, J., Shen, J. (2008). A novel nitrite biosensor based on the direct electron transfer of hemoglobin immobilized on CdS hollow nanospheres. *Biosensors and Bioelectronics*, 23, 1869-1873.
- Dinçkaya, E., (1999). Enzim sensörleri, Biyosensörler. (pp 81-142). Azmi Telefoncu (Ed), Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir.
- Ding, Y., Wang, Y., Li, B., Lei, Y. (2010). Electrospun hemoglobin microbelts based biosensor for sensitive detection of hydrogen peroxide and nitrite. *Biosensors and Bioelectronics*, 25, 2009-2015.

- Dong, S., Li, N., Huang, T., Tang, H., Zheng, J. (2012). Myoglobin immobilized on LaF₃ doped CeO₂ and ionic liquid composite film for nitrite biosensor. *Sensors and Actuators B*, 173, 704-709.
- Dziedzic, B., Mazanowska-Gajdowicz, J., Walczewska, A., Sarniak, A., Nowak, D. (2003). Comparison of cadmium and enzyme –catalyzed nitrate reduction for determination of NO₂-NO₃ in breath condensate. *Clinica Chimica Acta*, 335, 65-74.
- Eguílaz, M., Agüí, L., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M. (2010). A biosensor based on cytochrome c immobilization on a poly-3-methylthiophene/multi-walled carbon nanotubes hybrid-modified electrode. Application to the electrochemical determination of nitrite. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 644, 30-35.
- Erkekoglu, H., Sipahi, H., Baydar, T. (2009). Evaluation of nitrite in ready-made soups. *Food Analytical Methods*, 2, 61-65.
- Fang, Y., Ohata, H., Honda, K. (2009). Fluorometric determination of nitrite with 2,3-diaminonaphthalene by reverse phase HPLC under alkaline conditions. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 59, 153-155.
- Ferreira, N.F., Solís, V.M. (2004). An amperometric nitrate reductase-phenosafranin electrode: kinetic aspects and analytical applications. *Bioelectrochemistry*, 64, 61-70.
- Ferrucci, L.M., Sinha, R., Ward, M.H., Graubard, B.I., Hollenbeck, A.R., Kilfoy, B.A., Schatzkin, A., Michaud, D.S., Cross, A.J. (2010). Meat and components of meat and the risk of bladder cancer in the NIH-AARP diet and health study. *Cancer*, 116, 4345-4353.
- Filho, O.F., Vieira, I.C., (2000). L-Ascorbic acid determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on carbon paste modified with crude extract of Zucchini (Cucurbita pepo). *J. Braz. Chem. Soc.* 11, 412-418.
- Fu, Y., Li, P., Bu, L., Wang, T., Xie, Q., Chen, J., Yao, S. (2011). Exploiting metal-organic coordination polymers as highly efficient immobilization matrixes of enzymes for sensitive electrochemical biosensing. *Anal Chem.* 83(17), 6511-6517.
- Geng, R., Zhao, G., Liu, M., Li, M. (2008). A sandwich structured SiO₂/cytochrome c/SiO₂ on a boron-doped diamond film electrode as an electrochemical nitrite biosensor. *Biomaterials*, 29, 2794-2801.
- Gladwin, M.T., Crawford, J.H., Patel, R.P. (2004). The biochemistry of nitric oxide, nitrite and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free Radical Biology&Medicine*, 36, 707-717.
- Gonchar, M., Maidan, M., Korpan, Y., Sibirny, V., Kotylak, Z., Sibirny, A. (2002). Metabolically engineered methylotrophic yeast cells and enzymes as sensor biorecognition elements. *FEMS Yeast Research*, 2, 307-314.

- Govani, M., Jansson, E.A., Weitzberg, E., Lundberg, J.O. (2008). The increase in plasma nitrite after a dietary nitrate load is markedly attenuated by an antibacterial mouthwash. *Nitric Oxide*, 19, 333-337.
- Görgülü, M. (2011). Hipoksantin tayini için polipirol-polivinil sülfonat filme ksantin oksidaz ve ürikaz enzimleri immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Griffin, G.D., Stratis-Cullum, D.N. (2009). Biosensor. Academic Press, Oxford, England, 15 p.
- Guevara, I., Iwanejko, J., Dembińska-Kieć, A., Pankiewicz, J., Wanay, A., Anna, P., Gołabek, I., Bartuś, S., Malczewska-Malec, M., Szczudlik, A. (1998). Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clinica Chimica Acta*, 274, 177-188.
- Hamilton, J.P., Meltzer, S.J. (2006). A review of the genomics of gastric cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 4, 416-425.
- Harvey, M., Cave, G., Chanwai, G., (2010). Fatal methaemoglobinaemia induced by selfpoisoning with sodium nitrite. *Emergency Medicine Australasia*, 22, 463-465.
- Hassan, S.S.M., Sayour, H.E.M., Al-Mehrezi, S.S. (2007). A novel planar miniaturized potentiometric sensor for flow injection analysis of nitrates in wastewaters, fertilizers and pharmaceuticals. *Analytica Chimica Acta*, 581, 13-18.
- Hong, J., Dai, Z. (2009). Amperometric biosensor for hydrogen peroxide and nitrite based on hemoglobin immobilized on one-dimensional gold nanoparticle. *Sensor and Actuators B*, 140, 222-226.
- Jaworska, G. (2005). Nitrates, nitrites and oxalates in products of spinach and New Zealand spinach. Effect of technological measures and storage time on the level of nitrates, nitrites and oxalates in frozen and canned products of spinach and New Zealand spinach. *Food Chemistry*, 93, 395-401.
- Jobgen, W.S., Jobgen, S.C., Li, H., Meininger, C.J., Wu, G. (2007). Analysis of nitrite and nitrate in biological samples using high-performance liquid chromatography. *J. Chromator. B*, 851, 71-82.
- Kage, S., Kudo, K., Ikeda, N. (2002). Simultaneous determination of nitrate and nitrite in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of analytical Toxicology*, 26 (6), 320-324.
- Kaminskaya, O.V., Zakharova, E.A., Slepchenko, G.B. (2004). Simultaneous voltammetric determination of nitrites and nitrates in waters. *Journal of Analytical Chemistry*, 59 (11), 1091-1096.
- Kılınç, M.E. (1996). Enzime dayalı elektrokimyasal enzim elektrotların mediyatör kullanarak tasarımı. Doktora tezi, Ege Üniveristesi, İzmir.

- Kiso, Y., Jung, Y.J., Kuzawa, K., Seko, Y., Saito, Y., Yamada, T., Nigai, M. (2006). Visual determination of nitrite and nitrate in waters by color band formation method. *Chemosphere*, 64, 1949-1954.
- Kissinger, P.T., (2005). Biosensors- a perspective. *Biosens Bioelectron.* 20(12), 2512-2516.
- Lei, Y., Chen, W., Mulchandani, A. (2006). Microbial biosensors. *Anal. Chim. Acta.* 568, 200-210.
- Leszczynska, T., Flipiak-Florkiewicz, A., Sikora, E., Pisulewski, P.M. (2009). Effects of some processing methods on nitrate and nitrite changes in cruciferous vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis.* 22, 315-321.
- Liang, F., Jia, M., Hu, J. (2012). Pt-implanted indium tin oxide electrodes and their amperometric sensor applications for nitrite and hydrogen peroxide. *Electrochimica Acta*, 75, 414-419.
- Looger, L.L., Dwyer, M.A., Smith, J., Hellinga, H.W. (2003). Computational design of receptor and sensor proteins with novel functions. *Nature*, 423(6936), 195-190.
- Lorimier, R.M., Tian, Y., Hellinga, H.W. (2006). Binding and signaling of surface-immobilized reagentless fluorescent biosensors derived from periplasmic binding proteins. *Protein Sci.* 15(8), 1936-1944.
- Madasamy, T., Pandiaraj, M., Balamurugan, M., Bhargava, K., Sethy, N.K., Karunakaran, C. (2014). Copper, zinc superoxide dismutase and nitrate reductase coimmobilized bienzymatic biosensor for the simultaneous determination of nitrite and nitrate. *Biosensors and Bioelectronics*, 52, 209-215.
- Manassaram, D.M., Backer, L.C., Moll, D.M. (2006). A review of nitrates in drinking water: maternal exposure and adverse reproductive and developmental outcomes. *Environmental Health Perspective*, 114, 320-327.
- Manea, F., Remes, A., Radovan, C., Pode, R., Picken, S., Schooman, J. (2010). Simultaneous electrochemical determination of nitrate and nitrite in aqueous solution using Ag-doped zeolite-expanded graphite-epoxy electrode. *Talanta*, 83 (1), 66-71.
- Masserini, J.R.T., Fanning, K.A. (2000). A sensor package for the simultaneous determination of nanomolar concentrations of nitrite, nitrate and ammonia in seawater by fluorescence detection. *Marine Chemistry*, 68, 323-333.
- McColl, K.E.L. (2006). Cancer of the gastric cardia. *Clinical Gastroenterology*, 20, 687-696.
- Mikuska, P., Vecera, Z. (2003). Simultaneous determination of nitrite and nitrate in water by chemiluminescent flow-injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 495, 225-232.
- Minh, C.T. (1993). Biosensors. Chapman & Hall, London, England, 217 p.

- Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, D.A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, 5, 62-71.
- Nagababu, E., Rifkind, J.M. (2010). Measurement of plasma nitrite by chemiluminescence. *Methods in Molecular Biology*, 610, 41-49.
- Nakamura, H., Karube, I. (2003). Current research activity in biosensors. *Analytical&Bioanalytical Chemistry*, 377, 446-468.
- Nataliya, B., Andrei N. (2005). A spectrophotometric assay for nitrate in an excess of nitrite. *Nitric Oxide*, 13, 93-97.
- Odacı, D. (2010). Karbohidrat analizine yönelik biyosensör sistemlerinin geliştirilmesi, karakterizasyon ve uygulamaları. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Özdestan, Ö., Üren, A. (2010). Gıdalarda Nitrat ve Nitrit. *Academic Food Journal*, 8, 35-43
- Pasquali, C.E.L., Hernando, P.F., Alegri J.S.D. (2007). Spectrophotometric simultaneous determination of nitrite, nitrate and ammonium in soils by flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 600, 177-182.
- Prasad, S., Chetty, A.A., (2008). Nitrate-N determination in leafy vegetables: Study of the effects of cooking and freezing. *Food Chemistry*, 106, 772-780.
- 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.
- Raat Nicolaas, J.H., Noguchiv Audrey, C., Liu Virginia, B., Raghavachari, N., Liu, D., Xu, X., Shiva, S., Munson Peter, J., Gladwin Mark, T. (2009). Dietary nitrate and nitrite modulate blood and organ nitrite and the cellular ischemic stress response. *Free Radical Biology and Medicine*, 47, 510-517.
- Romitelli, F., Angelo, S., Chierici, S.E., Pitocco, D., Tavazzi, B., Amorini, A.M., Lazzarino, G., Stasio, E.D. (2007). Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: The importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. *Journal of Chromatography B*, 851, 257-267.
- Ronkainen, N.J., Halsall, H.B., Heineman, W.R. (2010). Electrochemical biosensors. *Chem. Soc. Rev.*, 39, 1747-1763.
- Sachdeva, V., Vinita, H. (2014). A new immobilization and sensing platform for nitrate quantification. *Talanta*, 124, 52-59.
- Scheller, F.W., Hintsche, R., Pfeijer, D., Schubert, F., Riedel, K., Kindervater, R. (1991) Biosensors: Fundamentals, applications and trends. *Sensor and Actuators B:Chemical*. 4, 197-206.
- Serra, A. (2011). Biosensors-emerging materials and applications. Croatia, 401 p.

- 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 cd_1 nitrite reductase and its redox partner cytochrome c_{552} to improve the selectivity of nitrite biosensing. *Analytica Chimica Acta*, 693, 41-46.
- Shariar, S.M., Hinoue, T. (2010). Simultaneous voltammetric determination of nitrate and nitrite ions using a copper electrode pretreated by dissolution/redeposition. *Analytical Sciences*, 26, 1173-1179.
- Sharma, S., Sehgal, N., Kumar, A. (2003). Biomolecules for development of biosensors and their applications. *Current Applied Physics*, 3, 307-316.
- Sheldon, R.A., van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev.* 42(15), 6223-6235
- Shiddiky, M.J.A., Won, M.S., Shim, Y.B. (2006). Simultaneous analysis of nitrate and nitrite in a microfluidic device with a Cu-Complex-modified electrode. *Electrophoresis*, 27, 4545-4554.
- Sırıken, B., Özdemir, M., Yavuz, H., Pamuk, Ş. (2006). The microbiological quality and residual nitrate/nitrite levels in Turkish sausage (soudjouck) produced in Afyon Province, Turkey. *Food Control*, 17, 923-928.
- Silveira, C., Gomes, S.P., Araújo, A.N., Conceição, M., Montenegro, B.S.M., Todorovic, S., Viana, A.S., Silva, R.J.C., Moura, J.J.G., Gabriela Almeida, M. (2010). An efficient non-mediated amperometric biosensor for nitrite determination. *Biosensors and Bioelectronics*, 25, 2026-2032.
- Sohail, M., Adeloju, S.B. (2008). Electroimmobilization of nitrate reductase and nicotinamide adenine dinucleotide into polypyrrole films for potentiometric detection of nitrate. *Sensor and Actuators B*, 133, 333-339.
- Sparacino-Watkins, C., Stolz, J.F., Basu, P. (2014). Nitrate and periplasmic nitrate reductases. *Royal Society of Chemistry*, 43, 676-706.
- Spichiger-Keller, U.E. (1998). Chemical sensors and biosensors for medical and biological applications. Wiley-VCH press, New York, 139 p.
- Telefoncu, A. (1999). Biyosensörler. Azmi Telefoncu (Ed), Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir.
- Tsikas, D., Suchy, M.T., Mitschke, A., Beckmann, B., Gutzki, F.M. (2012). Measurement of nitrite in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *Methods in Molecular Biology*, 844, 277-293.
- Unnikrishnan, B., Ru, P.L., Chen, S.M., Mani, V. (2013). *Sensor and Actuators B*, 177, 887-892.
- Valesco-Garcia, M.N., Mottram, T. (2003). Biosensor technology addressing agricultural problems. *Biosystems Engineering*, 84(1), 1-12.

- Wang, H., Nakata, E., Hamachi I. (2009). Recent progress in strategies for the creation of protein-based fluorescent biosensors. *Chembiochem.* 10(16), 2560-2577.
- Wang, H.S., Pan, Q.X., Wang, G.X. (2005). A biosensor based on immobilization of horseradish peroxidase in chitosan matrix crosslinked with glyoxal for amperometric determination of hydrogen peroxide. *Sensors*, 5, 266-276.
- Wang, X., Dzyadevych, S.D., Chovelon, J.M., Renault, N.J., Ling, C., Siqing, X., Jianfu, Z. (2006). Development of a conductometric nitrate biosensor based on methyl viologen/nafion composite film. *Electrochemistry Communications*, 8, 201-205.
- Wang, X., Lu, X., Chen, J. (2014). Development of biosensor technologies for analysis of environmental contaminants. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 2, 25-32.
- Wang, X., Lu, X., Chen, J., Development of biosensor Technologies for analysis of environmental contaminants. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 2, 25-32.
- Wilson, G.S., Ammam M. (2007). In vivo biosensors. *FEBS J.* 274(21), 5452-5461.
- Xuejiang, W., Dzyadevych, S.D., Chovelon, J.M., Renault, N.J., Ling, C., Siqing, X., Jianfu, Z. (2006). Conductometric nitrate biosensor based on methyl viologen/nafion/nitrate reductase interdigitated electrodes. *Talanta*, 69, 450-455.
- Yakovleva, M., Bhand, S., Danielsson, B. (2013). The enzyme thermistor-a realistic biosensor concept. *Analytica Chimica Acta*, 766, 1-12.
- Yakovleva, M., Bhand, S., Danielsson, B. (2013). The enzyme thermistor- A realistic biosensor concept. *Analytica Chimica Acta*, 766, 1-12.
- Yang, C.Y., Wu, D.C., Chang, C.C. (2007). Nitrate in drinking water and risk of death from colon cancer in Taiwan. *Environment International*, 33, 649-653.
- Yıldız, A. (1999). Elektrokimyasal Biyosensörler, Biyosensörler. (p 42). Azmi Telefoncu (Ed), Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir.
- Yue, R., Lu, Q., Zhou, Y. (2011). A novel nitrite biosensor based on single-layer graphene nanoplatelet-protein composite film. *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 4436-4441.
- Yurchenko, S., Mölder, U. (2006). Volatile N-Nitrosamines in various fish products. *Food Chemistry*, 96 325-333.
- 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.
- Zhang, Z., Xia, S., Leonard, D., Jaffrezic-Renault, N., Zhang, J., Bessueille, F., Goepfert, Y., Wang, X., Chen, L., Zhu, Z., Zhao, J., Gabriela Almeida, M.,

- Silveira, C.M. (2009). A novel nitrite biosensor based on conductometric electrode modified with cytochrome c nitrite reductase composite membrane. *Biosensors and Bioelectronics*, 24,1574-1579.
- Zuo, Y., Wang, C., Van, T. (2006). Simultaneous determination of nitrite and nitrate in dew, rain, snow and lake water samples by ion-pair high-performance liquid chromatography. *Talanta*, 70, 281-285.

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ali ERDOĞAN

Doğum Yeri ve Tarihi: Doğanşehir/20.07.1981

Adres: İnönü Üniveristesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

E-Posta: ali.erdogan@inonu.edu.tr

Lisans: Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü (Biyoteknoloji Ağırlıklı Biyokimyagerlik) (1999-2004)

Yüksek Lisans: İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü (Biyokimya Anabilim Dalı) (2005-2008)

Mesleki Deneyim ve Ödüller:

Araştırma Görevlisi: İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü (2006-)

Ödüller:

- Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölüm Birinciliği (2004)
- Tübitak Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu (2005)
- Biyokimya Dalında En İyi Poster Birincilik Ödülü 21. Ulusal Kimya Kongresi, İnönü Üniversitesi (23–27 Ağustos 2007, MALATYA)
- Tübitak Yurt İçi Doktora Bursu (2008)

Yayın Listesi:

- Erdoğan A, Köytepe S, Ates B, Yılmaz İ, Seçkin T. Preparation of the L-asparaginase-based biosensor with polyimide membrane electrode for monitoring L-asparagine levels in leukemia. International Journal of Polymeric Materials. 63, 17, 2014.

- Eşrefoğlu M, Gül M, Ateş B, Erdoğan A. The effects of caffeic acid phenethyl ester and melatonin on age-related vascular remodeling and cardiac damage. *Fundam Clin Pharmacol.* 25, 5, 580-590, 2011
- Vardı N, Parlakpınar H, Cetin A, Erdogan A, Öztürk I.C. Protective Effect of beta-Carotene on Methotrexate-Induced Oxidative Liver Damage. *Toxicologic Pathology.* 38, 4, 592-597, 2010
- Emre S, Gul M, Ates B, Esrefoglu M, Koc B, Erdogan A, Yesilada E. Comparison of the Protective Effects of Prostaglandin Analogues in the Ischemia and Reperfusion Model of Rabbit Eyes. *Experimental Animals.* 58, 5, 505-513, 2009
- Kutlu T, Durmaz G, Ates B, Erdogan A. Protective Effect Of Dietary Apricot Kernel Oil Supplementation On Cholesterol Levels And Antioxidant Status Of Liver In Hypercholesteremic Rats. *Journal of Food Agriculture & Environment.* 7, 3-4, 61-65, 2009
- Vardi N, Parlakpınar H, Ozturk F, Ates B, Gul M, Cetin A, Erdogan A, Otlu A. Potent protective effect of apricot and β -carotene on methotrexate-induced intestinal oxidative damage in rats, *Food and Chemical Toxicology*, 46, (2008) 3015–3022.
- Akyilmaz E., Erdogan A., Ozturk R., Yasa I. Sensitive determination of L-Lysine with a new amperometric microbial biosensor based on *S.cerevisiae* yeast cells, *Biosensors & Bioelectronics*, 22:6, 1055-1060, 2007
- Ates B, Dogru MI, Gul M, Erdogan A, Dogru AK, Yilmaz I, Yurekli M, Esrefoglu M. Protective role of caffeic acid phenethyl ester in the liver of rats exposed to cold stres, *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 20:3, 283-289, 2006