



**ASETİLKOLİNESTERAZ (AChE) ENZİMİNİN YENİ SENTEZLENEN
NANOPARTİKÜLLERE İMMOBİLİZASYONU VE BAZI PESTİSİTLERİN
BELİRLENMESİ**

Emre KARMAZ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MART 2018

Emre KARMAZ tarafından hazırlanan “ASETİLKOLİNESTERAZ (AChE) ENZİMİNİN YENİ SENTEZLENEN NANOPARTİKÜLLERE İMMOBİLİZASYONU VE BAZI PESTİSİTLERİN BELİRLENMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Nurşen SARI

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Başkan: Prof. Dr. Mustafa HAYVALI

Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Üye: Doç. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Tez Savunma Tarihi: 13/03/2018

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Emre KARMAZ

13/03/2018

ASETİLKOLİNESTERAZ (AChE) ENZİMİNİN YENİ SENTEZLENEN
NANOPARTİKÜLLERE İMMOBİLİZASYONU VE BAZI PESTİSİTLERİN
BELİRLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Emre KARMAZ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mart 2018

ÖZET

Bu çalışmada; Imidan fosmet ve Vantex pestisitlerinin belirlenmesinde AChE immobilize nanopartiküllerin kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu amaçla, (2AEPS-SalBr) ve (2AEPS-SalBr-Pd) kodlu nanopartiküller sentezlenmiştir. Tris(2-aminoetil)amin polimeri ile 5-brom-2-hidroksi benzaldehitin kondenzasyonu sonucunda (2AEPS-SalBr) kodlu nanopartikül, kalıp yöntemi kullanılarak da (2AEPS-SalBr-Pd) kodlu nanopartikül sentezlenmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin yapıları FT-IR, GPC, SEM/EDX ve element analizleri ile aydınlatılmıştır. Sentezlenen nanopartiküllere Asetilkolinesteraz(AChE) enzimi immobilize edilerek immobilize-AChE enziminin optimum pH, optimum sıcaklık, tekrar kullanım sayısı, depolama kararlılığı ve kinetik parametreleri belirlenmiştir. Immobilize AChE optimum pH değeri her iki destek için 8, optimum sıcaklık değeri ise sırasıyla 50°C ve 70°C bulunmuştur. K_m ve V_{mak} değerleri; (2AEPS-SalBr)-AChE için (pH:8, 50°C'de) 1,443 mM; 0,251 mM/dk, (2AEPS-SalBr-Pd)-AChE için (pH:8, 70°C'de) 0,680 mM; 0,157 mM/dak olarak hesaplanmıştır. Daha sonra Imidan fosmet ve Vantex pestisitlerinin tayini yapılmıştır. Araştırma sonucunda Imidan fosmet pestisitinin Vantex pestisitine göre daha düşük konsantrasyonda belirlenebildiği görülmüştür.

Bilim Kodu : 20103
Anahtar Kelimeler : AChE enzimi, immobilizasyon, pestisit.
Sayfa Adedi : 64
Danışman : Prof. Dr. Nurşen SARI

IMMOBILIZATION OF ACETYLCHOLINESTERASE (ACHE) ENZYME ON NEWLY SYNTHESIZED NANOPARTICLES AND DETERMINATION OF SOME PESTICIDES

(M. Sc. Thesis)

Emre KARMAZ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

March 2018

ABSTRACT

In this study, the usability of AChE immobilized nanoparticles for the identification of Imidan fosmet and Vantex pesticides was investigated. For this purpose, (2AEPS-SalBr) and (2AEPS-SalBr-Pd) encoded nanoparticles were synthesized. Condensation of the tris(2-aminoethyl) amine polymer with 5-bromo-2-hydroxy benzaldehyde resulted in the formation of (2AEPS-SalBr). To synthesize (2AEPS-SalBr-Pd) coded nanoparticle template method was used. The structures of the synthesized nanoparticles were identified by FT-IR, GPC, SEM / EDX and element analysis. Acetylcholinesterase (AChE) enzyme was immobilized on the synthesized nanoparticles and optimum pH, optimum temperature, reuse number, storage stability and kinetic parameters of immobilized-AChE enzyme were identified. Optimum pH for immobilized AChE on both supports was 8 but the optimum temperature was found 50°C and 70°C, respectively. Km and Vmax values for AChE which immobilized to (2AEPS-SalBr) were 1,443 mM; 0,251 mM/min (pH:8, 50°C); for AChE which immobilized to (2AEPS-SalBr-Pd) were 0.157 mM/min.; 0,680 mM (pH: 8, 70°C). Thereafter, the identification of Imidan fosmet and Vantex pesticides was carried out. As a result of the research, it was observed that the determination of Imidan fosmet pesticide can be determined at a lower concentration than the Vantex pesticide.

Science Code : 20103

Key Words : AChE enzyme, immobilization, pesticide.

Page Number : 64

Supervisor : Prof. Dr. Nurşen SARI

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam boyunca benden desteğini, bilgisini ve tecrübelerini esirgemeyen Prof. Dr. Nurşen SARI'ya, tecrübeleri ve yardımlarıyla yanımda olan Arő. Gör. Elvan HASANOğLU ÖZKAN'a ve Nurdan KURNAZ YETİM'e, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen eőim Ezgi KARMAZ'a teőekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Nanopartikül Terimi ve Tarihi	3
2.2. Paladyum Kompleksleri ve Nanopartiküller.....	6
2.3. Enzim İmmobilizasyonu	7
2.4. Enzim Kinetiği	10
2.5. Asetilkolinesteraz (AChE) Enzimi.....	11
2.6. Ellman Metodu.....	13
2.7. Organofosfatlı Pestisitler.....	14
2.7.1. Tez çalışmasında kullanılan organofosfatlı pestisit	15
2.8. Piretrin ve Piretroid Pestisitleri	16
2.8.1. Tez çalışmasında kullanılan piretroid pestisiti.....	17
2.9. İmmobilize AChE ile Pestisit Tayini	17
2.10. Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	18
3. MATERYAL VE METOT	27

	Sayfa
3.1. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar.....	27
3.1.1. Kimyasal maddeler	27
3.1.2. Cihazlar	28
3.2. Hazırlanan Çözeltiler	29
3.3. Destek Polimerlerinin Hazırlanması	30
3.3.1. (2AEPS-SalBr) polimerinin hazırlanması.....	30
3.3.2. (2AEPS-SalBr-Pd) polimerinin hazırlanması	31
3.4. Destek Polimerlere AChE Enziminin İmmobilizasyonu, Optimizasyonu ve Pestisit Tayini	32
3.4.1. İmmobilize Asetilkolinesteraz enziminin aktifliğine pH etkisi	32
3.4.2. İmmobilize Asetilkolinesteraz enziminin aktifliğine sıcaklık etkisi.....	32
3.4.3. İmmobilize Asetilkolinesteraz enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi	33
3.4.4. İmmobilize Asetilkolinesteraz enziminin tekrar kullanılabilirliği.....	34
3.4.5. İmmobilize Asetilkolinesteraz enziminin depolama kararlılığı.....	34
3.4.6. İmmobilize AChE enzimi ile pestisit tayini.....	34
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	37
4.1. Destek Polimerlerinin Karakterizasyonu	37
4.1.1. (2AEPS-SalBr) polimerinin karakterizasyonu.....	39
4.1.2. (2AEPS-SalBr-Pd) polimerinin karakterizasyonu	41
4.2. Serbest ve İmmobilize AChE Enzimi İle İlgili Çalışmalar.....	43
4.2.1. Serbest ve immobilize AChE'in aktifliğine pH etkisi	44
4.2.2. İmmobilize AChE'in aktifliğine sıcaklık etkisi	44
4.2.3. Serbest ve immobilize AChE enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	45
4.2.4. İmmobilize AChE enziminin tekrar kullanılabilirliği.....	47

	Sayfa
4.2.5 İmmobilize AChE enziminin depolama kararlılığı.....	48
4.2.6. İmmobilize AChE enzimi ile pestisit tayini.....	48
4.3. Sonuçların Değerlendirilmesi	50
4.4. Öneriler	51
KAYNAKLAR	53
EKLER	61
EK-1. Bilimsel Ulusal Kongrede Basılan Bildiri.....	62
EK-2. Bilimsel Uluslararası Kongrede Basılan Bildiri.....	63
ÖZGEÇMİŞ	64

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Kimyasal listesi.....	27
Çizelge 4.1. Modifiye edilen polimerlerin M_w , M_n ve element analiz yüzdeleri.....	37
Çizelge 4.2. Modifiye edilen polimerlerin belirgin FT-IR frekansları (cm^{-1}).....	39
Çizelge 4.3. Sentezlenen polimerlere immobilize edilen AChE için seçilen optimum pH ve sıcaklık değerleri	45
Çizelge 4.4. Serbest ve immobilize AChE için kinetik parametreler	46
Çizelge 4.5. İmmobilize AChE'ın % bağıl aktiflikleri üzerine Imidan Fosmet pestisitinin etkisi.....	49
Çizelge 4.6. İmmobilize AChE'ın % bağıl aktiflikleri üzerine Vantex pestisitinin etkisi.....	50

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Farklı şekillere sahip nanopartiküller: a) nanoküreler b) nanotüp c) düzensiz şekilli	3
Şekil 2.2. Nanopartiküller ile kolloid ve çok küçük partiküllerin boyut karşılaştırması	3
Şekil 2.3. Nanopartikül yapısında kullanılan polimerlerden bazıları	4
Şekil 2.4. Nanokürelere immobilize edilen enzimlerin genel görünüşü: a) gözenekli silika b) manyetik nanopartikül	5
Şekil 2.5. Tetra- <i>n</i> -alkilamonyum tuzu varlığında PdCl ₂ 'ün indirgenmesi ile edilen Pd nanopartikülleri	7
Şekil 2.6. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi	8
Şekil 2.7. Enzimatik bir reaksiyonun şematik gösterimi	10
Şekil 2.8. Michaelis-Menten grafiği (V_{mak} : maksimum hız, K_m : Michaelis-Menten sabiti).....	10
Şekil 2.9. Lineweaver-Burk grafiği	11
Şekil 2.10. Elektrikli yılan balığından(<i>Torpedo marmorata</i>) ekstrakte edilen AChE'in kurdele yapısı.....	12
Şekil 2.11. Asetilkolinesterazın asetilkolin ile reaksiyonun şematik gösterimi.....	12
Şekil 2.12. AChE ile asetilkolinin reaksiyon mekanizması.....	13
Şekil 2.13. Ellman reaktifi ile tiyokolinin reaksiyon mekanizması	13
Şekil 2.14. AChE ile organofosfat pestisitleri arasındaki reaksiyon mekanizması	15
Şekil 2.15. Imidan Fosmet (O,O-dimetil S-ftalimidometil fosforoditiyoat) insektisitinin kimyasal formülü	16
Şekil 2.16. Vantex(Gama-sihalotrin) insektisitinin kimyasal formülü	17
Şekil 2.17. [4BoBPS-Sch-Pt(IV)] ve [4BoBPS-Sch-Pt(II)] nanopartiküllerinin sentezi	19
Şekil 2.18. Fibroin (a), AuNPs–fibroin (b), AChE (c), AChE–AuNPs– fibroin (d) yapılarının UV–GB spektrumları	20
Şekil 2.19. Agaroz jel (a), çemenotu tohumu (b).....	20

Şekil	Sayfa
Şekil 2.20. AChE'nin hidroliz reaksiyonunda oluşan H ⁺ 'un Tb(III) kompleksi ile olan reaksiyon mekanizması	22
Şekil 2.21. AChE immobilize mikro küre-hidrojel kompoziti sentezinin şematik gösterimi	22
Şekil 2.22. Gözenekli silikon yüzey ve enzim-immobilize gözenekli silikon yüzeye ait FT-IR spektrumu(a), dalga boyu-floresans yoğunluğu grafiği(b).....	23
Şekil 2.23. Ag nanopartikülleri kullanarak organofosfat pestisitleri için AChE immobilizasyonun şematik gösterimi.....	24
Şekil 2.24. AChE immobilizasyonu için kullanılan metotların şematik gösterimi.....	25
Şekil 3.1. (2AEPS-SalBr) polimerinin sentezine ait reaksiyon mekanizması	31
Şekil 3.2. (2AEPS-SalBr-Pd) polimerinin sentezine ait reaksiyon mekanizması.....	31
Şekil 4.1. tris(2-aminoetil)amin[polimer bağlı] ait FT-IR spektrumu	38
Şekil 4.2. (2AEPS-SalBr) polimerinin öngörülen yapısı	39
Şekil 4.3. (2AEPS-SalBr) polimerine ait FT-IR spektrumu	40
Şekil 4.4. (2AEPS-SalBr) polimerinin EDX spektrumu.....	41
Şekil 4.5. (2AEPS-SalBr-Pd) polimerinin öngörülen yapısı	42
Şekil 4.6. (2AEPS-SalBr-Pd) polimerine ait FT-IR spektrumu.....	42
Şekil 4.7. (2AEPS-SalBr-Pd) polimerinin EDX spektrumu	43
Şekil 4.8. Enzim aktifliğine pH etkisi: Serbest AChE (a), (2AEPS-SalBr) polimerine (b) ve (2AEPS-SalBr-Pd) polimerine (c) immobilize edilen AChE	44
Şekil 4.9. Enzim aktifliğine sıcaklık etkisi: Serbest AChE (a), (2AEPS-SalBr) polimerine (b) ve (2AEPS-SalBr-Pd) polimerine(c) immobilize edilen AChE	45
Şekil 4.10. AChE'nin aktifliğine substrat derişiminin etkisi: serbest AChE ve (2AEPS-SalBr) kodlu polimere immobilize AChE (a), serbest AChE ve (2AEPS-SalBr-Pd) kodlu polimere immobilize AChE (b).....	46
Şekil 4.11. İmmobilize edilen AChE'nin tekrar kullanılabilirliği: (2AEPS-SalBr) polimerine immobilize edilen AChE (a), (2AEPS-SalBr-Pd) polimerine immobilize edilen AChE (b)	47

Şekil	Sayfa
Şekil 4.12. İmmobilize AChE'in zamana bağlı gösterdiği bağlı aktiflik: (2AEPS-SalBr) polimerine immobilize AChE (a), (2AEPS-SalBr-Pd) polimerine immobilize edilen AChE (b)	48
Şekil 4.13. AChE'in bağlı aktifliği üzerine Imidan fosmet pestisitinin etkisi: (2AEPS-SalBr) polimerine immobilize AChE (a), (2AEPS-SalBr-Pd) polimerine immobilize (AChE) (b)	49
Şekil 4.14. AChE'in bağlı aktifliği üzerine Imidan fosmet pestisitinin etkisi: (2AEPS-SalBr) polimerine immobilize AChE (a), (2AEPS-SalBr-Pd) polimerine immobilize (AChE) (b)	50



RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. FH-A-AChE-GNPs membranlarındaki serbest ve immobilize Altın nanopartiküllerin TEM görüntüleri	21
Resim 2.2. GO(a), CGR(b), Pt NPs-CGR' ye ait SEM görüntüleri.....	21
Resim 4.1. Sentezlenen polimerlerin görüntüleri: a. (2AEPS-SalBr) b. (2AEPS-SalBr-Pd).....	37
Resim 4.2. (2AEPS-SalBr) polimerinin SEM (1000 ve 2000 büyütme) görüntüsü.....	40
Resim 4.3. (2AEPS-SalBr-Pd) polimerinin SEM (1000 ve 2000 büyütme) görüntüsü	43

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

BM	Bohr magneton
λ	Dalga boyu
$^{\circ}\text{C}$	Derece santigrat
e.n.	Erime noktası
ν	Frekans
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması
μ_{eff}	Manyetik moment
V_{mak}	Maksimum hız
K_m	<i>Michaelis-Menten</i> sabiti
mM	Milimolar
M_A	Molekül ağırlığı

Kısaltmalar

Açıklamalar

AChE	Asetilkolinesteraz
DTNB	5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
GBC	Jel Geçirgenlik Kromatografisi
Imidan Fosmet	O,O-dimetil S-ftalimidometil fosforoditiyoat
IR	Kızılötesi Spektroskopisi
SEM/EDX	Taramalı Elektron Mikroskobu / Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi
UV-GB	Ultraviyole - Görünür Bölge Spektroskopisi
Vantex	Siklopropankarboksilik asit, 3-(2-kloro-3,3,3-trifluoro-1-propenil)-2,2-dimetil, siyono(3-fenoksifenil)metil ester, [1R-[1 α (S*), 3 α (Z)]

1. GİRİŞ

Asetilkolinesteraz (AChE, EC:3.1.1.7), bir sinir taşıyıcısı olan asetilkolini hidrolize ederek sinir iletiminde yer alan bir enzimdir. Organofosfat ve piretroidler gibi pestisitler AChE'ı inhibe ederler. Bu inhibisyon AChE'nın aktif bölgesinde yer alan serin hidroksil grubuna pestisitlerin kovalent olarak bağlanması sonucunda gerçekleşir [1].

Tarım ve tarım dışı faaliyetlerde kullanılan pestisitlerin toprakta, suda ve havada birikerek hedef olmayan organizmalar için toksik etki göstermesi mümkün olmaktadır. Bu sebeple gıda örneklerinde pestisit tayini yapılabilmesi için AChE inhibisyonuna dayalı yöntemler geliştirilmektedir [2,3]. Bu yöntemlerden biri AChE'nın immobilizasyonudur.

Enzim immobilizasyonu enzimin bir desteğe fiziksel ya da kimyasal olarak bağlanarak hapsedilmesi ve bu sayede enzimin tekrar tekrar kullanılabilmesi, operasyonel şartlara (pH, sıcaklık vb.) karşı dayanıklı olması için gerçekleştirilen bir işlemdir.

Çevre ve tıp gibi alanlarda kullanılan nanopartiküllerin immobilizasyon çalışmalarında destek materyali olarak kullanımı giderek artmaktadır [4,5]. Yüzey alanlarının büyük olması, dayanıklılık ve biyouyumluluk gibi avantajlar nanopartiküllerin enzim immobilizasyonunda destek materyali olarak kullanılma sebeplerindendir [6].

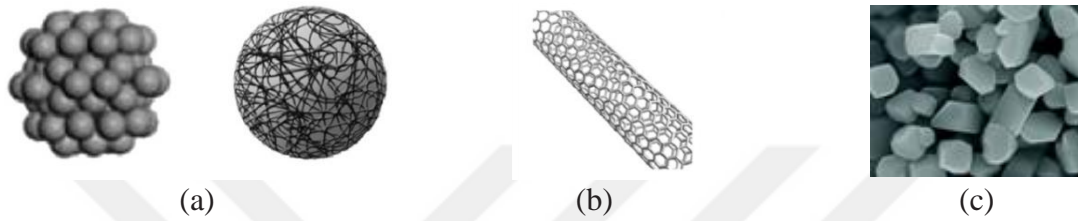
Sunulan tezde azometin ve azometin-Paladyum koordinasyon polimeri içeren nanopartiküller hazırlanmıştır. Tris(2-aminoetil)amin polimeri ile 5-brom-2-hidroksi benzaldehitin katılma ayrılma tepkimesi sonucunda azometin(Schiff bazı) içeren polimerik desteği (2AE-Sal-Br) sentezlenmiştir. Template metoduna göre azometin-Pd(II) koordinasyon polimeri; tris(2-aminoetil)amin polimeri, 5-brom-2-hidroksi benzaldehit ve PdCl₂'den yararlanılarak elde edilmiştir (2AE-Sal-Br-Pd). Sentezlenen desteklerin yapıları FT-IR, GPC, elementel analizi ve SEM/EDX ile aydınlatılmıştır.

Sentezlenen destek materyallerine Asetilkolinesteraz(AChE) enzimi immobilize edilmiştir. Serbest ve immobilize enzimin aktifliğine etki eden pH, sıcaklık, substrat konsantrasyonu, depolama süresi gibi parametrelerin etkisinin yanı sıra immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği araştırılmıştır. Imidan fosmet ve Vantex pestisitlerinin tayini, immobilize edilmiş AChE ile Ellman yöntemi kullanılarak spektroskopik yöntemle gerçekleştirilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

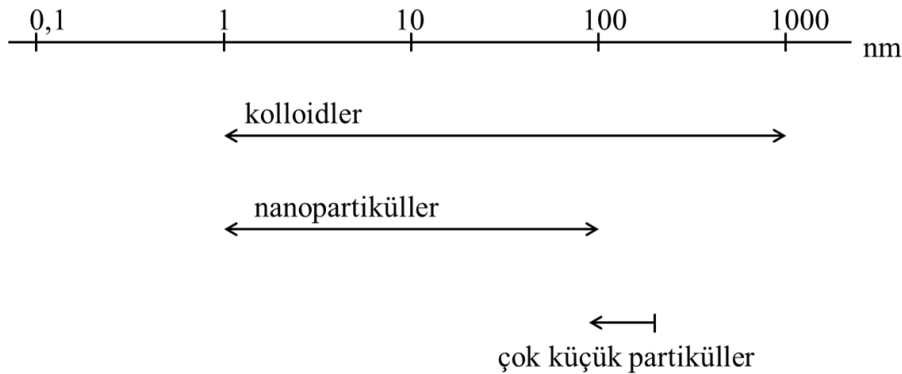
2.1. Nanopartikül Terimi ve Tarihi

Nanoteknoloji nanopartikülü 1-100 nm arasında büyüklüğe sahip olan ve eşsiz fiziksel özellik gösteren materyal olarak tanımlamaktadır. Bir nanopartikül; küresel (Şekil 2.1a), tüp (Şekil 2.1b) [7] biçiminde veya düzensiz şekilde (Şekil 2.1c) [8] olabilir:



Şekil 2.1. Farklı şekillere sahip nanopartiküller: a) nanoküreler b) nanotüp c) düzensiz şekilli

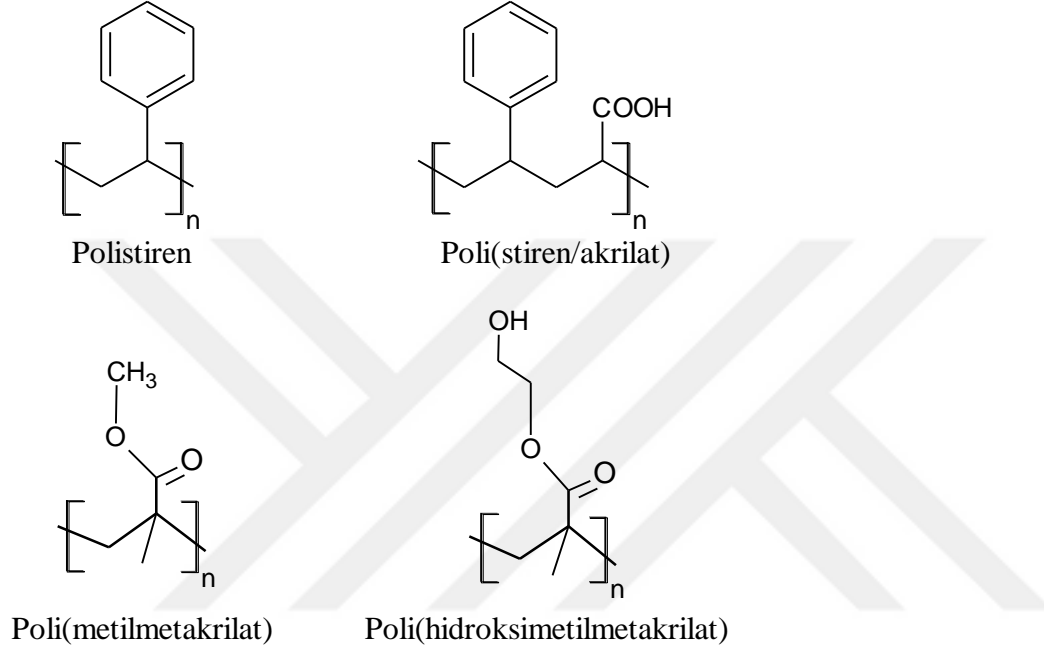
Aşağıdaki skalada bir nanopartikülün kolloid ve küçük partiküllere göre olan boyut karşılaştırması görülmektedir:



Şekil 2.2. Nanopartiküller ile kolloid ve çok küçük partiküllerin boyut karşılaştırması

Nanopartiküllerin yüzyıllar boyunca optik olayların (ışığın davranış ve özelliklerinin madde ile etkileşiminin incelenmesi) araştırılmasında kullanıldığı kaynaklardan görülmektedir[9]. Ayrıca, Romalıların camları renklendirmek için yine nanopartikülleri kullandığı bilinmektedir[10]. Antik Mısırlılar tarafından Altın nanopartiküllerin kozmetik olarak kullanıldığı, gümüş ve bakır nanopartiküllerin ise seramiklere metalik parlaklık vermek için kullanıldığı kaynaklarda belirtilmektedir [11].

Nanometre ve mikrometre çaplı partiküllerin çeşitli araştırma alanlarında kullanıldığı bilinmektedir. Nanopartiküllerin hazırlanmasında genel olarak, polistiren, poli(stiren/akrilat), poli(metilmetakrilat) ve poli(hidroksimetilmetakrilat) gibi polimerlerin kullanıldığı görülmektedir[12,13] (Şekil 2.3). Çünkü bu polimerlerin hidrofobik özelliğe sahip olması hazırlanan nanopartiküle bir avantaj sağlamaktadır[13].



Şekil 2.3. Nanopartikül yapısında kullanılan polimerlerden bazıları

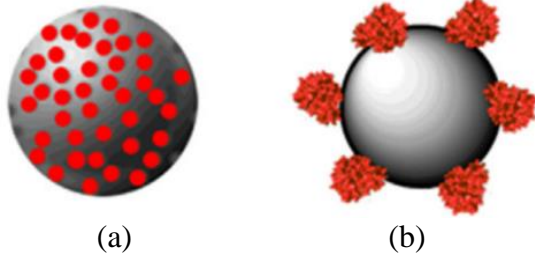
Nanopartiküller, yüksek mekanik mukavemet, oksijen iyon iletkenliği, biyouyumluluk ve biyolojik aktivitenin korunması gibi benzersiz özelliklerinden dolayı çok ilgi görmektedir [6].

Nanoteknoloji biyouyumlu yüzeylerin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır, bu katkı biyomoleküllerin immobilizasyonu sonucunda çevre mühendisliği [4], biyosensör ve tıp gibi [5] çeşitli alanlara uygulanmasıyla olmaktadır.

Nanopartiküller geniş yüzey alanlarından dolayı önemli adsorpsiyon kapasitesine sahiptirler. Bu nedenle kimyasal bileşik, ilaç ve protein gibi diğer molekülleri yüzeylerine kovalent bağlarla veya adsorpsiyonla bağlayabilir ya da taşıyabilirler[14].

Nanokürelerin ultra küçük hacimleri sayesinde en küçük kılcal damarları kolayca geçebilmeleri [15], uzun süre kan dolaşımında kalabilmeleri, hücrelere ve dokulara kolayca nüfuz edebilmeleri, kontrollü salım özelliği gösterebilmeleri, yüzeylerine ligand eklenerek tedavi edilmek istenilen bölgeye özgü hedefleme faydalarıyla ilaç iletim sistemlerinde kullanılabilir [16]. Ayrıca nanopartiküller ilaçların/proteinlerin ya da peptidlerin kararlılıklarının artmasına katkıda bulunurlar [17].

Günümüzdeki çalışmalara bakıldığında nanopartiküllerin biyokataliz uygulamalarında yaygın bir şekilde kullanıldığı görülmektedir. Özellikle enzimlerin katalitik aktifliğinin korunmasını sağlamak için çeşitli nanopartiküller geliştirilerek (Şekil 2.4) immobilizasyon çalışmalarının olduğu görülmektedir [18]. Nanokürelere immobilize edilen enzimlerin daha verimli, geri dönüşümü daha kolay, özellikle pahalı enzimlerin yeniden kullanımını sağlayacak önemli bir faktörü geliştirmek için çalışmaların ilerlediği görülmektedir [19,20].



Şekil 2.4. Nanokürelere immobilize edilen enzimlerin genel görünüşü: a) gözenekli silika b) manyetik nanopartikül [21]

Nanopartiküllerin karakterizasyonunda kullanılan bazı teknikler aşağıda verilmiştir:

- ⇒ Elektron Kırınımı, (boyut, fazlar hakkında bilgi, yapı ve bağ uzunlukları hakkında bilgi)
- ⇒ Taramalı ve Geçirgen Elektron Mikroskopları (SEM, TEM), (parçacıkların boyutu / şekli, dağılımı ve topoloji hakkında bilgi)
- ⇒ Taramalı Tünelleme Mikroskobu (STM), (parçacıkların boyut, şekil ve iç yapısının belirlenmesi)
- ⇒ Gaz adsorpsiyonu (yüzey alanı hakkında bilgi)
- ⇒ Fotoelektron Spektroskopisi (Elektronik yapının belirlenmesi)
- ⇒ İletkenlik (İletken bant, sızma ve topoloji hakkında bilgi)

2.2. Paladyum Kompleksleri ve Nanopartiküller

Paladyum komplekslerinin kataliz [22], optik [23], antibakteriyel ve antifungal [24] gibi farklı alanlarda uygulamaları vardır.

Kanser tedavisinde cis-platin kullanımından kaynaklanan yan etkilerin üstesinden gelebilmek için yeni metal bazlı ilaçlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Pt(II) ile aynı grupta yer alması ve komplekslerinin aynı geometriye sahip olması, daha düşük termodinamik kararlılık göstermesi Pd(II)'ye olan ilgiyi giderek artırmaktadır[25].

Pd(II) kompleksleri aynı zamanda antimikrobiyal ve antibakteriyel aktiviteye sahiptir. Carvalho ve diğerleri, Gram negatif(*Escherichia coli* ve *Pseudomonas aureus*) ve Gram pozitif(*Staphylococcus aureus*) bakteri türlerine karşı antibakteriyel etki gösteren L-triptofan amino asidin Pd(II) kompleksinin, $[Pd(trp)_2]$, etkili olduğunu ifade etmişlerdir [26].

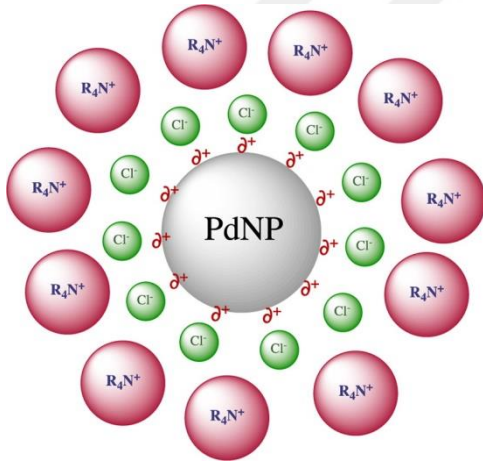
(S-alil-L-sistein sülfoksit) ile yeni suda çözünür Pd(II) kompleksi hazırlayarak *HeLa* hücreleri üzerindeki antitümör etkinliğini araştıran Abbehausen ve diğerleri, kompleksin kanser tedavisinde kullanılan cis-platine yakın bir etki gösterdiğini, ayrıca bu kompleksin Gram-pozitif ve Gram-negatif mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu da belirtmişlerdir [27].

İndirgenabilir kirleticilerin tehlikesiz formlara dönüştürülmesinde Pd nanopartiküllerinin kullanıldığı görülmektedir. Nitekim Cr(VI) kanserojen olarak bilinirken üç değerli krom tuzlarının toksik olmadığı bilinmektedir. Pd nanopartikülleri Cr(VI)'yı Cr(III)'e hızlıca indirgeme yönündeki kabiliyeti sayesinde çevre endüstrisinde kullanılmaktadır [28]. Ayrıca Paladyum nanopartiküllerin de tıpkı Au ve Ag nanopartiküllerinde olduğu gibi sulardaki kirliliklerin uzaklaştırılmasında kullanıldığı ifade edilmektedir [29].

Paladyum nanopartikülleri sentezlerin aktivasyon enerjisinin daha düşük olmasını sağladığı gibi, doymamış bileşiklerin hidrojenlenmesi ve alkollerin yükseltgenmesi gibi bazı organik reaksiyonların meydana gelmesinde de rol oynamaktadır. Paladyum nanopartiküller toksik ve pahalı olmadığı için organik reaksiyonlarda katalizör olarak kullanılması tercih edilmektedir [30].

Paladyum nanopartiküller, organik veya inorganik yapıdaki çeşitli destekler ile kombinasyon halinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Gözenekli polimerler arasına yerleştirilen Paladyum nanopartiküller, karbon ve oksit bazlı katalizörlerden daha iyi fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olduğundan önemli bir katalizör sınıfını oluşturmaktadır [31,32]. Polimer destekli Paladyum içerikli katalizörler kenetlenme ve hidrojenasyon reaksiyonlarında kayda değer performans göstermektedir [33].

Paladyum soy metali sanayi endüstrisinde (Heck ve Suzuki-Miyaura reaksiyonları gibi) geniş ölçüde kullanıldığı görülmektedir. Örneğin C-C bağlarının oluşumu için Paladyum nanopartiküllerinin yaygın olarak kullanılmasının nedeni elektrostatik ve sterik faktörlerin birlikte hareket etmesidir. Çünkü $PdCl_2$, tetra-*n*-alkil amonyum tuzu varlığında indirgenerek Paladyum nanopartiküllerini oluşturur. Şekil 2.5'te görüldüğü gibi nanopartikül, elektrostatik kararlılığı sağlayacak olan Cl^- iyonları tarafından sarılırken tetra-*n*-alkil amonyum katyonu sterik kararlılığa katkıda bulunur[30].



Şekil 2.5. Tetra-*n*-alkilamonyum tuzu varlığında $PdCl_2$ 'ün indirgenmesi ile edilen Pd nanopartikülleri

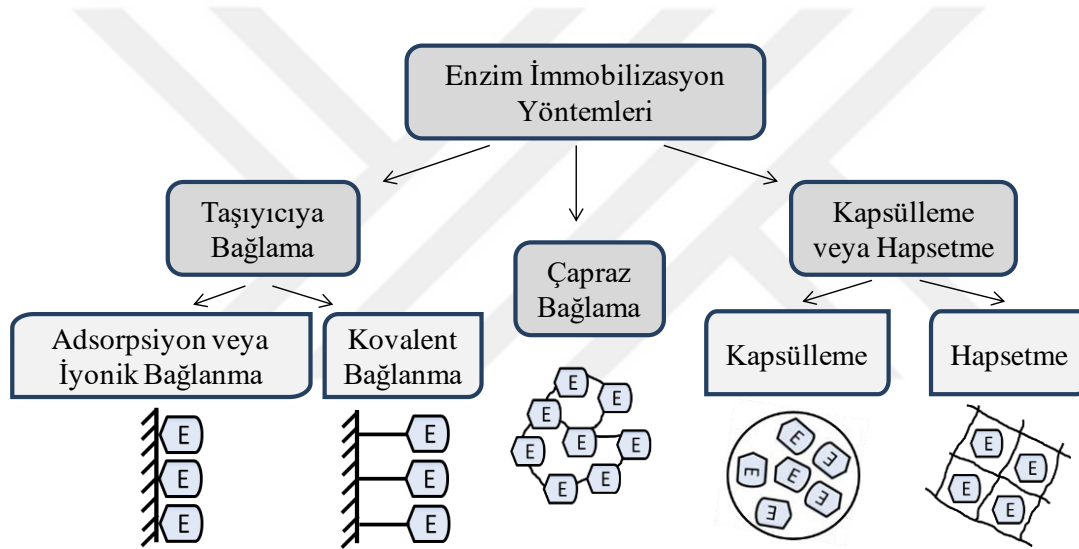
2.3. Enzim İmmobilizasyonu

İmmobilize enzim terimi “enzimlerin katalitik aktivitelerinin korunduğu, tekrar tekrar ve sürekli olarak kullanılabilirdiği belirli, tanımlanmış bir alana fiziksel olarak hapsedilmesi veya sınırlanması” anlamını taşımaktadır [34].

Enzimler çoğunlukla optimum koşullarda (oda sıcaklığı, nötr pH ve sulu ortam) çalışır. Fakat çoğu endüstriyel proses enzimlerin denatüre olduğu yüksek sıcaklık ve sert koşullarda çalışmayı gerektirir ki bu durum enzimde aktivite kaybına neden olur [21].

İmmobilize enzimlerin çözünür enzimlere göre kararlılığının yüksek olması ve reaksiyon ortamından kolayca ayrılabilmesi enzimin kullanımına yönelik önemli bir tasarruf sağlamaktadır [35].

Enzimler, çeşitli yöntemlerle immobilize edilebilir. İmmobilizasyon metotlarının sınıflandırılması aşağıdaki şekilde gösterilmiştir:



Şekil 2.6. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi

Adsorpsiyon nispeten basit ve ucuz bir metottur ve enzimi kimyasal olarak modifiye etmez, ancak özellikle sulu çözücüler içinde enzim sızıntı eğilimi gösterdiği için sınırlamalar vardır [36].

Hapsetme veya kapsülleme, enzimin bir polimer ağına hapsedilmesidir. Bunun için organik polimer, silika sol-jel, oyuk bir fiber veya mikrokapsül membran kullanılabilir. İlave kovalent bağlanma gereklidir. Hapsetme, enzim varlığında bir polimerik ağın sentezini gerektirir. Çapraz bağlı enzimlerin aktivitenin düşük tutulması, zayıf tekrar üretilebilirlik, düşük mekanik stabilite ve jelatinimsi çapraz bağlı enzimlerin kullanımındaki zorluklar gibi çeşitli dezavantajları vardır. Taşıyıcı içermeyen makropartikülleri hazırlamak için çapraz bağlı enzim agregatları veya bifonksiyonel reaktif kristalleri kullanılır [37].

Fiziksel bağlanma endüstriyel şartlar altında enzimin taşıyıcıya sabit tutulması için genellikle çok zayıf olarak bilinir. İyonik bağlanma genellikle daha güçlüdür ve kovalent bağlanma daha da kuvvetlidir [37].

Enzim immobilizasyonunda enzimin kararlılığına ve kinetiğine etkili olduğu için kullanılan destek materyalinin önemli olduğu bilinmektedir. İdeal destek materyali özellikleri arasında, basınca karşı fiziksel direnç, hidrofilitiklik, enzimlere karşı inertlik, türevlendirmenin kolaylığı, biyolojik uyumluluk, mikrobiyal saldırıya karşı direnç ve düşük maliyetli olma bulunur [38].

Enzim immobilizasyonunda polimerik malzemeler büyük yüzey / hacim oranı sayesinde oldukça kullanışlıdır. Katalizörün aktif yüzey alanının önemli bir rol oynadığı enzimatik olmayan heterojen katalizöre benzer olarak, desteğin aktif yüzey alanı, bir immobilize enzim sistemi ile katalizör etkinliğini önemli ölçüde etkiler. Geniş aktif yüzey alanı elde etmek için, daha küçük çapta parçacık gereklidir.

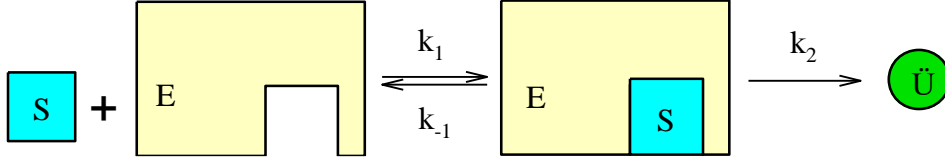
Biyokatalizörlerin operasyonel kararlılığını arttırmak için enzimlerin polimerik platformlara immobilizasyonu en faydalı yöntemdir. Enzimle birden çok noktada etkileşim oluşturabilecek bir destek kullanarak polimerik desteğe immobilize edilen enzimin kararlılığını arttırmak mümkün olabilir[39].

Sentetik polimerler enzim immobilizasyonunda destek materyali olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Çünkü mekanik kararlılığa sahip olduğu gibi bakteriyel saldırılara karşı da daha kararlıdır [40]. Son zamanlarda polimer mikroküre, fiber, tüp, aynı zamanda metal ve manyetik nanopartiküller gibi nano boyuttaki desteklere enzim immobilizasyonu rapor edilmektedir [20].

Enzimler nano desteklere immobilize edildiğinde, "üç boyutlu enzim immobilizasyonu" sayesinde sert koşullara karşı (ısı ve organik çözücüler gibi) büyük ölçüde kararlı olurlar. Üç boyutlu enzim immobilizasyonunda, polar ve hidrofobik etkileşimler ile van der Waals kuvvetleri sayesinde enzimin birden çok noktasından bağlanması mümkündür [41].

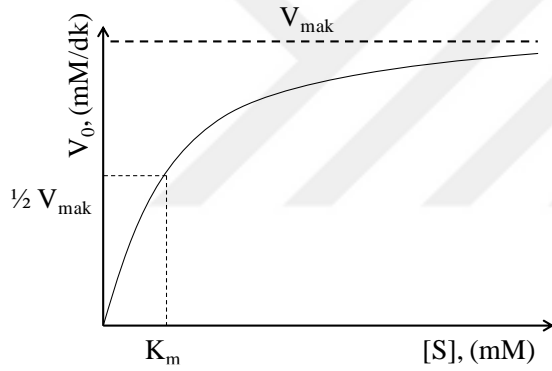
2.4. Enzim Kinetiği

Enzimatik reaksiyonların hızları ve reaksiyon parametrelerindeki değişimin reaksiyon hızına etkisi enzim kinetiği ile incelenir.



Şekil 2.7. Enzimatik bir reaksiyonun şematik gösterimi

k_1 hız sabiti k_2 'ye göre çok yüksek olduğundan ve enzimatik tepkimenin hızını, k_2 hız sabitine göre belirlenir.



Şekil 2.8. Michaelis-Menten grafiği (V_{mak} : maksimum hız, K_m : Michaelis-Menten sabiti)

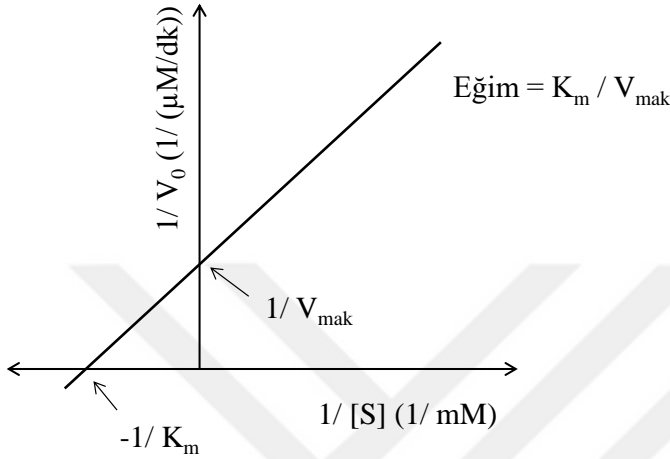
Artan substrat konsantrasyonuyla reaksiyon hızı başlangıçta doğrusal bir şekilde artarken, enzim substrata doymaya başladıkça reaksiyon hızı substrat konsantrasyonuna paralel olarak artış göstermez[42].

$$V_0 = \frac{V_{mak} \times [S]}{K_m + [S]} \quad K_m = \frac{(k_1 + k_2)}{k_1} \quad (2.1)$$

Michaelis-Menten eşitliği (2.1), deneysel verilerin daha kolay çizilebilmesi için eşitliğin her iki tarafı da ters çevrilerek *Lineweaver-Burk* eşitliği (2.2) elde edilir.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\text{mak}} \times [S]} + \frac{1}{V_{\text{mak}}} \quad (2.2)$$

Lineweaver-Burk eşitliğinden yararlanılarak elde edilen grafik yardımıyla K_m ve V_{mak} değerleri bulunur[43].



Şekil 2.9. Lineweaver-Burk grafiği

2.5. Asetilkolinesteraz (AChE) Enzimi

Kolinesterazlar; kolinerjik nöronun restorasyonu için gerekli olan asetilkolinin, kolin ve asetik asite hidrolizini katalizleyen bir enzim ailesidir[44]. Böceklerde ve omurgalılarda bulunan kolinesterazların iki tipi vardır: Asetilkolinesteraz (E.C. 3.1.1.7) ve bütirilkolinesteraz (E.C.3.1.1.8). Ağırlıklı olarak kolin esterlerini hidrolize eden spesifik asetilkolinesteraz beyin, sinir ve kırmızı kan hücrelerinde yüksek konsantrasyonda bulunurken, spesifik olmayan “pseudo” kolinesteraz olarak da bilinen ve kan serumunda, pankreasta, karaciğerde ve merkezi sinir sisteminde bulunan bütirilkolinesteraz, diğer esterleri ve kolin esterlerini hidrolize eder[45,46].

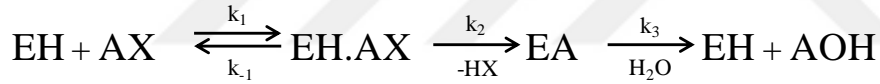
AChE’nin aktivitesindeki azalma sinir sistemi rahatsızlıklarına ve ölüme neden olur [47]. Asetilkolinesteraz, yaygın olarak kullanılan organofosfat pestisitleri tarafından inhibe edilir [48].

AChE ilk defa 1938 yılında elektrik balığının (*Torpedo marmorata*) elektrik organından ekstraksiyon yoluyla saflaştırılmıştır [49].



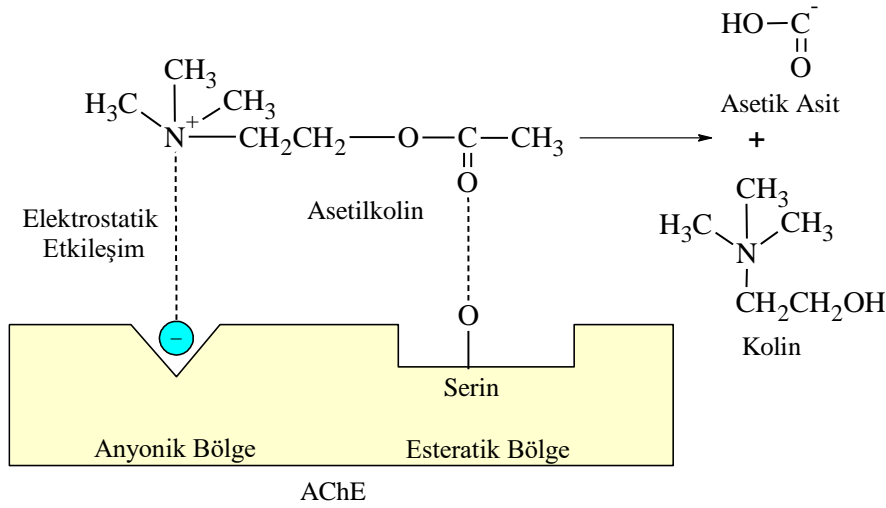
Şekil 2.10. Elektrikli yılan balığından(*Torpedo marmorata*) ekstrakte edilen AChE'in kurdele yapısı [50]

Şekil 2.11'deki reaksiyonda görüldüğü gibi asetilkolin (AX) hidrolizinde, enzim-substrat kompleksi (EH.AX) oluşuktan sonra kolin (HX) molekülü açığa çıkar. Daha sonra asetik asit (AOH) ile hidrolizlenecek asetillenmiş enzim (EA) oluşumunun ardından enzim serbest hale döner. Asetilkolin ile olan tepkimelerde k_2 ve k_3 oldukça büyük olup tüm tepkime çok hızlı meydana gelir ve enzim rejenere edilerek serbest hale geri döner [49].



Şekil 2.11. Asetilkolinesterazın asetilkolin ile reaksiyonun şematik gösterimi

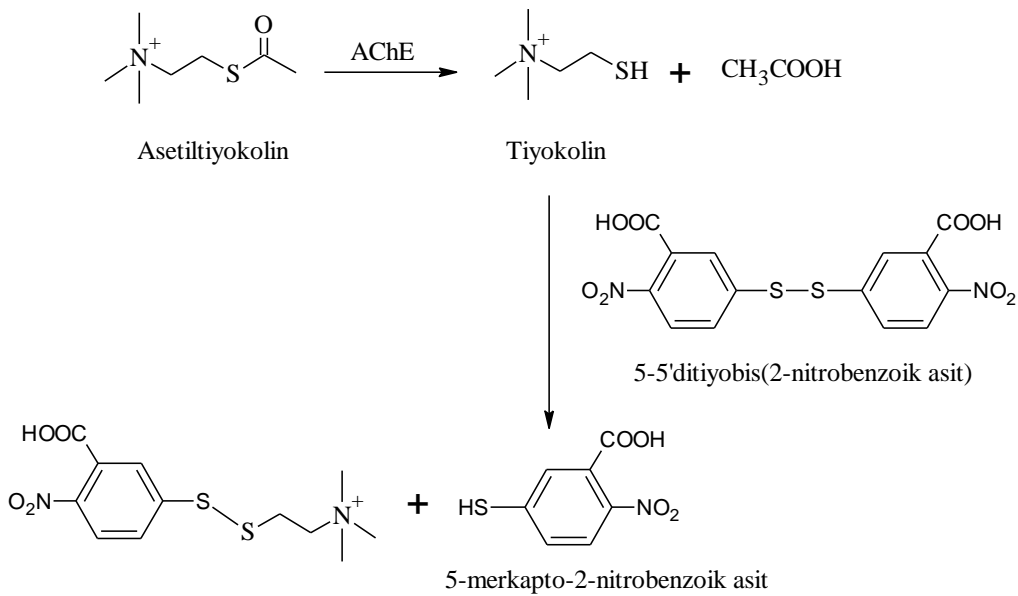
Asetilkolinesterazın aktif bölgesi 20 Å uzunluğundaki derin, dar ve elektronegatif bir geçitte bulunur [51]. Aktif merkez esteratik ve anyonik olmak üzere iki ana alt birimden oluşmaktadır (Şekil 2.12). Katyonik ligandlar ile AChE'in bağlanma hızına katkıda bulunan önemli faktör elektrostatik etkileşimdir [52]. Anyonik bölge asetilkoline bağlandığında asetilkolindeki ester bağı enzimin esteratik bölgesiyle etkileşir ve esteratik bölgedeki serin kalıntısına bağlanır [53].



Şekil 2.12. AChE ile asetilkolinin reaksiyon mekanizması [54]

2.6. Ellman Metodu

Spektroskopik yöntem, enzim aktivitesinin ölçümünde kullanılan yöntemlerden biridir. Asetilkolinesteraz enziminin aktivitesi Ellman yöntemi ile spektroskopik olarak tayin edilebilir. Bu yöntem substrat olarak asetiltiyokolin kullanılmasıyla reaksiyon sonucunda oluşan tiyokolinin DTNB [5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)] reaktifi ile tepkimesiyle oluşan sarı renkli 5-merkapto-2-nitrobenzoik asitin pH 8'de UV-GB spektrofotometrede 412 nm'de absorbansının okunması esasına dayanır[55].



Şekil 2.13. Ellman reaktifi ile asetiltiyokolinin reaksiyon mekanizması

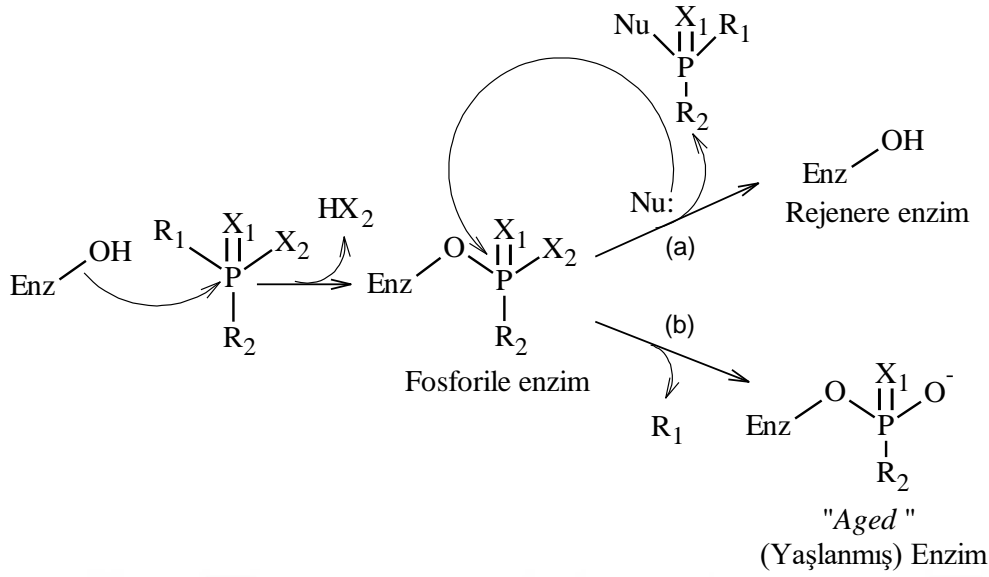
2.7. Organofosfatlı Pestisitler

Pestisitler tarımda yaygın olarak kullanılmaktadır. Pestisitler, suda çözünebilirliklerine bağlı olarak ya toprakta kalır ya da yüzey ve yeraltı sularına karışır. Pestisit bozunumuyla oluşan bileşikler; bitkilerde, hayvanlarda ve su kaynaklarında kalıcı olabilir ve besin zincirinde yukarı hareket ettikçe daha konsantre olurlar [56]. Ancak bu bileşiklerin çoğu son derece toksik, çoğunluğu insan sağlığı ve çevre için zararlıdır.

Organofosfatlı pestisitler ilk olarak 1800'lerde sentezlenmiş ve 1930'larda kolinerjik etkileri tanımlanarak böcek öldürücü özellikleri keşfedilmiştir [57]. Organofosfatlar, fosfor içeren asitlerin ester, tiol ester veya anhidrit türevleri olup tarımda, evlerde, bahçelerde ve veterinerlikte kullanılmaktadır. Organofosfat insektisitleri yüksek toksitede olan ve AChE inhibisyonu vasıtasıyla merkezi sinir sistemine zarar verebilen önemli bir agrokimyasal sınıftadır.

Organofosfat pestisitleri güneş ışığı, hava ve toprakta hidroliz olarak hızlıca bozunurlar. Organoklorlu pestisitlere göre daha hızlı bozulmalarına rağmen, organofosfatlar çok yüksek toksiteye sahiptirler [58]. Organofosfatlı pestisitlerin yaygın olarak kullanımı çevre ve gıda güvenliği açısından sorunlara yol açmaktadır. AChE'ı geri dönüşümsüz olarak inhibe eden organofosfat pestisitleri ACh'nin yıkımını engelleyerek sinapslarda asetilkolin birikimine ve aşırı uyarılmış merkezi sinir sistemine [59], duyuşsal ve davranışsal bozukluklara, koordinasyon bozukluğuna, motor fonksiyonlarının baskılanmasına ve solunum yetmezliğine yol açarlar.

Organofosfat insektisitlerinin toksik etkisi, AChE enziminin aktif bölgesindeki serin hidroksil grubuyla etkileşmesi sonucunda meydana gelir. Bu durumda enzim inhibe olur [47].



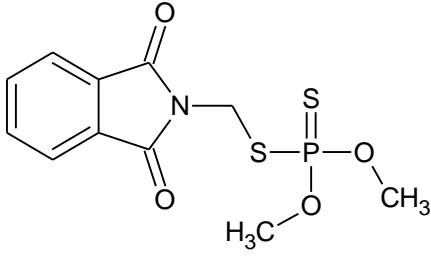
Şekil 2.14. AChE ile organofosfat pestisitleri arasındaki reaksiyon mekanizması

Şekil 2.14'te şematize edildiği gibi AChE ve organofosfat reaksiyonu sonucunda oluşan fosforillenmiş enzim, oksim gibi bir nükleofilik reaktif ile reaksiyona girerse (a), enzim organofosfat-oksim kompleksinin ayrılmasıyla rejenere olur. Fakat nükleofilik bir reaktif ile reaksiyona girmezse (b), dealkilasyon sonucunda enzim "aged" (yaşlanmış) enzim olarak adlandırılan geri dönüşümü olmayan bir forma dönüşür [60].

2.7.1. Tez çalışmasında kullanılan organofosfatlı pestisit

Imidan Fosmet organofosfat insektisitlerinin organotiyofosfat altgrubuna aittir. Imidan Fosmet; meyve ve fındık ağaçları, yaban mersini, tarla ve sebze bitkileri gibi karasal bitkilerdeki böcek, güve, bit, sinek ve kene gibi çeşitli zararlıları kontrol etmek amacıyla hem tarımda hem de tarım dışı faaliyetlerde kullanılmaktadır[61].

Imidan Fosmet erime noktası 66-69°C olan pembe ile beyaz renk aralığında olabilen kristalin bir katıdır. Fosmet düşük buhar basıncına sahip olup suda az çözünmesine rağmen aseton, kloroform ve ksilende daha iyi çözünür[60]. Imidan Fosmet alkalın ve nötr koşullar altında daha az, asidik koşullar altında daha hızlı hidroliz olur[62].



Şekil 2.15. Imidan Fosmet (O,O-dimetil S-ftalimidometil fosforoditiyoat) insektisitinin kimyasal formülü (Molekül Formülü: $C_{11}H_{12}NO_4PS_2$, $M_A:317.314$ g/mol)

Akut oral maruziyette fosmet tatlı su balıkları, bal arıları ve omurgasız canlılar için çok toksiktir, memelilerde yetişkin vücut ağırlığını, doğurganlığı ve yavru vücut ağırlığını azaltır[62]. Fosmete ağız ve deri yoluyla maruz kalma sonucunda kolinesteraz aktivitesi inhibe olur. Test hayvanlarında uzun süreli maruziyet sonucunda sarsıntı, salya çıkarma, dengesiz yürüyüş, havale ve aktivite azalması gibi kolinesteraz inhibisyonuyla ilişkili klinik bulgular bulunmuştur[61].

2.8. Piretrin ve Piretroid Pestisitleri

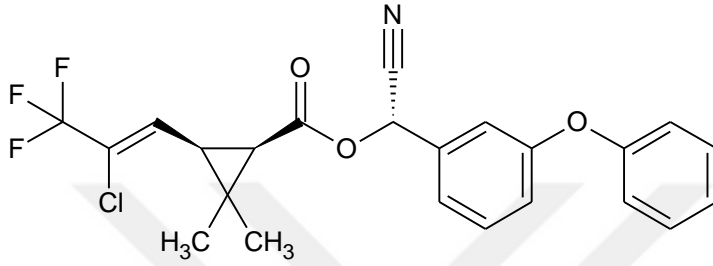
Piretrinler ve piretroidler tarımda ve tarım dışı faaliyetlerde (sivrisinek kontrolü, evsel faaliyetler vb.) kullanılan bir insektisit grubudur. Memelilere ve kuşlara daha toksik olan organofosfat pestisitleri kullanımının azalmasıyla piretrin ve piretroid pestisitleri kullanımı artmıştır[63].

Piretrinler, Avustralya ve Afrika'da sık görülen krizantem çiçeklerinden türetilen botanik böcek öldürücülerdir. Hedef böcek zararlılarında felce neden olan ve sonunda ölümlü sonuçlanan sinir işlevini değiştirerek çalışırlar[63].

Sentetik bir insektisit olan piretroidler, piretrinlere benzer ancak çevre şartlarında kararlılıklarını artırmak için modifiye edilirler. Tarım, ev ve bahçelerde yaygın olarak kullanılır. Organofosfatlı insektisitlerin kullanımının azalmasıyla bu maddelerin kullanımı giderek artmaktadır[64]. Özellikle piretroidler yüzey suyu alanlarının yakınında uygulandığında su zehirliliği riski oluşturabilirler[65].

2.8.1. Tez çalışmasında kullanılan piretroid pestisiti

Suda çözünmeyen renksiz bir katı olan Vantex (Etken maddesi: Gama-sihalotrin, siklopropankarboksilik asit, 3-(2-kloro-3,3,3-trifluoro-1-propenil)-2,2-dimetil, siyano(3-fenoksifenil)metil ester, [1R- [1 α (S*),3 α (Z)]]-), geniş spektrumlu bir insektisit olarak kullanılır. Gamma-sihalotrin, oral ve dermal yollarla orta derecede toksiktir.



Şekil 2.16. Vantex(Gama-sihalotrin) insektisitinin kimyasal formülü (Molekül Formülü: $C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$, M_A : 449,856 g/mol)

Bal arıları ve birçok suda yaşayan organizma için oldukça toksik, kuşlara ve solucanlara karşı orta düzeyde toksiktir. Gama-sihalotrin (GCH) gibi piretroidler suda yaşayan organizmalara karşı yüksek ve istenmeyen toksisiteye sahip insektisitlerdir[65].

Gama-sihalotrin (GCH), sentetik piretroidlerin [sihalotrin (CH) ve lambda-sihalotrin (LCH)] tek, çözülmüş bir enantiyomeridir ve bu kimyasal sınıftaki diğer insektisitlerle aynı nörotoksik etkiyi paylaşır[66].

Lambda-sihalotrin konsantrasyonunun yaklaşık yarısında Gama-sihalotrininin benzer etkilere neden olduğu toksisite testleri ile ortaya konulmuştur. Biyolojik aktivitenin lambda-sihalotrinin yaklaşık iki katı olması Gama-sihalotrin için uygulama oranlarını daha düşük tutmaktadır, bu nedenle her iki insektisit için toksisite riskinin aynı olduğu belirtilmektedir[67].

2.9. İmmobilize AChE ile Pestisit Tayini

Sıvı ve gaz kromatografi metotları pestisit kalıntısını ölçmede kullanılmasına rağmen, zaman alıcı olmaları, kapsamlı örnek hazırlama prosedürleri, pahalı cihazlara ve teknik

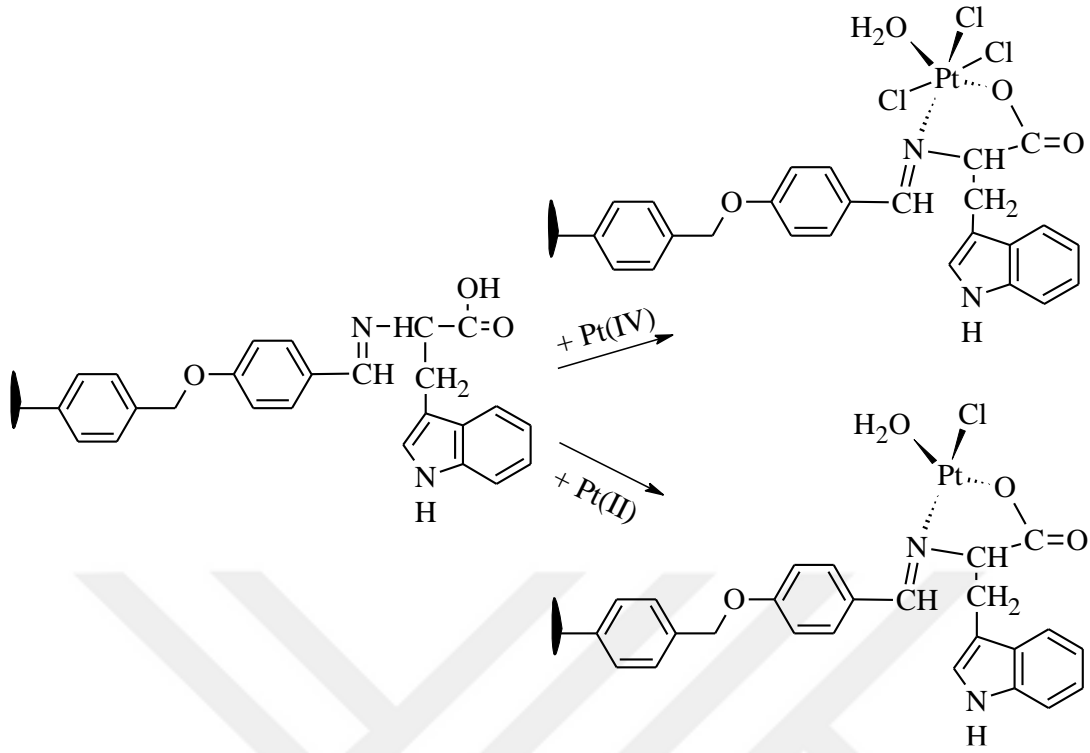
uzmanlığa gereksinim duymalarının yanı sıra pestisitlerin anti-kolinesteraz aktiviteleri konusunda herhangi bir bilgi vermezler [68].

Biyolojik bileşiklere dayalı analitik teknikler pestisit tayininde basit bir alternatif sağlamaktadır. Çünkü örnek ayırma ve temizleme basamakları olmadan direkt analiz mümkün olabilir. Özel biyoreaktif tek bir bileşiği ya da yakından ilişkili olduğu bir grup bileşiği potansiyel olarak tespit edebilir [68]. Pestisit tespiti için biyolojik sensörler geliştirmek için çeşitli enzimler kullanılabilirken, yüksek özgünlük ile hızlı toksisite taramasının yapılması gerektiğinde asetilkolinesteraz (AChE) enzimi tercih edilir [69]. AChE, nörotoksik ajanların birkaç $\mu\text{g/L}$ 'siyle inhibe olabildiğinden oldukça duyarlı biyolojik tanıma elemanı olarak kullanılmaktadır [70].

Son yıllarda asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi inhibisyonuna dayalı çeşitli teknikler düşük maliyet, kolay kullanım, hızlı cevap ve yüksek hassasiyetlerinden dolayı pestisit tayininde araştırmacıların ilgisini çekmektedir [2].

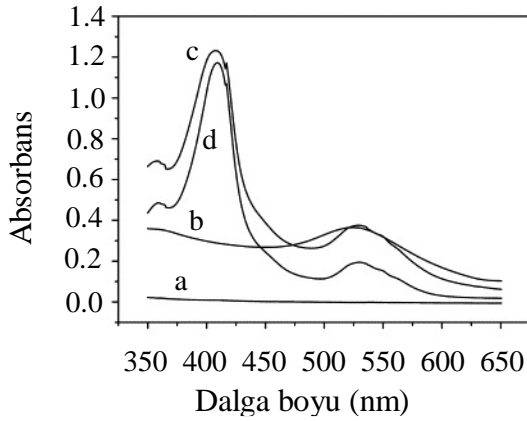
2.10. Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine Yapılan Çalışmalar

Özkan ve diğerleri pestisit tespitinde kullanmak üzere, Pt(II) ve Pt(IV) takılı nanopartikülleri kalıp metoduna göre hazırladıktan sonra AChE enzimini hazırlanan nanopartiküllere immobilize etmişlerdir (Şekil 2.11). İmmobilize AChE'nin yüksek tekrar kullanılabilirlik ve uzun depolama kapasitesi gösterdiğini ayrıca karbaril pestisiti tespitinde başarı ile kullanılabileceğini belirtmişlerdir [71].



Şekil 2.17. [4BoBPS-Sch-Pt(IV)] ve [4BoBPS-Sch-Pt(II)] nanopartiküllerinin sentezi

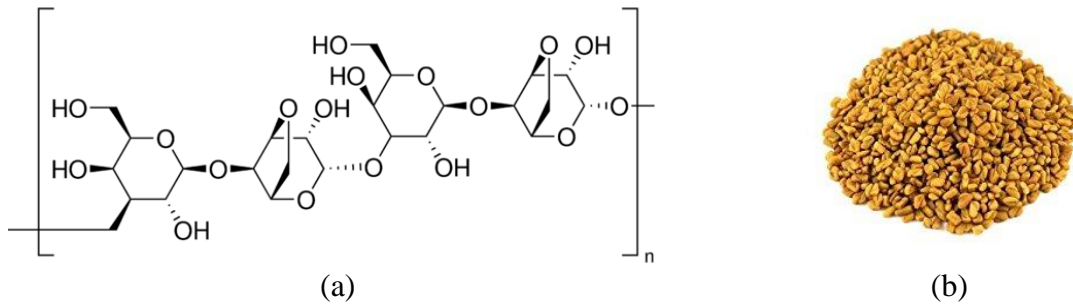
Yin ve diğerleri metil paraokson, karbofuran, ve foksim pestisitlerinin tayini için asetilkolinesteraz (AChE) enzimini, altın nanopartikül (AuNPs) ve ipek böceği kozasından ekstrakte edilen doğal bir protein olan fibroinle modifiye edilmiş platin elektrot üzerine immobilize ederek yeni ve kararlı bir amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Araştırmaların sonucunda metil paraokson için $2 \times 10^{-9} \text{M}$, karbofuran için $1 \times 10^{-10} \text{M}$, foksim için $2 \times 10^{-9} \text{M}$ 'lık bir tayin limitinin olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, araştırmacılara göre ipek fibroin; enzimin aktivitesinin korunmasında ve biyoyoumlu mikro çevre sağlanmasında etkili olduğu gibi, enzimin platin elektrot yüzeyinden sızmasını da engellemiştir. Altın nanopartiküller (AuNPs), çalışılan proteinler için tıpkı doğal sistemlere benzeyen bir çevre sağlayıp proteinin yalıtkan özelliğini azaltarak elektron transferini kolaylaştırmıştır.



Şekil 2.18. Fibroin (a), AuNPs-fibroin (b), AChE (c), AChE-AuNPs- fibroin (d) yapılarının UV-GB spektrumları

Araştırmacılar, UV-GB spektrumunda görüldüğü gibi serbest AChE'in 406 nm'de maksimum absorbans bandı gösterdiğini(c), hazırlanan desteğe (AChE-AuNPs-fibroin) immobilize edilen AChE'in ise 407 nm'de maksimum absorbans bandı gösterdiğini(d), böylece AChE'in kimyasal çevresinin ve yapısının korunarak aktifliğini sürdürdüğünü ifade etmişlerdir [72].

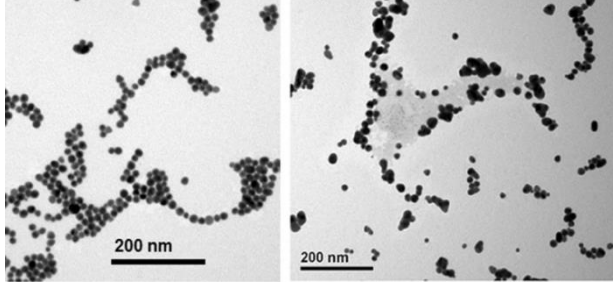
Kestwal ve diğerleri gıda örneklerindeki pestisit tayini için agoroz jel ve öğütülmüş çemenotu tohumundan (Şekil 2.19) hazırlanan membran ile AChE enzimi immobilize edilmiş altın nanopartiküllerin karışımından oluşan matriksten faydalanarak bir biyosensör tasarlamışlardır.



Şekil 2.19. Agoroz jel (a), çemenotu tohumu (b)

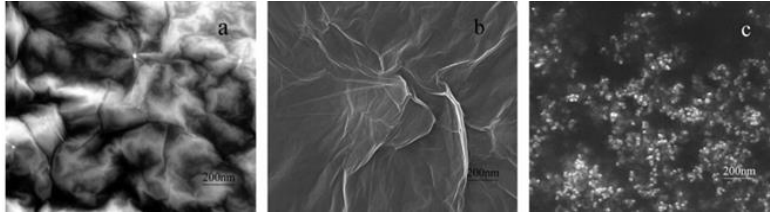
%92 oranında AChE'in hazırlanan membrana tutunduğunu ifade eden araştırmacılar, enzim aktifliğinin 55 gün boyunca korunduğunu belirtmişlerdir. Hazırlanan matrikstekki altın nanopartiküllerin (10-20 nm çaplı) membran içerisine eşit olarak dağıldığını TEM görüntüleri analizlerine dayandırarak açıklamışlardır (Şekil 2.20). Araştırmacılar

hazırladıkları biyosensör aracılığıyla, karbofuran, oksamil, metomil ve karbaril karbamatları için sırasıyla 2, 21, 113 ve 236 nM olarak tayin limitini tespit etmiştir [3].



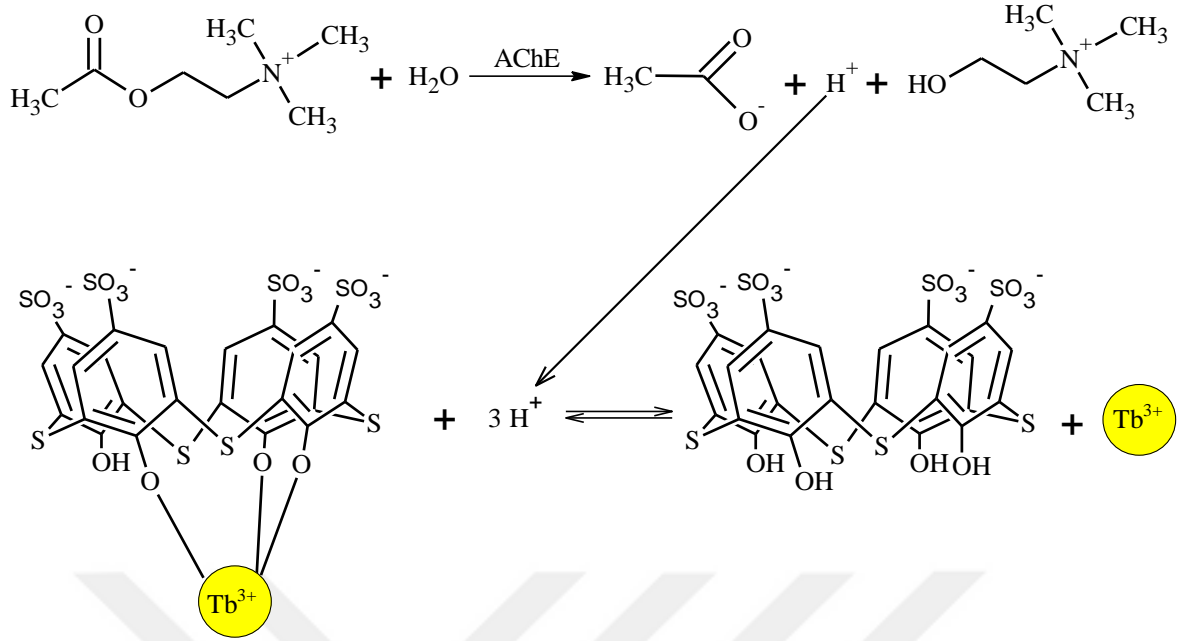
Resim 2.1. FH-A-AChE-GNPs membranlarındaki serbest ve immobilize Altın nanopartiküllerin TEM görüntüleri

Yang ve diğerleri Platin nanopartikül (Pt NPs), karboksilik grafen (CGR) ve nasyon membran ile modifiye edilmiş camı karbon elektrotu (GCE) hazırladıktan sonra, AChE enzimini kitosan ile çapraz bağ aracılığıyla elektrot yüzeyine immobilize etmişlerdir (Şekil 2.21). Araştırmacılar, (Pt NPs–CGR–NF) nanokompozitin mükemmel iletkenlik, kataliz ve biyoyumlu olması sayesinde AChE immobilizasyonu için iyi bir hidrofilik yüzey oluşturduğunu ifade etmişlerdir [73].



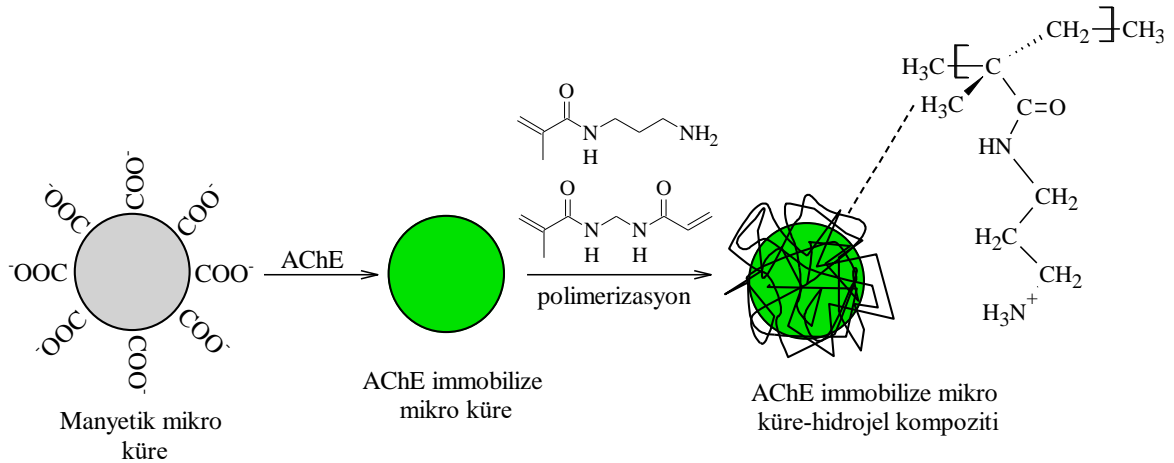
Resim 2.2. GO(a), CGR(b), Pt NPs-CGR(c)' ye ait SEM görüntüleri

AChE'in hidrolizi sonucunda oluşan asetik asite duyarlı silika nanopartiküllere yüklenen Tb(III)'ün p-sülfanato-thiakaliksaren kompleksini hazırlayan *Mukhametshina* ve diğerleri Tb(III) komplekslerinin protonlanması sayesinde AChE'in hidroliz reaksiyonunu takip edebildiklerini ifade etmişlerdir. *Mukhametshina* ve diğerleri aşağıdaki gibi bir mekanizmayı öne sürmüşlerdir [74].



Şekil 2.20. AChE'in hidroliz reaksiyonunda oluşan H⁺ 'un Tb(III) kompleksi ile olan reaksiyon mekanizması

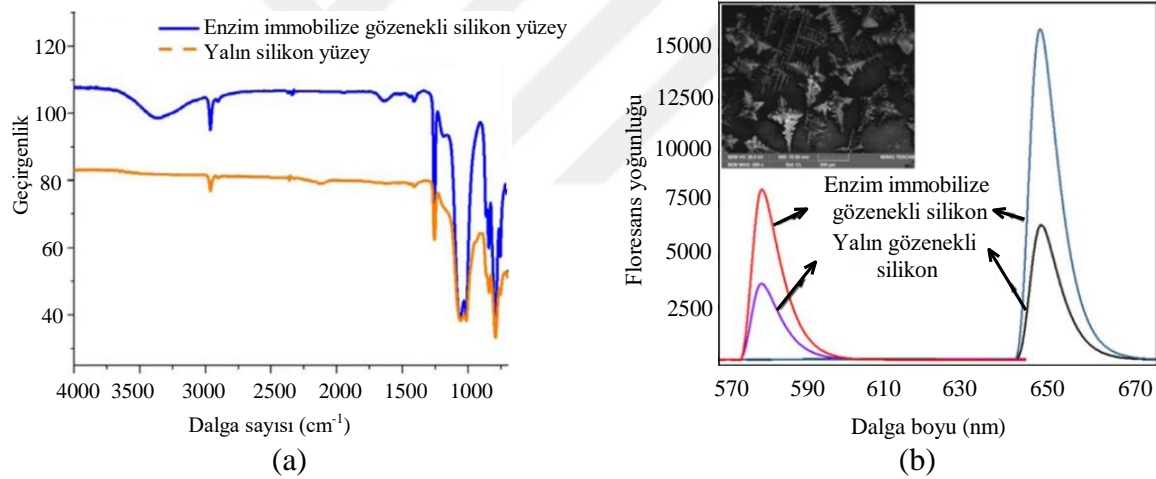
Shriver-Lake ve diğerleri, floresan özellik gösteren karboksilli polistirenden hazırlanmış mikro kürelere AChE immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra bu kürelere poli(N-(3-aminopropilmetakrilamid)) hidrojelini içine kapsüllemişlerdir. Böylece destek materyalin yapısında aminli bir yapının da olmasına imkan sağlamışlardır. Bu durumun immobilize AChE'in daha yüksek sıcaklıklarda maksimum aktivite gösterdiğini ifade eden *Shriver-Lake* ve diğerleri hidrojel yapıdaki immobilize AChE'in hidrojel ile kapsüllemeyen immobilize AChE'a göre $1,78 \times 10^4$ kat, serbest AChE'a göre ise $4,34 \times 10^4$ kat katalitik aktifliğe sahip olduğunu belirtmişlerdir [75].



Şekil 2.21. AChE immobilize mikro küre-hidrojel kompoziti sentezinin şematik gösterimi

Saleem ve diğeri adsorbsiyonla AChE'ı immobilize ederek hem kararlılığının daha iyi olması ve hem de reaksiyon ortamından kolayca ayrılabilmesi için gözenekli silikon yüzeyinden faydalanmışlardır. Karakterizasyon için FT-IR spektrumundan faydalanmışlardır (Şekil 2.24a). IR spektrumları karşılaştırıldığında gözenekli silikon desteğine immobilize edilen enzimin varlığını, 3364 cm^{-1} 'de görülen yeni ve geniş bir bandın ortaya çıkmasıyla kanıtlamışlardır. Bu geniş bandın AChE'in yapısında bulunan hidroksil gruplarından kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir. Ayrıca 2962 cm^{-1} 'deki C-H gerilme titreşimlerinin şiddetinin artmasının 1641 cm^{-1} 'deki yeni ve geniş bandın NH bükülme ve makaslama moduna karşılık geldiğini, 1451-1410 cm^{-1} aralığında keskin sinyallerin ise C = C gerilme titreşimine karşılık geldiğini söylemişlerdir.

Araştırmacılar, AChE ile immobilize edilmiş gözenekli silikonun floresans özelliğinin, serbest gözenekli silikona göre daha şiddetli olduğunu ifade etmişlerdir (Şekil 2.24b) [76].

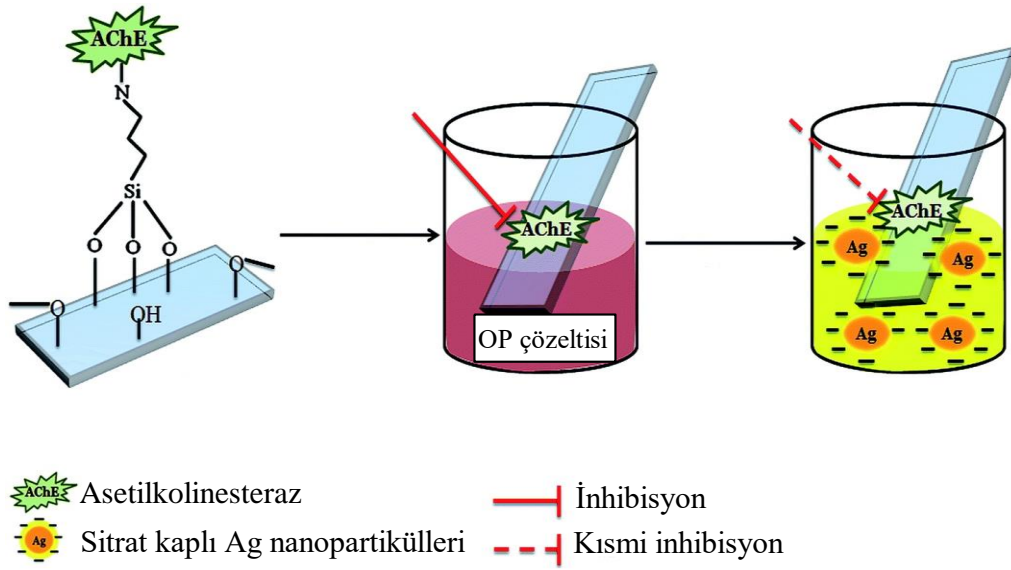


Şekil 2.22. Gözenekli silikon yüzey ve enzim-immobilize gözenekli silikon yüzeye ait FT-IR spektrumu(a), dalga boyu-floresans yoğunluğu grafiği(b)

Tümtürk ve Yüksekdağ AChE enzimini poli(etilenimin) kaplı silika nanopartiküllerine immobilize ederek enzimin optimum pH ve sıcaklığının sırasıyla 8 ve 35°C olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca immobilize enzimin daha iyi kararlılığa sahip olduğunu, kullanılan destek materyalin ucuz ve hazırlanmasının kolay olduğunu, immobilizasyon kapasitesinin de yüksek olduğunu ifade etmişlerdir [77].

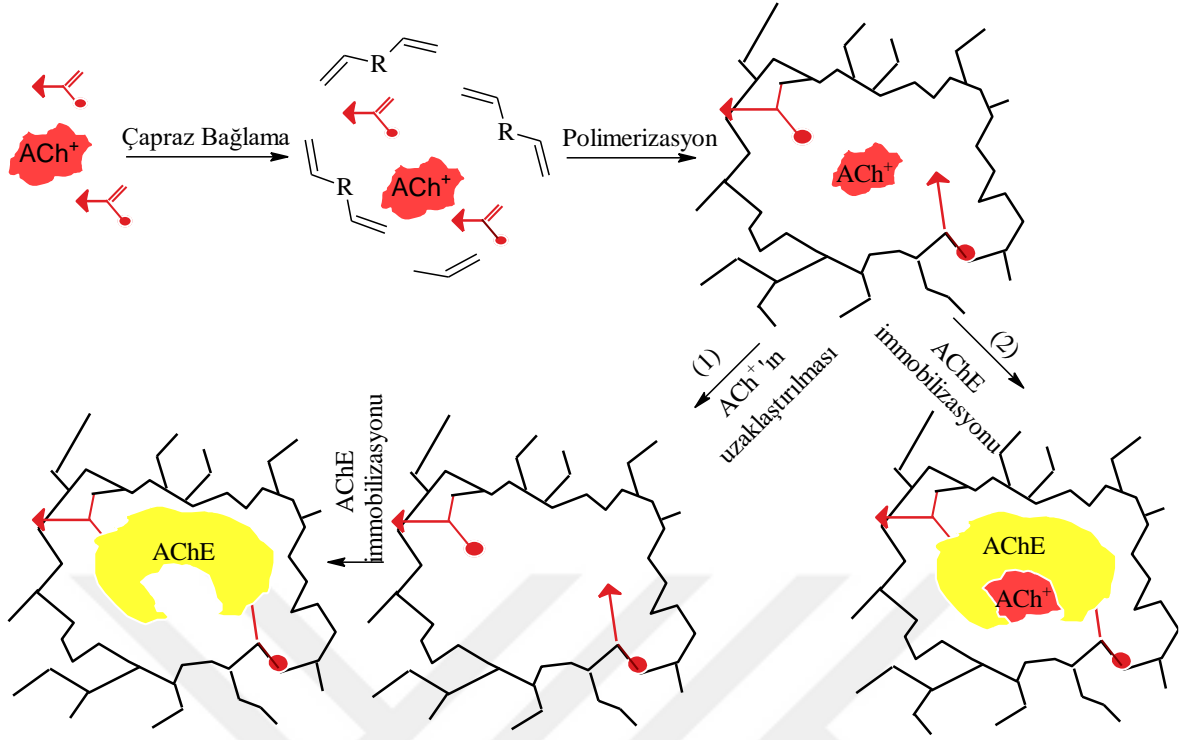
Kumar ve diğeri cam yüzeyi ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$:3/1 aracılığıyla) hidroksilli yapı olan silanole dönüştürdükten (Şekil 2.25) sonra AChE 'ı immobilize etmişlerdir. Enzimle immobilize

olan bu yüzey organofosfat çözeltisine (malatyon ve trikloron) daldırıldığında, enzimin tamamen inhibe olduğunu ifade etmişlerdir, inhibe olmuş olan bu enzimi 1% AgNO_3 , 0.1% NaBH_4 ve 1% trisodyumsitratın bulunduğu çözelti ortamına daldırdıklarında ortamda tiyol molekülü oluşmadığı için Ag nanopartiküllerin oluşumunun engellenmediğini ve bu sebeple 420 nm'de absorbansın arttığını, bunun da organofosfat konsantrasyonu ile ilişkili olduğunu ifade etmişlerdir. Ag nanopartiküllerin miktarındaki artışa dayanarak malatyon ve trikloron pestisitlerini sırasıyla 0.455 nM ve 5.46 nM'da tespit etmişlerdir [78].



Şekil 2.23. Ag nanopartikülleri kullanarak organofosfat pestisiti tespiti için AChE immobilizasyonun şematik gösterimi

Demirci ve diğerleri AChE'in immobilizasyonu için iki metot kullanmışlardır. Metotlardan biri ACh^+ 'in polimer ile sarılması (metakrilik asit, çapraz bağlayıcı olarak N,N'-metilen-bis (akrilamid)), daha sonra ACh^+ 'in uzaklaştırılmasıyla oluşan boşluğa AChE enzimi immobilize edilmesidir. Diğer metot ise, ACh^+ uzaklaştırılmadan AChE'in immobilizasyonunun yapılması şeklindedir.



Şekil 2.24. AChE immobilizasyonu için kullanılan metotların şematik gösterimi

Araştırmaların sonucunda birinci metoda göre immobilize olan AChE'nin çevresindeki polimerle daha kuvvetli bağ yapmasından dolayı aktifliğinin ikinci metoda göre daha iyi olduğunu ve ayrıca serbest AChE'ye göre aktifliğinin 240 kat daha büyük olduğunu ifade etmişlerdir [79].



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

3.1.1. Kimyasal maddeler

Deneysel çalışmalar sırasında kullanılan kimyasal maddelere ve firma bilgilerine aşağıda yer verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kimyasal listesi

Kimyasal Madde	Üretici Firma
Tris(2-aminoetil)amin polimer (200-400 mesh, 3,5-5,0 mmol/g N)	Sigma-Aldrich
5-brom-2-hidroksi benzaldehit, 98% saflıkta	
PdCl ₂ , 99,9% saflıkta	
N,N-Dimetilformamid, susuz 99,8% saflıkta	
Toluen, susuz 99,8% saflıkta	
Aseton, 99,8% saflıkta	
Sodyum dihidrojen fosfat(NaH ₂ PO ₄ ,120g/mol)	
Fosforik asit (H ₃ PO ₄ 106,09 g/mol)	
Asetik asit (CH ₃ COOH)	
Sodyum asetat (CH ₃ COONa, 82,02 g/mol)	
Disodyum hidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄ ,142 g/mol	
Boraks/ (Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O, 201,24 g/mol)	
Sodyum hidroksit (NaOH,40 g/mol)	
5,5 ¹ -ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB)	
Sodyum bikarbonat	
AChE (elektrikli yılan balığından izole) (518 ünite/mg, 10KU)	
Asetil tiyokolin iyodür, ≥98 % saflıkta	
Vantex	Agrinova
Imidan Fosmet	Supelco

3.1.2. Cihazlar

pH metre

Jenway 3010 model pH metre cihazı, tampon çözeltilerin pH'sını ayarlama da kullanılmıştır.

Ultraviyole – Görünür Bölge spektrofotometresi

UV-GB spektrumları UV-1800 ENG240V, SOFT model spektrofotometre ile 700-180 nm aralığında alınmıştır.

Çalkalamalı, sıcaklık kontrollü su banyosu

Wisebath WSB-18 model su banyosu ile çalışmalarda hem sıcaklık kontrolü hem de karıştırma işlemi sağlanmıştır.

Element analizi

Element analizleri LECO, CHNS-932 Elementel Analiz Cihazı ile ODTÜ Merkez Laboratuvar, AR-GE ve Ölçme Merkezi'nde yapılmıştır. Metal yüzdelere ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda Perkin Elmer Analyst 400 marka Atomik Absorpsiyon Spektrofotometrisi Cihazı ile yapılmıştır.

GPC (Jel Geçirgenlik Kromatografisi)

Sentezlenen polimerlerin GPC analizleri Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde yapılmıştır.

FT-IR (Fourier Transform Infrared) spektrometri cihazı

Sentezlenen tüm polimerlerin FT-IR spektrumları Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi'nde Mattson-1000 FT-IR model cihaz ile 4000-400 cm^{-1} aralığında alınmıştır.

SEM/EDX (Taramalı Elektron Mikroskobu / Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi)

(2AEPS-SalBr) ve (2AEPS-SalBr-Pd) polimerlerinin SEM/EDX'leri QUANTA 400F Field Emission cihazı ile ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

3.2. Hazırlanan Çözeltiler

İmmobilize desteklerin optimizasyonu ve Imidan Fosmet ve Vantex pestisitleri üzerine olan uygulama çalışmaları sırasında kullanılan çözeltilerin hazırlanmaları ile ilgili bilgi aşağıda yer verilmiştir.

pH 3 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$) tamponu; 6,24 g (40 mmol) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (sodyum dihidrojen fosfat) 250 mL su içerisinde çözülmüştür. Üzerine derişik 85%'lik H_3PO_4 çözeltilisinden pH 3 olana kadar damla damla eklenmiştir.

pH 4 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$) tamponu; 6,24 g (40 mmol) NaH_2PO_4 (sodyum dihidrojen fosfat) 250 mL su içerisinde çözülmüştür. Üzerine 85%'lik H_3PO_4 'ten pH 4 olana kadar damla damla eklenmiştir.

pH 5 ($\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$) tamponu; 100 mL 0,25 M asetik asit üzerine 0,25 M sodyum asetatın pH 5 olana kadar damla damla eklenmiştir.

pH 6-9 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) tamponu; 100 mL 0,25 M Na_2HPO_4 üzerine 0,25 M NaH_2PO_4 'tan pH 6 için pH 6 olana kadar, pH 7 için pH 7 olana kadar, pH 8 için pH 8 olana kadar, pH 9 için pH 9 olana kadar damla damla eklenmiştir.

pH 10 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7/\text{NaOH}$) tamponu; 100 mL 0,25 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ üzerine 0,25 M sodyum hidroksitten pH 10 olana kadar damla damla eklenmiştir.

Asetilkolinesteraz (AChE) enzim çözeltisi; 18 mg enzim 50 mL saf suda çözülmüştür. Hazırlanan bu çözelti 1'er mL'lik hacimler halinde eppendorf tüplere konulmuş ve derin dondurucuda -20°C 'de muhafaza edilmiştir.

Asetiltiyokolin iyodür çözeltisi; 0,075 M stok substrat çözeltisi hazırlamak için; 0,216 g asetil tiyokolin iyodür tartılarak 10 mL hacim çizgisine kadar saf su ile tamamlanmıştır.

Renklendirici (DTNB); 0,01 M DTNB çözeltisini hazırlamak için; 39,6 mg 5,5-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit 10 mL pH 7 fosfat tamponu ile çözülüp üzerine 15 mg sodyum bikarbonat ilave edilmiştir.

Imidan Fosmet (O,O-dimetil S-ftalimidometil fosforoditiyoat) çözeltisi: $1,57 \times 10^{-6}$ M'lık (0,5 ppm) fosmet çözeltisini hazırlamak için 0,5 mg fosmet tartılarak 1L'lik saf su: asetonitril (4:1) karışımında çözülmüştür.

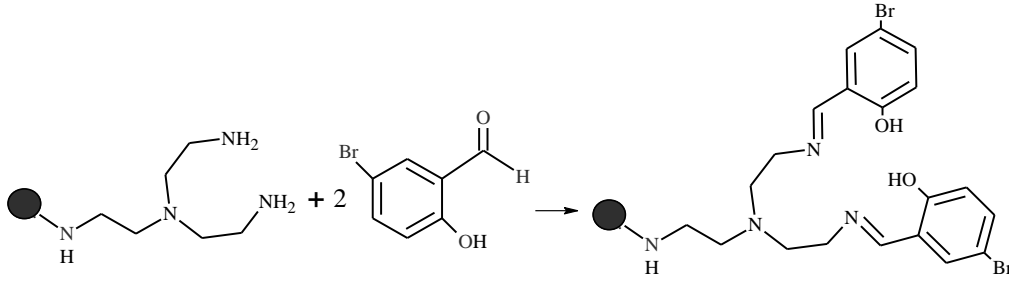
Vantex (siklopropankarboksilik asit, 3-(2-kloro-3,3,3-trifluoro-1-propenil)-2,2-dimetil, siyano(3- fenoksifenil)metil ester, [1R- [1 α (S*),3 α (Z)]] çözeltisi: $1,11 \times 10^{-6}$ M'lık (0,5 ppm) Vantex çözeltisini hazırlamak için 0,5 mg Vantex tartılarak 1L'lik saf su: asetonitril (4:1) karışımında çözülmüştür.

3.3. Destek Polimerlerinin Hazırlanması

Bu çalışmada, önce katılma-ayrılma tepkimesine göre Schiff bazı içeren polimer, daha sonra "kalıp" yöntemi ile Paladyum iyonu içeren koordinasyon polimeri sentezlenmiştir.

3.3.1. (2AEPS-SalBr) polimerinin hazırlanması

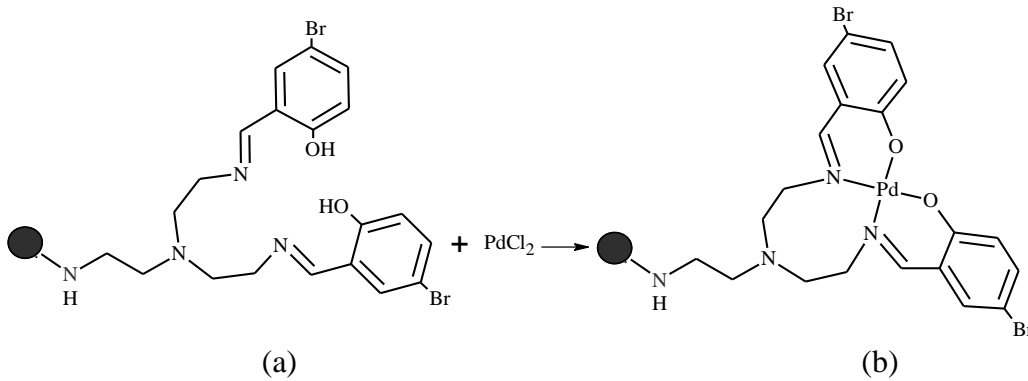
Schiff bazı içeren polimeri sentezlemek için tris(2-aminoetil)amin polimeri ile 5-bromo-2-hidroksi benzaldehitin katılma ayrılma tepkimesinden yararlanılmıştır. Bunun için, 20 mL DMF'de çözülmüş 0,5 g tris(2-aminoetil)amin[polimer bağlı], soğutucuya bağlanmış iki boyunlu cam balona konulmuştur. 80°C'de ısıtılmış geri soğutucu altında karıştırma işlemi yapılırken damlatma hunisi içerisindeki $3,5 \times 10^{-3}$ mol (0,704 g) 5-bromo-2-hidroksi benzaldehit damla damla balondaki tris(2-aminoetil)amin[polimer bağlı] çözeltisi üzerine ilave edilmiştir. Aldehit çözeltisi eklendikten sonra 6 saat geri soğutucu altında karıştırma ve ısıtma işlemine devam edilmiştir. Altı saatin sonunda temiz bir behere alınan karışım oda sıcaklığına geldikten sonra, aseton eklenerek çöktürülüp süzölmüştür. (2AEPS-SalBr) kodlu polimer, 1:1 metanol:aseton karışımı ile 3 defa yıkandıktan sonra 80°C'deki etüvde 1 gün boyunca kurutulmuştur (Verim 75%).



Şekil 3.1. (2AEPS-SalBr) polimerinin sentezine ait reaksiyon mekanizması

3.3.2. (2AEPS-SalBr-Pd) polimerinin hazırlanması

Tris(2-aminoetil)amin polimeri ile 5-bromo-2-hidroksi benzaldehitin, geri soğutucu altında DMF ile çözülmesinden sonra PdCl_2 eklenerek kalıp yöntemine göre Pd(II) koordinasyon polimeri sentezlenmiştir[80]. Bunun için, geri soğutucuya bağlanmış cam balona 20 mL DMF’de çözülmüş 0,5 g tris(2-aminoetil)amin polimerinden konulmuştur. 80°C ’de geri soğutucu altında karıştırma işlemi yapılırken damlatma hunisi içerisindeki $3,5 \times 10^{-3}$ mol (0,704 g) 5-bromo-2-hidroksi benzaldehit, damla damla balondaki tris(2-aminoetil)amin[polimer bağlı] çözeltisi üzerine ilave edilmiştir (Şekil 3.2a). Aldehit çözeltisi eklendikten sonra 6 saat geri soğutucu altında karıştırma ve ısıtma işlemine devam edilmiştir. Daha sonra reaksiyon ortamına 10 mL DMF içerisinde $3,5 \times 10^{-3}$ mol (0,620 g) çözülmüş metal tuzu (PdCl_2) ilave edilerek 12 saat boyunca manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında karıştırılmıştır. 12 saatin sonunda temiz bir behere alınan karışım oda sıcaklığına geldikten sonra, aseton eklenerek çöktürülmüştür (Şekil 3.2b). Çökelek 1:1 metanol:aseton karışımı ile 3 defa yıkanmıştır. Daha sonra 80°C ’de, 1 gün boyunca etüvde kurutulmuştur (Verim 90%).



Şekil 3.2. (2AEPS-SalBr-Pd) polimerinin sentezine ait reaksiyon mekanizması

3.4. Destek Polimerlere AChE Enziminin İmmobilizasyonu, Optimizasyonu ve Pestisit Tayini

Asetilkolinesterazın immobilizasyonu için iki boyunlu balona, çalışılan polimerlerden 0,5'er gram alınarak 10 mL DMF eklenmiştir. Geri soğutucu altında 30 dk 50°C'de ısıtılmıştır. Balon içerisine Bölüm 3.2'de belirtildiği şekilde hazırlanan stok enzim çözeltisinden 2 mL eklenip 12 saat geri soğutucu altında oda sıcaklığında karıştırma işlemine devam edilmiştir. Tepkime sonunda, katı maddeler asetonla yıkanmış, böylece safsızlık ve tutulmayan enzim uzaklaştırılmıştır. Bunu takiben süzgeç kâğıdından süzülüp etüvde kurutulduktan sonra +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.4.1. İmmobilize Asetilkolinesteraz enziminin aktifliğine pH etkisi

İmmobilize asetilkolinesteraz enziminin aktifliğine pH etkisini incelemek için immobilizasyonun gerçekleştirildiği polimerlerden 6'şar mg alınarak yedi adet deney tüpüne konulmuştur. Üzerlerine pH tamponlarının (pH 3-9) her birinden 4'er mL, substrat çözeltisinden (asetiltiyokolin iyodür) 20 µL eklenerek oda sıcaklığındaki ultrasonik su banyosunda 15 dk karıştırılmıştır. Karıştırma işleminden sonra 50 µL DTNB eklenerek 15 dk daha karıştırma işlemine devam edilmiştir. UV-GB spektrofotometresi ile 412 nm'deki absorbans değişimi izlenmiştir. Bu değerler grafikleştirilerek optimum pH değerleri belirlenmiştir.

Serbest enzim ve farklı desteklere tutturulmuş enzimin optimum pH değerlerinin kıyaslayabilmek için serbest AChE'nin aktifliğine pH etkisi de incelenmiştir. Bunun için, yedi adet deney tüpü içerisine Bölüm 3.2'de belirtildiği gibi hazırlanan serbest enzim çözeltisinden 3 µL alınarak immobilize enzim için yapılan işlemler tekrarlanmıştır.

3.4.2. İmmobilize Asetilkolinesteraz enziminin aktifliğine sıcaklık etkisi

İmmobilize asetilkolinesteraz enziminin aktifliğine pH etkisini incelemek için immobilizasyonun gerçekleştirildiği polimerlerden 6'şar mg alınarak sekiz adet deney tüpüne konulmuştur. Üzerlerine optimum pH'daki tampon çözeltisinden ve 20 µL stok substrat çözeltisinden (asetiltiyokolin iyodür) ilave edilmiştir. Bu çözeltiliye 50 µL DTNB eklenerek ultrasonik su banyosunda 15 dk karıştırılmıştır. UV-GB spektrofotometresi ile

412 nm’de absorbans değişimi izlenmiştir. Bu işlem 20°C-90°C sıcaklık değerleri arasında 10’ar derecelik artışlarla tekrarlanmıştır. Daha sonra bu değerler grafikleştirilerek çalışılan polimerlere immobilize AChE için optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir.

Serbest enzim ve farklı desteklere tutturulmuş enzimin optimum sıcaklık değerlerinin kıyaslayabilmek için serbest AChE’in aktifliğine sıcaklığın etkisi de incelenmiştir. Bunun için, sekiz adet deney tüpü içerisine Bölüm 3.2’de belirtildiği gibi hazırlanan serbest enzim çözeltisinden 2,88 µL alınarak immobilize enzim için yapılan işlemler tekrarlanmıştır.

3.4.3. İmmobilize Asetilkolinesteraz enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Destek materyale tutturulmuş enzimin aktifliğine substrat (asetiltiyokolin iyodür) derişiminin etkisini incelemek için AChE immobilize edilmiş polimerden 6’şar mg alınarak on adet deney tüpü içerisine konulmuştur. Üzerlerine 0,075 M’lık stok asetiltiyokolin iyodür çözeltisinden değişen miktarlarda (10-60 µL) ilave edilmiştir. Tüplerdeki toplam hacim 4020 µL olacak şekilde optimum pH’daki tampon çözeltisinden ilave edilip optimum sıcaklığa getirilmiş ultrasonik su banyosunda 15 dk karıştırılmıştır. Daha sonra her bir tüpe 50 µL DTNB eklenip 15 dk daha karıştırma işlemine devam edilmiştir. Tüpler içerisinde değişen derişimlerdeki (0,18–1,12 mM) substrat çözeltilerinin meydana getirdiği absorbans değişimleri UV-GB spektrofotometresinde 412 nm de izlenmiştir.

Serbest enzim ve farklı desteklere tutturulmuş enzimin kinetik parametrelerini kıyaslayabilmek için serbest Asetilkolinesterazın (AChE) aktifliğine substrat derişiminin etkisi de incelenmiştir. Bunun için, tüp içerisine Bölüm 3.2’de belirtildiği gibi hazırlanan serbest enzim çözeltisinden 2,88’er µL alınıp on tüp içerisine konulup immobilize enzim için yapılan işlemler sırasıyla uygulanarak aktiflik tayinleri yapılmıştır

Artan substrat derişimine karşı absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen grafiğin denkleminde (ax^2+bx+c) eğim bulunup, $v = \left(\frac{A}{t}\right) x \left(\frac{1}{Eğim}\right)$ formülü ile her bir derişim için hız değerleri hesaplanmış, *Lineweaver-Burk* kalibrasyon grafiği çizilerek K_m ve V_{mak} değerleri belirlenmiştir.

3.4.4. İmmobilize Asetilkolinesteraz enziminin tekrar kullanılabilirliği

Destek materyale tutturulmuş enzimin tekrar kullanılabilirliğini incelemek için AChE immobilize destek materyalinden 6 mg alınarak bir tüp içerisine konulmuştur. Üzerine 4 mL optimum pH'daki tampon çözeltisinden ve 20 µL substrat çözeltisinden (asetiltiyokolin iyodür) eklenip 15 dk oda sıcaklığında ultrasonik su banyosunda karıştırılmıştır. Daha sonra tüp içerisine 50 µL DTNB eklenerek karıştırmaya devam edilmiştir. UV-GB spektrofotometresinde 412 nm'de absorbans değerleri okunmuştur.

Tüp içerisindeki çözelti kısmı dekante edilerek uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan katının üzerine aynı işlemler tekrarlanmış, bu işlemlere renklenme solana dek devam edilmiştir.

3.4.5. İmmobilize Asetilkolinesteraz enziminin depolama kararlılığı

Destek materyale tutturulmuş enzimin depolama kararlılığını incelemek için AChE (asetilkolinesteraz) enzimi immobilize edilmiş polimerlerden 6'şar mg alınarak tüplere konulmuştur. Üzerlerine 4 mL optimum pH'daki tampon çözeltisi ve 20 µL stok asetiltiyokolin iyodür (substrat) çözeltisinden eklenerek 15 dk karıştırılmıştır. Her bir tüpe 50 µL DTNB eklenerek 15 dk daha karıştırma işlemine devam edilmiştir. UV-GB spektrofotometresi yardımıyla 412 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Bu işlem her ay bir defa olmak üzere oda sıcaklığında tekrarlanmıştır. Böylece dokuz ay sonunda immobilize enzimin aktifliğini % kaç koruyabildiği hesaplanmıştır.

3.4.6. İmmobilize AChE enzimi ile pestisit tayini

AChE (Asetilkolinesteraz) enzimi immobilize edilmiş polimerlerden 6'şar mg alınarak altı adet deney tüpüne konulmuştur. Tüplere (4000-3050 µL) pH 8 tampon çözeltisi konulduktan sonra 20 µL asetiltiyokolin iyodür çözeltisi eklenerek ultrasonik su banyosunda 20 dk karıştırılmıştır. Bunu takiben 50 µL DTNB çözeltisi ilave edilerek 10 dk daha karıştırma işlemi yapılmıştır. Daha sonra hazırlanan altı tüp içerisine sırasıyla 0 µL, 10 µL ve 50 µL olacak şekilde stok pestisit çözeltisi eklenmiştir.

Pestisit ilavesinden 30 dk sonra, tüpler içerisinde pestisit yönünden farklı derişimlerdeki sarı renkli çözeltilerin, belirlenen dalga boyundaki absorbans değişimi UV-GB

spektrofotometresi yardımıyla izlenmiştir. Bu çalışma kullanılan madde miktarları ve işlem sırası değiştirilmeden Imidan fosmet ve Vantex pestisitleri için ayrı ayrı yapılmıştır.



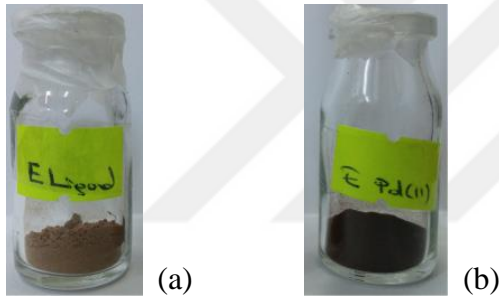


4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Asetilkolinesteraz enziminin (AChE) immobilizasyonunda kullanılmak üzere (2AEPS-SalBr) ve (2AEPS-SalBr-Pd) destek polimerleri sentezlenmiştir. (2AEPS-SalBr) ve (2AEPS-SalBr-Pd) polimerleri Element analizi, FT-IR, SEM/EDX ve GPC ölçümleriyle karakterize edilmiştir. Daha sonra, (2AEPS-SalBr) ve (2AEPS-SalBr-Pd) polimerlerine (AChE) enzimi immobilize edilerek optimizasyon koşulları araştırılmıştır.

4.1. Destek Polimerlerinin Karakterizasyonu

Aşağıda (2AEPS-SalBr) ve (2AEPS-SalBr-Pd) polimerlerine ait görüntülere yer verilmiştir (Resim 4.1).



Resim 4.1. Sentezlenen polimerlerin görüntüleri: a. (2AEPS-SalBr) b. (2AEPS-SalBr-Pd)

Sentezlenen polimerlerin karakterizasyonları için Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC), Element Analizi, FT-IR Spektroskopisi ve SEM/EDX analizleri yapılmıştır.

Çizelge 4.1. Modifiye edilen polimerlerin M_w , M_n ve element analiz yüzdeleri

Bileşik (renk)	Önerilen Birim (M_w)	PDI	M_w^*	M_n	Hesaplanan (Bulunan)			
					C	H	N	Pd
(2AEPS-SalBr) sarı	$[(C_8H_8)_8(C_{23}H_{31}N_4O_2Br_2)]$ $M_w = 1168$	1.08	960	890	85,62 (88,31)	6,92 (7,56)	1,49 (1,85)	5,96 (4,57)
(2AEPS-SalBr-Pd) bordo	$[(C_8H_8)_{10}(C_{23}H_{29}N_4O_2Br_2)Pd]$ $M_w = 1200$	1.06	840	790	80,78 (81,30)	6,73 (6,98)	3,04 (3,59)	6,08 (5,73)

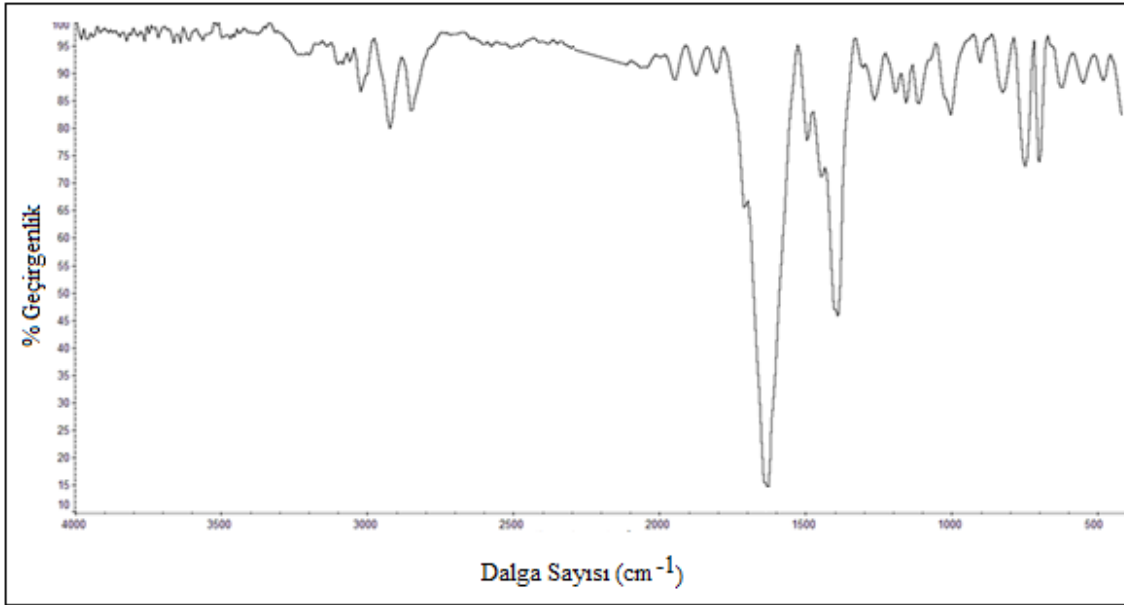
M_w^* : GPC analiz sonucuna göre ağırlıkça ortalama mol kütlesi

M_w : Elementel analiz sonuçlarına göre ağırlıkça ortalama mol kütlesi

(2AEPS-SalBr) ve (2AEPS-SalBr-Pd) polimerlerinin (GPC) analiz sonucunda M_w ve M_n değerleri sırası ile (2AEPS-SalBr) için 960 ve 890 ; (2AEPS-SalBr-Pd) için 840 ve 790 olarak belirlenmiştir. (M_w : ağırlıkça ortalama mol kütle; M_n : sayıca ortalama mol kütle).

(2AEPS-SalBr) ve (2AEPS-SalBr-Pd) polimerleri için önerilen birime ait kütlece ortalama mol kütle (M_w) ile GPC analizine göre bulunan kütlece ortalama mol kütle (M_w^*) değerlerinin birbirine yakın olduğu görülmüştür.

Heterojenlik indeksi (PDI), $\frac{\text{Kütlece Ortalama Mol Kütle}}{\text{Sayıca Ortalama Mol Kütle}} \left(\frac{M_w}{M_n}\right)$ formülü ile bulunarak polimer zincirlerinin uzunluğu hakkında bilgi vermektedir. GPC analizi sonuçlarına göre PDI değerlerinin 1'e yakın olması sebebiyle sentezlenen polimerlerin zincir uzunluklarının birbirine yakın olduğu yorumu yapılmıştır.



Şekil 4.1. tris(2-aminoetil)amin[polimer bağlı]'a ait FT-IR spektrumu

Tris(2-aminoetil)amin [polimer bağlı] polimerinin, katılma-ayırma tepkimesi sonucunda oluşan (2AEPS-SalBr) polimerinin, kalıp yöntemine göre oluşan (2AEPS-SalBr-Pd) polimerinin FT-IR spektrumlarından (sırasıyla Şekil 4.1, Şekil 4.3 ve Şekil 4.6) yararlanılarak belirgin FT-IR frekansları Çizelge 4.2'de karşılaştırılmıştır.

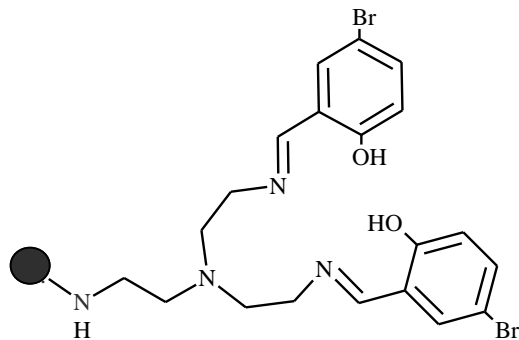
Çizelge 4.2. Modifiye edilen polimerlerin belirgin FT-IR frekansları (cm^{-1})

Bileşimin Sembolü	$V_{\text{OH}} / V_{\text{Pd-N; Pd-O}}$	$V_{\text{-HC=N}}$	$V_{\text{C-H (alifatik)}}$	$V_{\text{C-H (aromatik)}}$
(2AEPS-SalBr)	3300-3100 /-;-	1625, 1633	2920 2840	3120
(2AEPS-SalBr-Pd)	-/ 600;680	1640	2920 2840	3115

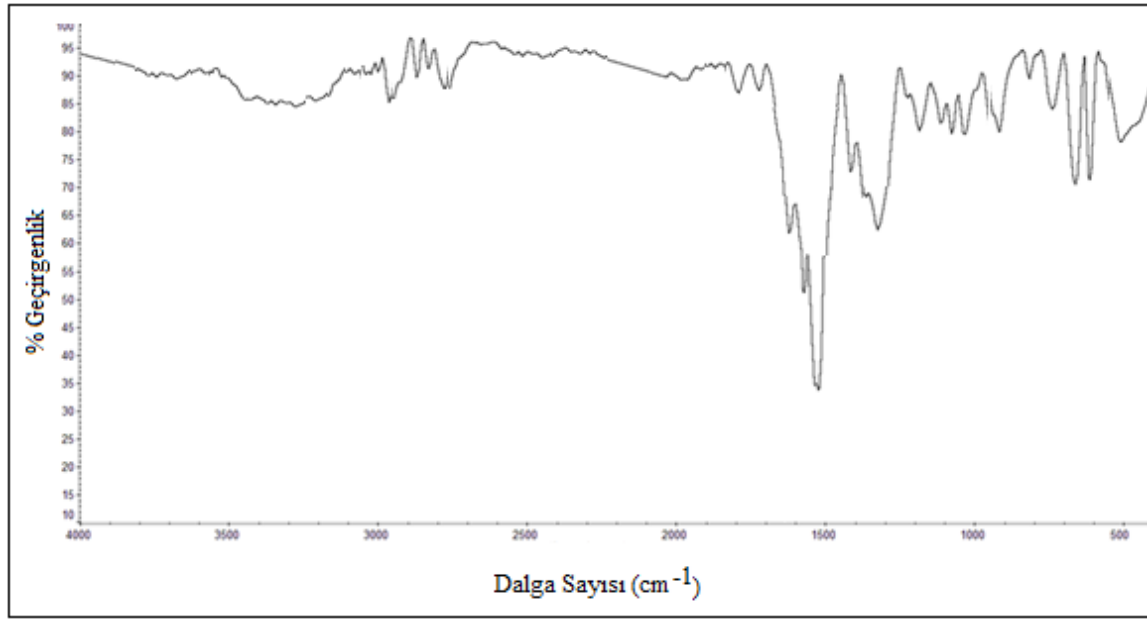
Nanoküre yapısındaki tris(2-aminoetil)amin[polimer bağlı]'den hazırlanan (2AEPS-SalBr) ve (2AEPS-SalBr-Pd) polimerlerinin SEM/EDX fotoğraf ve spektrumu alınarak yüzey morfolojisi incelenmiştir. SEM fotoğraflarından, hazırlanan (2AEPS-SalBr) ve (2AEPS-SalBr-Pd) polimerlerin küre yapısını koruduğu gözlenmiştir. EDX spektrumunda yer alan Pd piklerinden tris(2-aminoetil)amin polimeri ve aldehitin katılımından oluşan modifiye olmuş polimere koordine olduğu yorumu yapılmıştır. EDX spektrumunda bulunan Au elementlerine ait piklerin de analiz sırasında polimerlerin üzerini kaplama amaçlı kullanılan Au'dan kaynaklandığı yorumu yapılmıştır.

4.1.1. (2AEPS-SalBr) polimerinin karakterizasyonu

Tris(2-aminoetil)amin[polimer bağlı], (2AEPS), ile 5-bromo-2-hidroksi benzaldehitin katılma-ayrılma tepkimesi sonucunda oluşan ürün olan (2AEPS-SalBr) polimerine (Şekil 4.2) ait FT-IR spektrumu aşağıda verilmiştir (Şekil 4.3). (2AEPS-SalBr) kodlu polimerine ait alifatik $\nu_{\text{C-H}}$ titreşimi 2920 cm^{-1} ve 2840 cm^{-1} de, aromatik $\nu_{\text{C-H}}$ titreşimi ise 3120 cm^{-1} de gözlenmiştir. Bu piklerin (2AEPS) polimerindeki pikler ile aynı titreşim frekansında görülmesi polimerik yapının korunduğunu göstermektedir. $-\text{CH=N}-$ grubunun, (2AEPS)'daki $-\text{NH}_2$ ile aldehit arasındaki katılma-ayrılma reaksiyonu sonucunda meydana geldiği 1625 cm^{-1} ve 1633 cm^{-1} 'de görülen piklerin ortaya çıkışıyla öngörülmüştür [71].

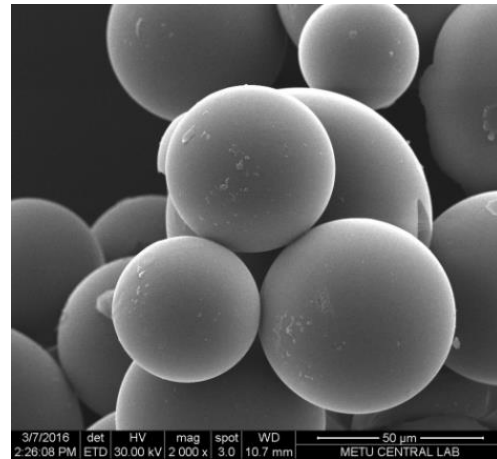
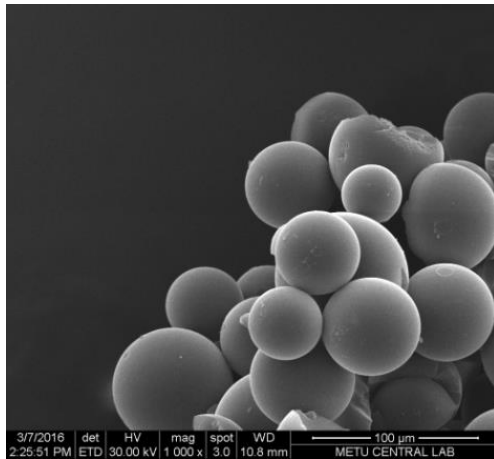


Şekil 4.2. (2AEPS-SalBr) polimerinin öngörülen yapısı

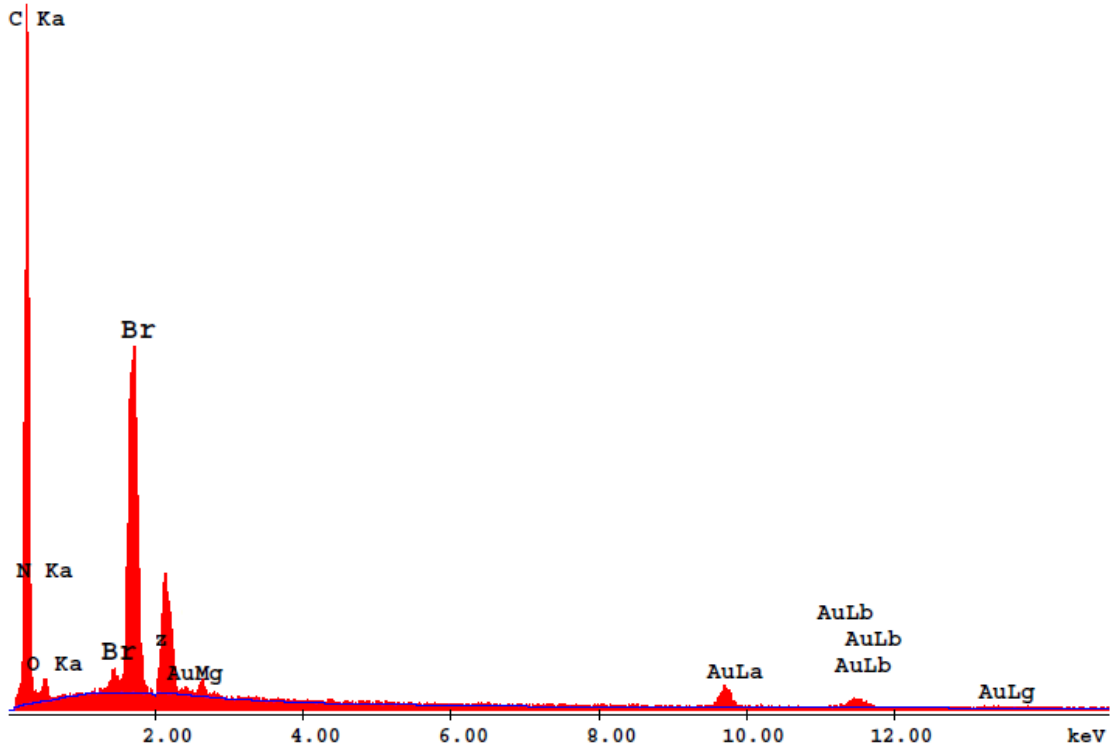


Şekil 4.3. (2AEPS-SalBr) polimerine ait FT-IR spektrumu

(2AEPS-SalBr) polimerine ait SEM fotoğraflarına bakılarak, polimerlerin yüzey morfolojisinden küre yapısının korunduğu, EDX spektrumunda Br elementinin yer alması nedeniyle aldehitin kürelere takıldığı yorumu yapılmıştır.



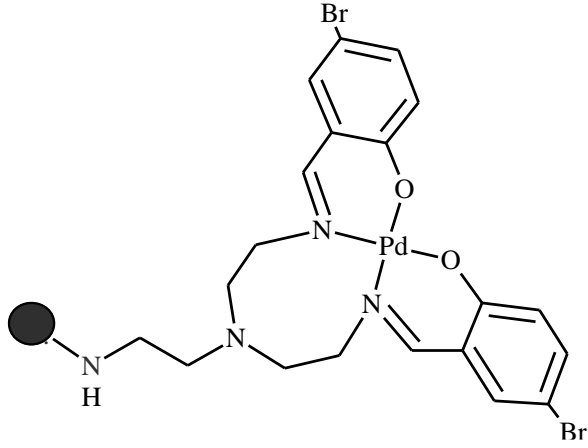
Resim 4.2. (2AEPS-SalBr) polimerinin SEM (1000 ve 2000 büyütme) görüntüsü



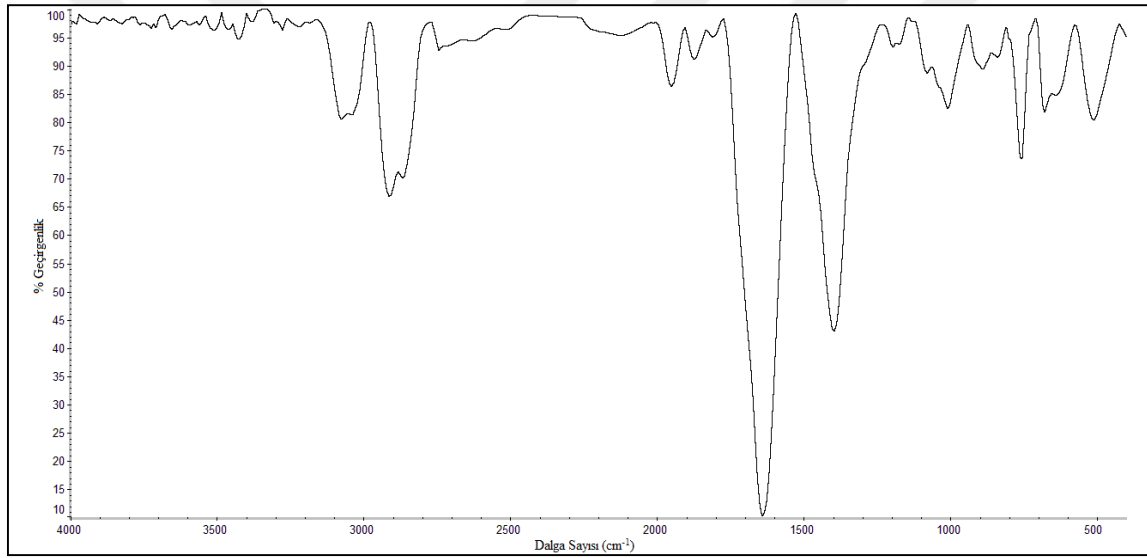
Şekil 4.4. (2AEPS-SalBr) polimerinin EDX spektrumu

4.1.2. (2AEPS-SalBr-Pd) polimerinin karakterizasyonu

(2AEPS-SalBr) ve Paladyumun katılma-ayrılma tepkimesi sonucunda oluşan ürünün (Şekil 4.5) FT-IR spektrumunun geniş pikler halinde ortaya çıkması net bir yorum yapılmasına engel olmuştur (Şekil 4.6). Ancak, $1640-1645\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen geniş pikin $-\text{HC}=\text{N}-$ ve $-\text{NH}-$ bandlarının çakışma yapmasından kaynaklandığı öngörülmüştür. (2AEPS-SalBr)'nın FT-IR spektrumuna göre 10 cm^{-1} 'lik kaymanın olması kompleksleşmeden dolayı olduğu düşünülmüştür. 2920 cm^{-1} de görülen pikin $\nu_{\text{C-H}}(\text{alifatik})$ titreşim frekansına, 3115 cm^{-1} de ortaya çıkan pikin ise $\nu_{\text{C-H}}(\text{aromatik})$ titreşim frekansına karşılık geldiği, orta şiddette 600 cm^{-1} ve 680 cm^{-1} de görülen piklerin $\nu_{\text{Pd-N}}$ ve $\nu_{\text{Pd-O}}$ titreşim frekansına karşılık gelebileceği öngörülmüştür.

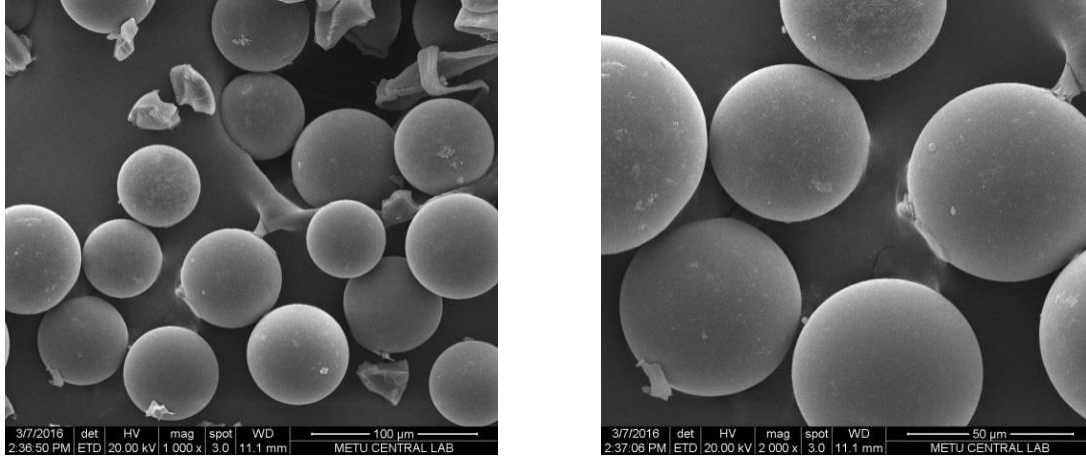


Şekil 4.5. (2AEPS-SalBr-Pd) polimerinin öngörülen yapısı

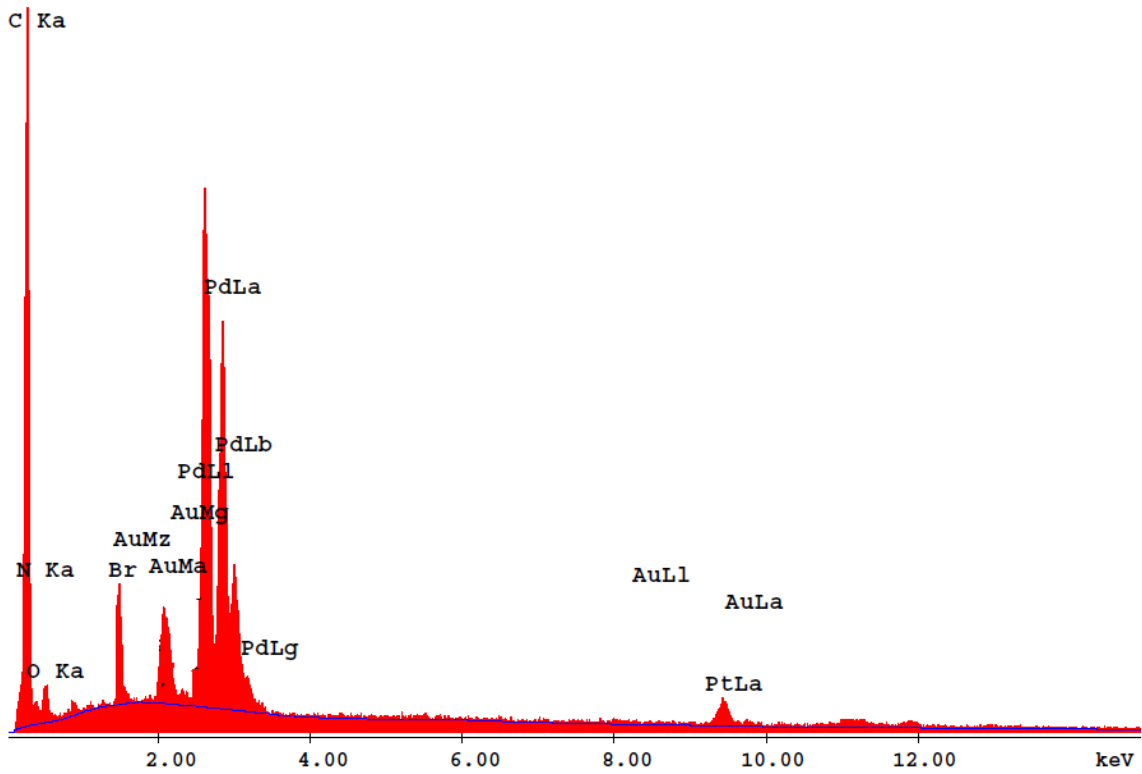


Şekil 4.6. (2AEPS-SalBr-Pd) polimerine ait FT-IR spektrumu

(2AEPS-SalBr-Pd) polimerinin SEM/EDX fotoğraf ve spektrumu alınarak (Resim 4.3 ve Şekil 4.7) polimerlerin yüzey morfolojisinden küre yapısının korunduğu, EDX spektrumunda Pd elementinin yer alması nedeniyle de Pd(II) iyonunun kürelere takıldığı yorumu yapılmıştır.



Resim 4.3. (2AEPS-SalBr-Pd) polimerinin SEM (1000 ve 2000 büyültmeli) görüntüsü



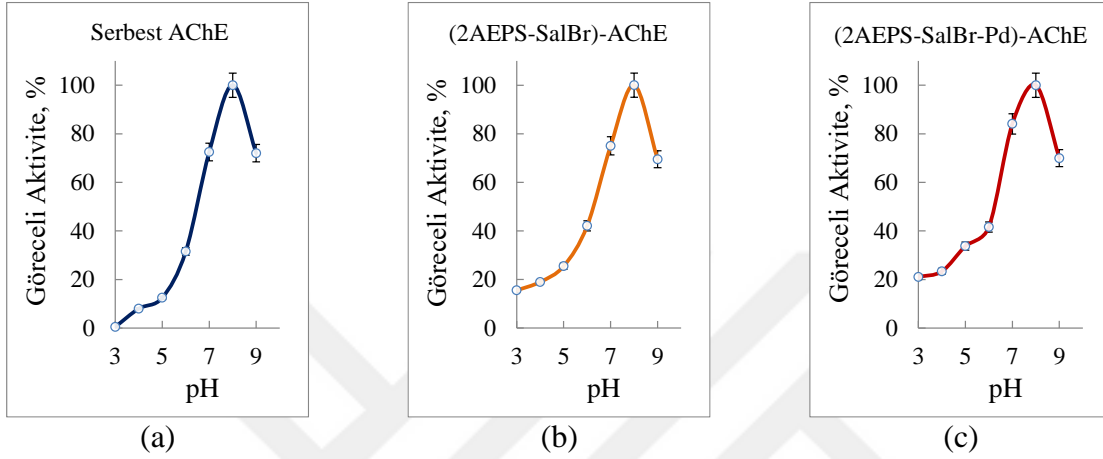
Şekil 4.7. (2AEPS-SalBr-Pd) polimerinin EDX spektrumu

4.2. Serbest ve İmmobilize AChE Enzimi İle İlgili Çalışmalar

Serbest ve immobilize AChE enziminin optimizasyon değerleri ile elde edilen kinetik parametrelere ait verilere bu bölümde yer verilmiştir.

4.2.1. Serbest ve immobilize AChE'in aktifliğine pH etkisi

Serbest ve polimerik desteklere immobilize edilen AChE'in aktifliğine pH etkisi, Bölüm 3.4.1'de açıklanan yöntem kullanılarak incelenmiş ve Şekil 4.8'deki grafikler elde edilmiştir.

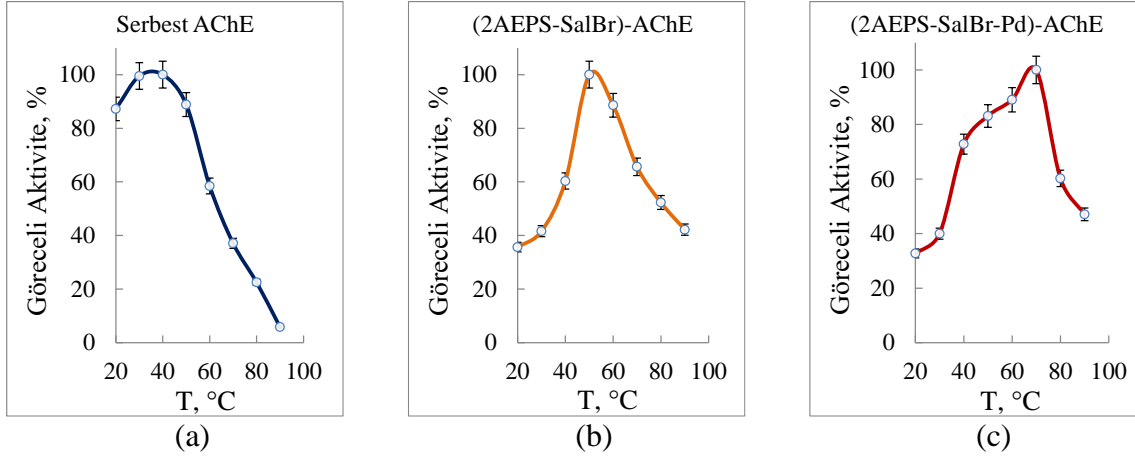


Şekil 4.8. Enzim aktifliğine pH etkisi: Serbest AChE (a), (2AEPS-SalBr) polimerine (b) ve (2AEPS-SalBr-Pd) polimerine (c) immobilize edilen AChE

Hem serbest enzimin hem de immobilize enzimin optimum pH'sı 8 olarak bulunmuştur. Bu durum enziminin mevcut çevresinin immobilizasyon işlemlerinden etkilenmediği şeklinde yorumlanabilir.

4.2.2. Serbest ve immobilize AChE'in aktifliğine sıcaklık etkisi

Sentezlenen polimerlere immobilize edilen AChE enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi Bölüm 3.4.2'de açıklanan yöntem uygulanarak incelenmiş ve Şekil 4.9'daki grafikler elde edilmiştir.



Şekil 4.9. Enzim aktifliğine sıcaklık etkisi: Serbest AChE (a), (2AEPS-SalBr) polimerine (b) ve (2AEPS-SalBr-Pd) polimerine (c) immobilize edilen AChE

İmmobilize edilen AChE için elde edilen optimum pH ve sıcaklık değerleri Çizelge 4.3'te verilmiştir.

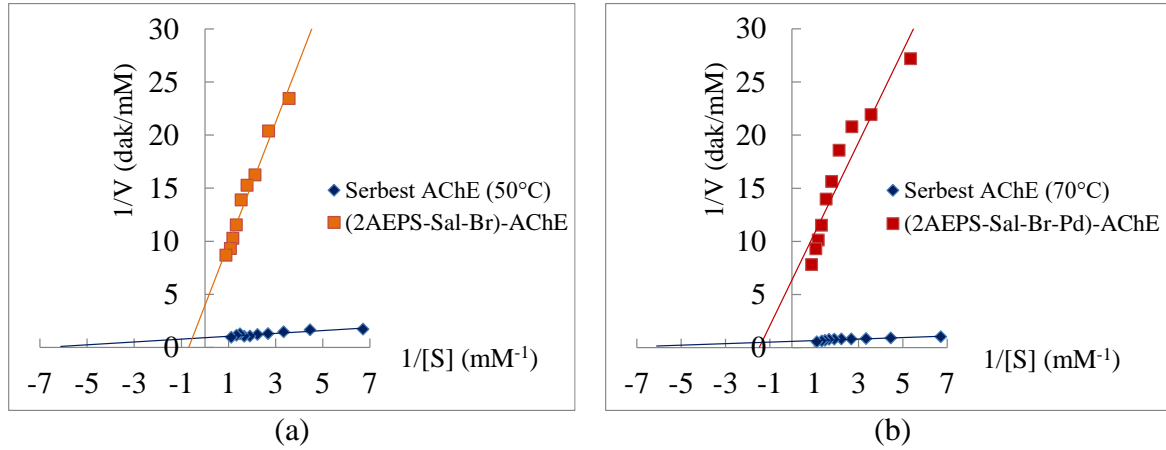
Çizelge 4.3. Sentezlenen polimerlere immobilize edilen AChE için seçilen optimum pH ve sıcaklık değerleri

Sentezlenen Polimerler	Optimum Şartlar	
	pH	Sıcaklık
(2AEPS-SalBr)-AChE	8	50°C
(2AEPS-SalBr-Pd)-AChE	8	70°C

(2AEPS-SalBr-Pd) polimerine immobilize edilen AChE'in optimum sıcaklığının, (2AEPS-SalBr) polimerine immobilize edilen AChE'in optimum sıcaklığından 20 °C daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum yüksek sıcaklık gerektiren enzim uygulamalarında (2AEPS-SalBr-Pd) polimerine immobilize edilen AChE'in kullanımının daha doğru olacağı şeklinde yorumlanabilir.

4.2.3. Serbest ve immobilize AChE enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Serbest ve immobilize edilmiş AChE aktifliğine substrat (asetilkolin iyodür) derişiminin etkisi Bölüm 3.4.3'te belirtilen yöntem uygulanarak belirlenmiştir. Her bir grafikte serbest enzim verileri referans olarak yer almak üzere elde edilen verilerden *Lineweaver-Burk* grafikleri çizildi. Grafiklerdeki verilerden yararlanarak K_m ve V_{max} değerleri bulunmuştur.



Şekil 4.10. AChE'nin aktifliğine substrat derişiminin etkisi: serbest AChE ve (2AEPS-SalBr) kodlu polimere immobilize AChE (a), serbest AChE ve (2AEPS-SalBr-Pd) kodlu polimere immobilize AChE (b)

Şekil 4.10'da serbest AChE, (2AEPS-SalBr) ve (2AEPS-SalBr-Pd) kodlu polimerlere immobilize AChE için pH 8'de ve sırasıyla 50°C ve 70°C'de çalışılmış, elde edilen absorbans değerleri ile yapılan hesaplamalar sonucu $1/V-1/[S]$ grafiğı çizilerek, doğrunun x eksenini kestiğı noktadan K_m , doğrunun y eksenini kestiğı noktadan da V_{max} değeri hesaplanmıştır.

Çizelge 4.4. Serbest ve immobilize AChE için kinetik parametreler

Optimum Koşullar	AChE	Destek	K_m (mM)	V_{mak} (mM/dk)
pH 8, 50°C	serbest	-	0,146	1,085
	immobilize	(2AEPS-SalBr)	1,443	0,251
pH 8, 70°C	serbest	-	0,118	1,680
	immobilize	(2AEPS-SalBr-Pd)	0,680	0,157

K_m enzimin substrata olan ilgisini ifade eder. K_m ne kadar küçük olursa enzimin substrata olan ilgisinin o kadar yüksek olduğu anlaşılır. V_{mak} ise enzimin substrata doyduğu andaki katalitik hızı ifade eder.

(2AEPS-SalBr) kodlu polimere immobilize edilen AChE'nin kinetik parametreleri ($K_m=1,443$, $V_{mak}=0,251$) incelendiğinde, serbest AChE enziminin değerlerine ($K_m=0,146$, $V_{mak}=1,085$) göre K_m değerinin immobilize AChE'da daha büyük olduğu yani substrata olan ilginin serbest enzime göre daha az olduğu; hız açısından ise, substrat doygunluğunda katalitik tepkimenin serbest enzime göre daha yavaş ilerlediğı görülmüştür.

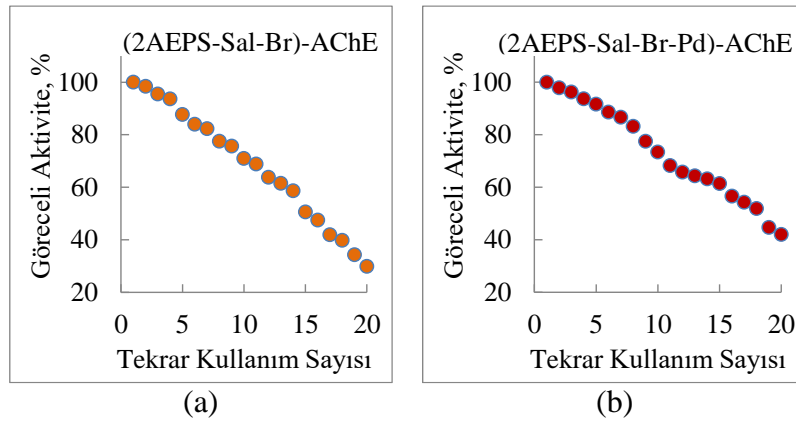
(2AEPS-SalBr-Pd) kodlu polimere immobilize edilen AChE'nin kinetik parametreleri ($K_m=0,680$, $V_{mak}=0,157$) incelendiğinde de, serbest AChE enziminin değerlerine ($K_m=0,118$, $V_{mak}=1,680$) göre K_m değerinin immobilize AChE'da daha büyük olduğu yani substrata olan ilginin serbest enzime göre daha az olduğu; hız açısından ise, substrat doygunluğunda katalitik tepkimenin serbest enzime göre daha yavaş ilerlediği görülmüştür.

Çizelge 5.4'te görüldüğü gibi optimum koşullarda olan (2AEPS-SalBr) ve (2AEPS-SalBr-Pd) polimerlerine immobilize AChE arasındaki kinetik parametreler incelendiğinde ise (2AEPS-SalBr-Pd) polimerine immobilize AChE'nin substrata olan ilgisinin yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu ancak, substrat doygunluğunda katalitik tepkimenin hızının (V_{mak}) (2AEPS-SalBr) polimerine immobilize AChE için daha yüksek olduğu görülmektedir.

(2AEPS-SalBr-Pd)-AChE polimerine immobilize AChE için optimum sıcaklık (2AEPS-SalBr) polimerine immobilize AChE'a göre 20°C daha yüksek olarak belirlenmiştir. Buna rağmen (2AEPS-SalBr-Pd) polimerine immobilize AChE'nin substrata olan ilgisi daha yüksektir.

4.2.4. İmmobilize AChE enziminin tekrar kullanılabilirliği

Sentezi yapılan polimerlere immobilize edilen AChE'nin tekrar kullanılabilirliği Bölüm 3.4.4'te verilen yöntem kullanılarak belirlenmiştir.

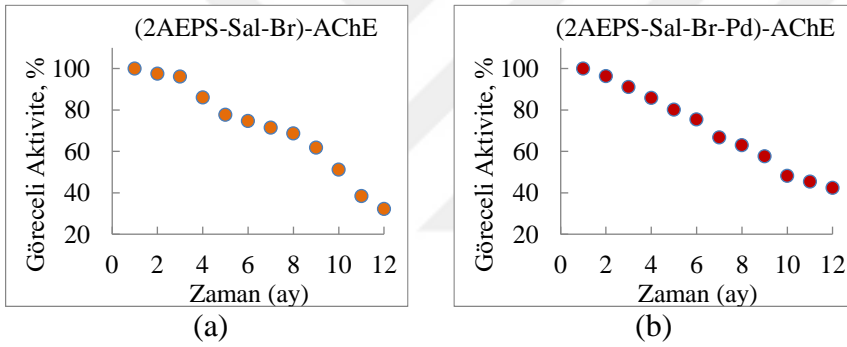


Şekil 4.11. İmmobilize edilen AChE'nin tekrar kullanılabilirliği: (2AEPS-SalBr) polimerine immobilize edilen AChE (a), (2AEPS-SalBr-Pd) polimerine immobilize edilen AChE (b)

Yapılan yirmi (20) adet ölçüm sonucunda, (2AEPS-SalBr) polimerine immobilize edilen AChE aktifliğinin %29,86'sını korurken, (2AEPS-SalBr-Pd) polimerine immobilize edilen AChE'nin aktifliğinin % 42,02'sini koruduğu bulunmuştur.

4.2.5. İmmobilize AChE enziminin depolama kararlılığı

İmmobilize AChE'nin oda koşullarında saklanması ve aktivitesini ne kadar süreyle devam ettirdiğini takip etmek için depolama kararlılığı deneyleri Bölüm 3.4.5'te belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen UV-GB spektrumlarında 412 nm'deki absorbans değerleri dikkate alınarak zamana karşı % bağıl aktivite grafikleri çizilmiştir. Her ay alınan ölçümlere 12 ay boyunca devam edilip elde edilen verilerden Şekil 4.12'deki grafik elde edilmiştir.



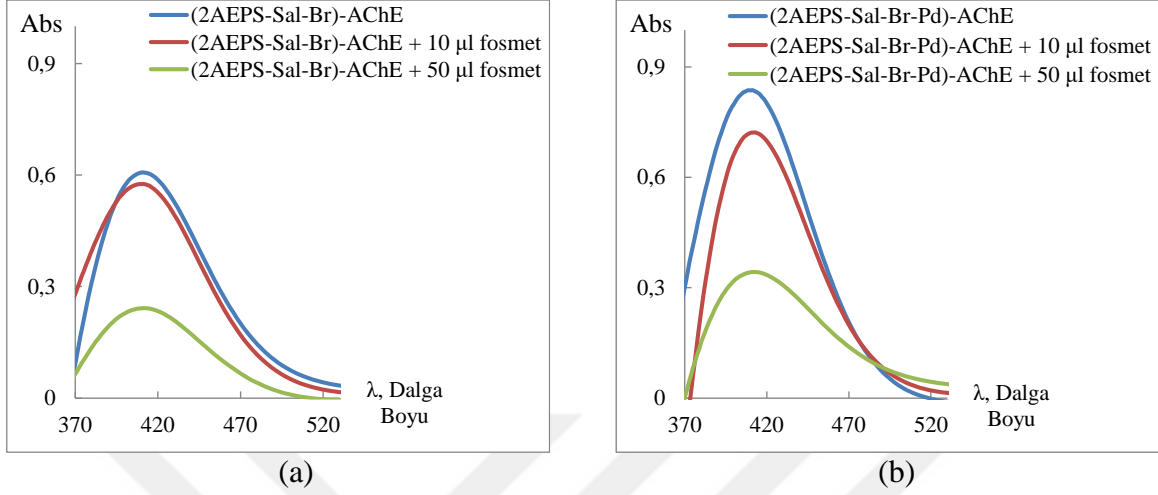
Şekil 4.12. İmmobilize AChE'nin zamana bağlı gösterdiği bağıl aktiflik: (2AEPS-SalBr) polimerine immobilize AChE (a), (2AEPS-SalBr-Pd) polimerine immobilize edilen AChE (b)

(2AEPS-SalBr) polimerine immobilize AChE enziminin 12. ay sonunda bağıl aktifliğinin %32,18'ini, (2AEPS-SalBr-Pd) polimerine immobilize AChE enziminin 12. ay sonunda bağıl aktifliğinin %42,41'ini koruduğu belirlenmiştir. (2AEPS-SalBr-Pd) polimerine immobilize edilen AChE için depolama kararlılığının daha iyi olması AChE ile destek arasında daha kuvvetli bir etkileşim gerçekleştiği şeklinde yorumlanabilir.

4.2.6. İmmobilize AChE enzimi ile pestisit tayini

Polimerik desteklere immobilize edilen AChE (Asetilkolinesteraz) enzim aktifliğinin inhibisyonu üzerine pestisitlerin (İmidan fosmet, Vantex) etkisi Bölüm 3.4.6'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Polimerik desteklere immobilize edilen AChE'nin bağıl

aktivitesi üzerine pestisitlerin etkisi ile ilgili grafikler Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te, 412nm'deki absorbans değişimlerine ait değerler Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6'da verilmiştir.

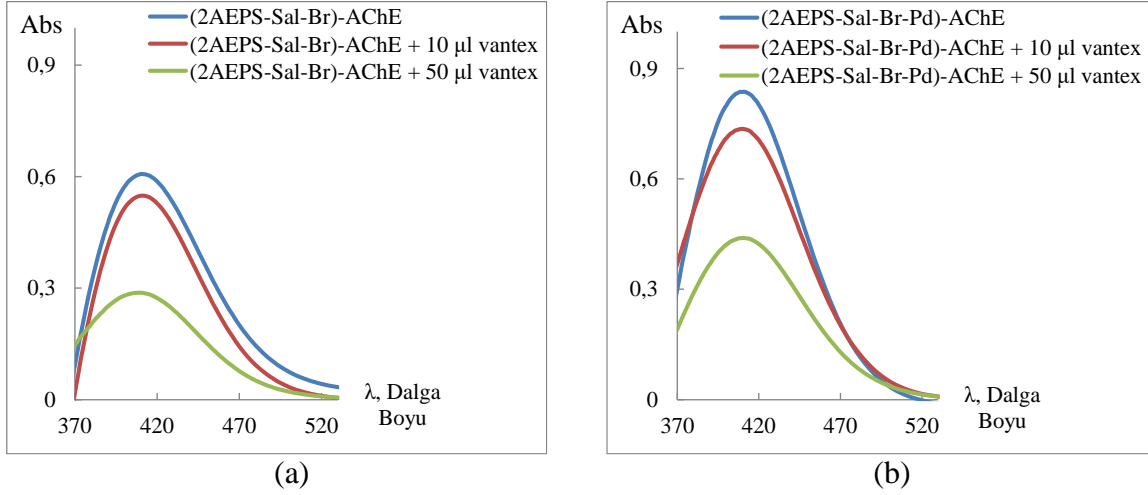


Şekil 4.13. AChE'nin bağıl aktifliği üzerine Imidan fosmet pestisitinin etkisi: (2AEPS-SalBr) polimerine immobilize AChE (a), (2AEPS-SalBr-Pd) polimerine immobilize (AChE) (b)

Çizelge 4.5. İmmobilize AChE'nin % bağıl aktiflikleri üzerine Imidan Fosmet pestisitinin etkisi

Eklenen Pestisit Hacimleri	Bağıl Aktivite %	
	(2AEPS-SalBr)-AChE	(2AEPS-SalBr-Pd)-AChE
0 µL	100 %	100 %
10 µL	94,89%	86,36%
50 µL	39,90%	41,01%

İmmobilize AChE ve onun substratı olan asetiltiyokolin iyodür (ATCh) ile verdiği reaksiyon ortamına; bir organofosfat pestisiti olan Imidan fosmet, farklı hacimlerde (0 µL, 10 µL ve 50 µL) ilave edildiğinde AChE'nin bağıl aktivitesinde belirgin bir düşüş gözlenmiştir. 50 µL pestisit ilavesinde (2AEPS-SalBr) polimerine immobilize AChE'nin bağıl aktivitesinin %39,90'ını, (2AEPS-SalBr-Pd) polimerine immobilize AChE'nin bağıl aktivitesinin %41,01'ini koruduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.14. AChE'nin bağıl aktifliği üzerine İmidan fosmet pestisitinin etkisi: (2AEPS-SalBr) polimerine immobilize AChE (a), (2AEPS-SalBr-Pd) polimerine immobilize (AChE) (b)

Çizelge 4.6. İmmobilize AChE'nin % bağıl aktiflikleri üzerine Vantex pestisitinin etkisi

Eklenen Pestisit Hacimleri	Bağıl Aktivite %	
	(2AEPS-SalBr)-AChE	(2AEPS-SalBr-Pd)-AChE
0 μL	100 %	100 %
10 μL	90,46%	87,84%
50 μL	47,25%	52,47%

İmmobilize AChE ve onun substratı olan asetiltiyokolin iyodür (ATCh) ile verdiği reaksiyon ortamına; pretroid pestisiti olan Vantex, farklı hacimlerde (0 μL , 10 μL ve 50 μL) ilave edildiğinde AChE'nin bağıl aktivitesinde belirgin bir düşüş gözlenmiştir. 50 μL pestisit ilavesinde (2AEPS-SalBr-Pd) polimerine immobilize AChE'nin bağıl aktivitesinin %47,25'ini, (2AEPS-SalBr-Pd) polimerine immobilize AChE'nin bağıl aktivitesinin %52,47'sini koruduğu belirlenmiştir.

4.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Çalışmada önce AChE enzimini immobilize etmek için destek materyalleri sentezlenip karakterizasyonları (FT-IR, GPC, SEM/EDX ve element analizi ile) yapılmıştır. Daha sonra sentezlenen destek polimerlerine AChE enzimi immobilize edilmiştir. İmmobilize AChE enzimi için optimum çalışma koşulları (pH ve sıcaklık), kinetik parametreler (K_m ve V_{mak}) belirlenip, immobilize AChE'nin biyokataliz özellikleri tespit edilmiştir.

Polimerik desteklere immobilize edilen AChE'nin aktifliğinin inhibisyonu üzerine pestisitlerin (Imidan fosmet, Vantex) etkisi incelenmiştir.

(2AEPS-SalBr) ve (2AEPS-SalBr-Pd) polimerlerine immobilize AChE için optimum pH değerleri serbest enzimin de optimum pH değeri ile aynı bulunması enzimin mikroçevresinin immobilizasyon koşullarından etkilenmediği yönünde değerlendirilebilir.

İmmobilize enzimin, serbest enzime göre daha yüksek sıcaklıklardaki çalışma şartlarında kullanılabilmesi görülmüştür.

Km değerlerine bakılarak (2AEPS-SalBr-Pd) polimerine immobilize edilen enzimin substratına olan ilgisinin (2AEPS-SalBr) polimerine immobilize enzime göre daha fazla olduğu görülmüştür.

AChE enziminin pestisitler tarafından inhibe edilmesi prensibine dayanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda, immobilize AChE'nin çok düşük miktardaki pestisit varlığında enzim aktifliğinin önemli ölçüde etkilendiği bulunmuştur.

4.4. Öneriler

Asetilkolinesteraz enziminin optimum koşulları ve kinetik parametrelerinin geliştirilmesi için farklı Schiff bazı içeren polimerlere immobilizasyon çalışmalarının yapılabileceği düşünülmektedir.

Geliştirilen polimer enzim sisteminin atık su bertarafında kullanılabilirliği, sentezlenen polimerlere başka enzimlerin immobilize edilebilirliğinin araştırılabileceği öngörülmektedir.

Geliştirilen polimer enzim sisteminin su ve gıda gibi farklı örneklerde Imidan fosmet ve Vantex pestisitlerinin belirlenmesinde kullanılabilmesi düşünülmektedir. Yapılacak yeni çalışmalarla diğer pestisitlerin belirlenmesinde de geliştirilen polimer enzim sisteminin kullanılabilirliğinin araştırılabileceği öngörülmektedir.



KAYNAKLAR

1. Pundir, C.S., and Chauhan, N. (2012). Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. *Analytical Biochemistry*, 429(1), 19-31.
2. Song, Y., Zhang, M., Wang, L., Wan, L., Xiao, X., Ye, and S., Wang, J. (2011) A novel biosensor based on acetylcholinesterase/prussian blue-chitosan modified electrode for detection of carbaryl pesticides. *Electrochimica Acta*, 56(21), 7267-7271.
3. Kestwal, M.R., Bagal-Kestwal, D., and Chiang, B.H. (2015). Fenugreek hydrogel agarose composite entrapped gold nanoparticles for acetylcholinesterase based biosensor for carbamates detection. *Analytica Chimica Acta*, 886, 143-150.
4. Liu, W.T. (2006). Nanoparticles and their biological and environmental applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(1), 1-7.
5. Guo, C., Boullanger, P., Jiang L., and Liu T. (2007). Highly sensitive gold nanoparticles biosensor chips modified with a self-assembled bilayer for detection of Con A. *Biosensor Bioelectron.* 22(8), 1830-1834.
6. Upadhyay, S., Rao, G.R., Sharma, M.K., Bhattacharya B.K., Rao, V.K., and Vijayaraghavan R. (2009). Immobilization of acetylcholinesterase-choline oxidase on a gold platinum bimetallic nanoparticles modified glassy carbon electrode for the sensitive detection of organophosphate pesticides, carbamates, and nerve agents. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(4), 832-838.
7. Re, F., Moresco, R., and Masserini M. (2012). Nanoparticles for neuroimaging. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 45(7), 1-12.
8. Patra, A. K., Kundu, S. K., Bhaumik, A., and Kim D. (2016). Morphology evolution of single-crystalline hematite nanocrystals: magnetically recoverable nanocatalysts for enhanced facet-driven photoredox activity. *Royal Society of Chemistry*, 8(1), 365-377.
9. Jellinek, J. (2008). Nanoalloys: tuning properties and characteristics through size and composition. *Faraday Discussions*, 138, 11-35.
10. Barber, D. J., and Freestone I. C., (1990). An investigation of the origin of the lycurgus cup by analytical transmission electron microscopy. *Archaeometry*, 32(1), 33-45
11. Padeletti, G., and Fermo, P. (2003). How the masters in Umbria, Italy, generated and used nanoparticles in art fabrication during the Renaissance period. *Applied Physics A-Materials Science & Processing*, 76(4), 515-525.
12. Ayhan, F., Yousefi Rad, A., and Ayhan, H. (2003). Biocompatibility investigation and urea removal from blood by urease-immobilized HEMA incorporated poly(ethyleneglycol dimethacrylate) microbeads. *Journal of Biomedical Material Research B Applied Biomaterials*, 64B(1), 13-18.

13. Hermason, G. T., (2013). Microparticles and Nanoparticles, *Bioconjugate Techniques*, (Third Edition), London: Elsevier, 549-587.
14. Abraham, S. (2016). Spectrofluorometric studies of the effect of ZnO nanoparticles on bovine serum albumin. *International Journal of Technical Research and Applications*, 4(1), 108-113.
15. Illum L (2007). Nanoparticulate systems for nasal delivery of drugs: a real improvement over simple systems? *Journal of Pharmaceutical Science*, 96(3), 473–483.
16. Singh, A., Garg, G., and Sharma, P.K. (2010). Nanospheres: a novel approach for targeted drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 5(3), 84-88.
17. Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R., and Rudzinski W.E. (2000). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 70(1-2), 1-20.
18. Betancor, L., Luckarift, H.R. (2008). Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis. *Trends in Biotechnology*, 26(10), 566–572.
19. Kim, J., Grate, J.W., and Wang, P. (2008). Nanobiocatalysis and its potential applications, *Trends in Biotechnology*, 26(11), 639–646.
20. Kim, J., Grate, J.W., and Wang, P. (2006). Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical Engineering Science*, 61(3), 1017–1026.
21. El-Boubbou, K., Landry, C. C (2013). Nanoparticles in Biocatalysis. In S. L. Suib, (Editor), *New and Future Developments in Catalysis, Catalysis by Nanoparticles*. London: Elsevier, pp. 95-123.
22. To, W. P., Liu, Y., Lau, T. C., and Che, C. M. (2013). A robust Palladium(II)-Porphyrin complex as catalyst for visible light induced oxidative C-H functionalization. *Chemistry European Journal*, 19(18), 5654-5664.
23. Kang, J. G., Cho, H. K., Park, C., Kang, S. K., Kim I. T., Lee, S. W., Lee, H. H., Lee, Y. N., Cho, S. H., Lee, J. H., and Lee, S. H. (2008). Structural and Optical Properties of Pd(II) Complex with 1-Nonyl-3,4-bis(methylthio)pyrrole. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 29(3), 679-681.
24. Kalaivani, P., Prabhakaran, R., Dallemer, F., Poornima, P., Vaishnavi, E., Ramachandran, E., Vijaya Padma, V., Renganathand, R., and Natarajan, K. (2012). DNA, protein binding, cytotoxicity, cellular uptake and antibacterial activities of new palladium(II) complexes of thiosemicarbazone ligands: effects of substitution on biological activity. *Metallomics*, 4(1), 101-113.
25. Amatori, S., Ambrosi, G., Provenzano, A.E., Fanelli, M., Formica, M., Fusi, V., Giorgi, L., Macedi, E., Micheloni, M., Paoli, P., and Rossi, P. (2016). Pd(II) and Pt(II) complexes with a thio-aza macrocycle ligand containing an intercalating fragment:

- structural and antitumor activity studies. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 162, 154-161.
26. Carvalho, M. A., Souza, B. C., Paiva, R. E. F., Bergamini, F. R. G., Gomes, A. F., Gozzo, F. C., Lustri, W. R., Formiga, A. L. B., Rigatto, G., and Corbi, P. P. (2012). Synthesis, spectroscopic characterization, DFT studies, and initial antibacterial assays in vitro of a new palladium(II) complex with tryptophan. *Journal of Coordination Chemistry*, 65(10), 1700–1711.
 27. Abbehausen, C., Sucena, S. F., Lancellotti, M., Heinrich, T. A., Abrão, E. P., Costa-Neto, C. M., Formiga, A. L. B., and Corbi, P. P. (2013). Synthesis, spectroscopic characterization, DFT studies, and antibacterial and antitumor activities of a novel water soluble Pd(II) complex with L-alliin. *Journal of Molecular Structure* 1035, 421–426.
 28. Omole, M. A., K’Owino I., and Sadik, O. A. (2009). Nanostructured Materials for Improving Water Quality: Potentials and Risks. In A. Street, R. S. Jeremiah and D. N. Savage (Eds.) *Nanotechnology Applications for Clean Water*. USA: William Andrew, pp. 233-247.
 29. Pradeep, T., and Bootharaju, M.S. (2014). Noble metal nanosystems for the detection and removal of pollutants in drinking water. In S. Ahuja (Editor), *Water Reclamation and Sustainability*. USA: Elsevier, 317-342.
 30. Deraedt, C., and Astruc, D. (2013). “Homeopathic” palladium nanoparticle catalysis of cross carbon-carbon coupling reactions. *Accounts of Chemical Research*, 47(2), 494-503.
 31. Akiyama, R. and Kobayashi, S. (2003). The polymer incarcerated method for the preparation of highly active heterogeneous palladium catalysts. *Journal of the American Chemical Society*, 125(12), 3412-3413.
 32. Marrodon, C.M., Barbaro, P., Catalano, M., and Taurino A. (2012). Green production of polymer-supported PdNPs: application to the environmentally benign catalyzed synthesis of cis-3-hexen-1-ol under flow conditions. *Dalton Transactions*, 41, 12666-12669.
 33. Phan, N.T.S., Van Der Sluys, M., and Jones, C.W. (2006). On the nature of the active species in Palladium catalyzed Mizoroki–Heck and Suzuki–Miyaura couplings - homogeneous or heterogeneous catalysis, a critical review. *Advanced Synthesis Catalysis*, 348, 609-679.
 34. Brena, B.M, Batista-Viera, F. (2006). Immobilization of enzymes. In J. M. Guisan (Editor). *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*, Totowa, NJ: Humana Press, 15-30.
 35. Twyman, R.M. (2005). Immobilized enzymes, In P. Worsfold, A. Townshend and C. Poole (Editors.), *Encyclopedia of Analytical Science* (Second Edition). Vol. 2, London, UK: Elsevier, 523-529.

36. Brady, D., Jordaan, J. (2009). Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnology Letters*, 31(11), 1639-1650.
37. Hwang, E.T., and Gu, M.B. (2013). Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials. *Engineering in Life Sciences*, 13(1), 49-61.
38. Khan, A.A, and Alzohairy, M.A. (2010) Recent advances and applications of immobilized enzyme technologies: a review. *Research Journal of Biological Sciences*, 5(8), 565–575.
39. Guisan, J.M. (2006). Immobilization of enzymes as the 21st century begins: an already solved problem or still an exciting challenge? In J.M. Guisan (Editor). *Immobilization of enzymes and cells* (Second Edition), Totowa, NJ: Humana Press Inc., pp. 1–15.
40. Belfer, S. (2003). Modification of ultrafiltration polyacrylonitrile membranes by sequential grafting of oppositely charged monomers: pH-dependent behavior of the modified membranes. *Reactive & Functional Polymers*, 54(1-3), 155-165.
41. Cao, L. (2005). Immobilised enzymes: science or art?, *Current Opinion in Chemical Biology*, 9(2), 217–226.
42. Binswanger, H. (2002). *Enzyme Kinetics: principles and methods*. Translated by Bubenheim, L. WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim (Federal Republic of Germany), 51-75.
43. Rogers A., Gibon Y. (2009). Enzyme Kinetics: Theory and Practice, In J. Schwender (Editor) *Plant Metabolic Networks*. New York: Springer, 71-103.
44. Pohanka, M. (2011). Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 155(3), 219-229.
45. Kaplay S.S., (1976). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase of developing human brain. *Biol Neonate*, 28(1-2), 65–73.
46. Rao, A.A., Sridhar, G.R., and Das, U.N. (2007). Elevated butyrylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Medical Hypotheses*, 69(6), 1272-1276.
47. Quinn, D.M. (1987). Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews*, 87(5), 955–979.
48. Skladal, P. (1996). Biosensors based on cholinesterase for detection of pesticides. *Food Technology and Biotechnology*, 34(1), 43-49.
49. Güven, A. (2000). Asetilkolinesterazın Önemi ve İnhibitörleri. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1-2), 145-151.

50. İnternet: Torpedo marmorata (marbled electric ray) Acetylcholinesterase URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fswissmodel.expasy.org%2Frepository%2FuniProt%2F07692.html&date=2017-06-14>, Son Erişim Tarihi: 14.06.2017.
51. Sirin, G.S., Zhou, Y., Lior-Hoffman, L., Wang, S., and Zhang, Y. (2012). Aging mechanism of soman inhibited acetylcholinesterase. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(40), 12199-12207.
52. Shen, T., Tai, K., Henchmen R.H., and Mccammon, J.A. (2002). Molecular dynamics of acetylcholinesterase. *Accounts of Chemical Research*, 35(6), 322-340.
53. Nair, V.P., and Hunter, J.M. (2004) Anticholinesterases and anticholinergic drugs. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, 4(5), 164-168.
54. İnternet: Cholinesterase Inhibitors: Including Insecticides and Chemical Warfare Nerve Agents Part 2: What are cholinesterase inhibitors?. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.atsdr.cdc.gov%2Fceem%2Fceem.asp%3Fceem%3D11%26po%3D5&date=2017-09-11>, Son Erişim Tarihi: 14.06.2017.
55. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., and Robert, M. (1961). Featherstone. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95.
56. Liu, B., Yang Y.H., Wu, Z.Y., Wang, H., Shen, G.L., and Yu, R.Q. (2005). A potentiometric acetylcholinesterase biosensor based on plasmopolymerized film. *Sensors and Actuators B*, 104(2), 186–190.
57. Can Demirdöğen, B. (2010). Organofosfatlı pestisit zehirlenmeleri ve serum paraoksonaz 1 (Pon1) enziminin organofosfat metabolizmasındaki rolü. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 67(2), 97-112.
58. Marinov, I., Ivanov, Y., Gabrovska, K., and Godjevargova, T. (2010). Amperometric acetylthiocholine sensor based on acetylcholinesterase immobilized on nanostructured polymer membrane containing gold nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(1), 67-75.
59. Chen, Z., Newcomb, R., Forbes, E., McKenzie, J., and Batterham, P. (2001). The acetylcholinesterase gene and organophosphorus resistance in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(8), 805-816.
60. Mangas, I., Vilanova, E., Estevez, J., and França T.C.C. (2016). Neurotoxic effects associated with current uses of organophosphorus compounds. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(5), 809-825.
61. United States Environmental Protection Agency. (2000). Human health risk assessment, Phosmet. Office of Pesticide Programs, Washington, D.C. February 9, 2000.

62. United States Environmental Protection Agency. (2010). Risks of phosmet use to federally threatened and endangered California tiger salamander (*Ambystoma californiense*). Environmental Fate and Effects Division, Office of Pesticide Programs, Washington, D.C. March 29, 2010.
63. İnternet: Pyrethrins and Pyrethroids. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.epa.gov%2Fingredients-used-pesticide-products%2Fpyrethrins-and-pyrethroids&date=2017-09-11>, Son Erişim Tarihi: 11.09.2017.
64. Roberts, J. R., Reigart J. R. (2013). Recognition and management of pesticide poisonings. United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Washington, D.C.
65. Frediksen, H.K., Kristensen, H.G., and Pedersen, M. (2003). Solid lipid microparticle formulations of the pyrethroid gamma-cyhalotrin-incompatibility of the lipid and the pyrethroid and biological properties of the formulations. *Journal of Controlled Release*, 86(2-3), 243-252.
66. Winjngaarden, R.P.A., Barber, I., and Brock, T.C.M. (2009). Effects of the ppyrethroid insecticide gamma-cyhalothrin on aquatic invertebrates in laboratory and outdoor microcosm tests. *Ecotoxicology*, 18(2), 211-224.
67. Giddings J.M., Barber, I., and Warren-Hicks, W. (2009). Comparative aquatic toxicity of the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin and its resolved isomer gamma-cyhalothrin. *Ecotoxicology*, 18(2), 239-249.
68. Dutta, K., Bhattacharyay, D., Mukherjee, A., Setford, S.J., Turner, A.P.F., and Sarkar, P. (2008). Detection of pesticide by polymeric enzyme electrodes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69(3), 556-561.
69. Sassolas, A., Simon, B.P., and Marty, J.L. (2012). Biosensors for pesticide detection: new trends, *American Journal of Analytical Chemistry*, 3(3), 210-232.
70. Noguer, T., Leca, B., Jeanty, G., and Marty, J.-L. (1999) Biosensors based on enzyme inhibition: detection of organophosphorus and carbamate insecticides and dithiocarbamate fungicides, *Field Analytical Chemistry & Technology*, 3(3), 171-178.
71. Hasanoğlu Özkan, E., Kurnaz Yetim, N., Tümtürk, H., and Sarı, N. (2015). Immobilization of acetylcholinesterase on Pt(II) and Pt(IV) attached nanoparticles for the determination of pesticides. *Dalton Transactions*, 44(38), 16865-16872.
72. Yin, H., Ai, S., Xu, J., Shi, W., and Zhu, L. (2009). Amperometric biosensor based on immobilized acetylcholinesterase on gold nanoparticles and silk fibroin modified platinum electrode for detection of methyl paraoxon, carbofuran and phoxim. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 637(1-2), 21-27.

73. Yang, L., Wang, G., and Liu, Y. (2013). An acetylcholinesterase biosensor based on platinum nanoparticles–carboxylic graphene–nafion-modified electrode for detection of pesticides. *Analytical Biochemistry*, 437(2), 144-149.
74. Mukhametshina, A.R., Fedorenko, S.V., Zueva, I.V., Petrov, K.A., Massson, P., Nizameev, I.R., Mustafina, A.R., and Sinyashin, O.G. (2016). Luminescent silica nanoparticles for sensing acetylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of acetylcholine. *Biosensors and Bioelectronics*, 77, 871-878.
75. Shriver-Lake, L.C., Charles, P.T., Adams, A.A., Fontana, J., and Martin, B.D. (2016). A simple approach to a vastly improved acetylcholinesterase activity and stability at elevated temperatures using magnetic microbeads and poly(N-(3-aminopropyl methacrylamide)) hydrogel supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 134(A), 61-69.
76. Saleem, M., Rafiq, M., Seo, S.Y., and Lee, K.H. (2016). Acetylcholinesterase immobilization and characterization, and comparison of the activity of the porous silicon-immobilized enzyme with its free counterpart. *Bioscience Reports*, 36(2), 1-11.
77. Tümtürk, H., and Yüksekdağ, H. (2016). Acetylcholinesterase immobilized onto PEI-coated silica nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(2), 443-447.
78. Nanda Kumar D., Alex S.A., Chandrasekaran, N., and Mukherjee, A. (2016). Acetylcholinesterase (AChE)-mediated immobilization of silver nanoparticles for the detection of organophosphorus pesticides. *Royal Society of Chemistry Advances*, 69, 64769-64777.
79. Demirci, G., İspirli Doğaç, Y., and Teke, M. (2015). A selective molecularly imprinted polymer for immobilization of acetylcholinesterase (AChE): an active enzyme targeted and efficient method. *Journal of Molecular Recognition*, 28(11), 645-650.
80. Hasanoğlu Özkan, E., Kurnaz Yetim, N., Nartop, D., and Sarı, N. (2015). Influence of load on the recycling stability of nanospheres attached platinum II / IV for determination of glucose. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 25, 180-185.





EKLER

EK-1. Bilimsel Ulusal Kongrede Basılan Bildiri

Karmaz, E., Kurnaz Yetim N., Hasanoğlu Özkan, E., Sarı, N., (2016). *Pd(II) İyonu İçeren Polimerin Hazırlanması ve İmmobilize Asetilkolinesteraz Enziminin Optimum ve Kinetik Parametrelerinin Araştırılması*, VI. Ulusal Polimer Bilim ve Teknoloji Kongresi, 4-7 Eylül 2016, Ankara, TÜRKİYE.



Pd(II) İyonu İçeren Polimerin Hazırlanması ve İmmobilize Asetilkolinesteraz Enziminin Optimum ve Kinetik Parametrelerinin Araştırılması

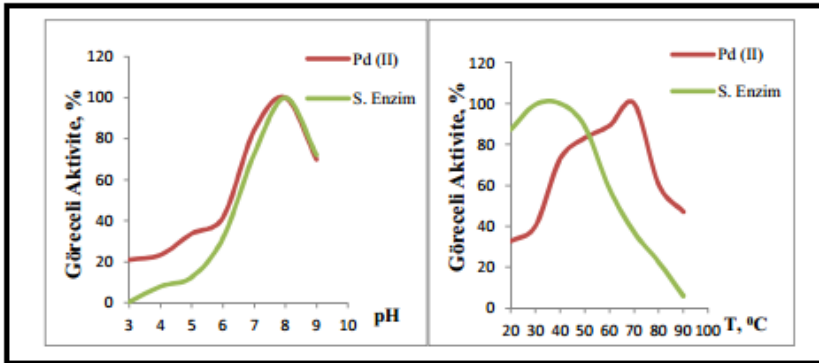
Emre KARMAZ¹, Nurdan KURNAZ YETİM^{1,2}, Elvan HASANOĞLU ÖZKAN¹, Nurşen SARI¹

¹Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, 06500 Teknikokullar, Ankara

²Kırklareli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Kırklareli
ekarmazz@gmail.com

AChE ilk defa 1938 yılında elektrik balığının (*Torpedo marmorata*) elektrik organından ekstraksiyon yoluyla saflaştırılmıştır. Kolinesteraz, asetilkolini hidrolize etme yeteneğine sahiptir. Sistematik adı EC 3.1.1.7 dir ve eritrositlerde, karaciğerde, dalakta, sinir uçlarında, beyin gri cevherinde bulunmuştur. Doğal substrat olan asetilkolinin (AX) hidrolizinde, enzim-substrat kompleksi (EH.AX) oluşumunu, kolin molekülünün (HX) açığa çıkışı ve ardından asetik asit (AOH) ile hidrolizlenecek asetillenmiş enzim (EA) formu oluşur, daha sonra tekrar enzim serbest formuna döner [1, 2].

Bu çalışmada; Pd(II) kompleksinin takılması için tris(2-aminoetil)amino polimerinden faydalandı. Önce, tris(2-aminoetil)amin ile salisilaldehit türevinin katılma-ayırılma tepkimesi sonucunda yeni Schiff bazı içeren polimer sentezlendi. Kalıp yöntemine göre de Pd(II) kompleksi sentezlendi [3]. Hazırlanan destek polimere AChE enzimini immobilize edilerek optimum çalışma koşulları ve destek materyalin enzime karşı ilgisi belirlendi. Optimum pH= 8 olarak bulunurken, sıcaklık 70 °C olarak tespit edildi. Bu şartlardaki K_m/V_{max} değerleri 0.678 mM /0.232 mM min⁻¹ olarak bulundu.



Kaynaklar

- [1] Skadal, P. 1992, Detection of organophosphate and carbamate pesticides using disposable biosensors based on chemically modified electrodes and immobilized cholinesterase, *Anal. Chim. Acta*, **269**, 281-287, (1992).
- [2] Lai, M., J. and Who, J. Inhibition of cholinesterase by insecticides, *Biochemical Education*, **25**(4), 235-237, (1997).
- [3] Hasanoğlu Özkan, E., Kurnaz Yetim, N., Tümtürk, H., Sarı, N. Immobilization of acetylcholinesterase on Pt(II) and Pt(IV) attached nanoparticles for the determination of pesticides *Dalton Trans.* **44**, 16865–16872, (2015).

EK-2. Bilimsel Uluslararası Kongrede Basılan Bildiri

Kurnaz Yetim, N., Hasanoğlu Özkan, E., Karmaz E., Sarı, N. (2016). *Double-Arm Schiff Bases-Tagged Nanomaterial; Synthesis and Acetylcholinesterase Immobilization*, 3rd International Congress on Biosensors, October, 5-7, 2016, Ankara, TURKEY.



Poster Presentation – PP0222

Double-Arm Schiff Bases-Tagged Nanomaterial; Synthesis and Acetylcholinesterase Immobilization

N. Kurnaz Yetim^{1,2*}, E. Hasanoğlu Özkan¹, E. Karmaz¹ and N. Sarı¹

¹ Department of Chemistry, Gazi University, Ankara, Turkey

² Department of Chemistry, Kırklareli University, Kırklareli, Turkey

*Presenter: nurdankurnaz81@gmail.com

Introduction

Recently there has been a considerable interest in the material chemistry of nanoparticles involving metal ion because of their potential medicine and industrial applications [1]. The use of nanoparticles in medicine and more specifically drug delivery is set to spread rapidly. Nanoparticles involving metal ion play a very important role not only in chemical reactions (enzymatic reactions) in the human body but also in industrial chemical processes [2]. AChE biosensors have been used to detect unknown toxic mixtures, but there are some problems with the identification of toxic mixtures in samples. Therefore, new methods are being investigated by authors. One of these methods is the immobilization of enzymes onto nanospheres. There has been an increase in studies on enzyme immobilization on nanospheres due to their small size and large surface area. Nanospheres are useful for improving the operational stability of immobilization. Therefore enzyme immobilization into or onto various nanoparticles has been proposed and reported.

Experimental

To prepared such a support, the N-[2-[Bis(2-aminoethyl)amino]ethyl]aminomethyl-polystyrene (2AEPS) reacted with 2-bromo salicylaldehyde by means of condensation method.

4.1. Immobilization of AChE on nanomaterial (2AEPS-SalBr)

After dissolving enzyme in pure water (50 mL, 3.6×10^{-4} gL⁻¹), 2AEPS-SalBr polymer (0.5 g) was placed to a 2 mL of 3.6×10^{-4} gL⁻¹ of AChE. This solution was diluted to 10 ml and at room temperature in a shaking water bath for 8 h. The immobilized polymer was separated and the free enzyme was removed by washing with phosphate buffer and then stored at +4 °C.

Conclusion

The apparent kinetic parameters of the immobilized enzyme and free enzyme were compared, and this showed that the Michaelis constant (*K_m*) of the immobilized AChE was higher than that of the free AChE, while there was a significant difference in the maximum reaction rates (*V_{max}*).

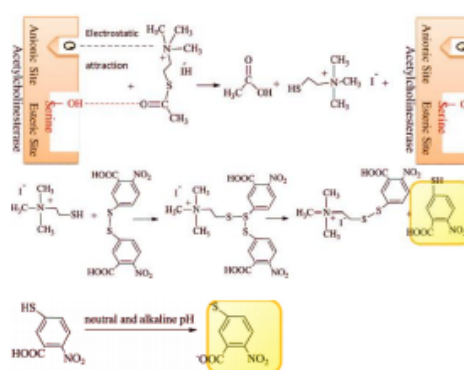


Figure 1 Mechanism for the catalytic activity of AChE

Kinetic parameters were studied for free AChE and immobilized AChE optimum at pH=8.0 and optimum temperature (50 °C). *K_m/V_{max}* values were calculated from Lineweaver-Burk plots for immobilized AChE to the novel support, 1.443 mM and 0.251 mMmin⁻¹ respectively for 50 °C. patterns because they may not be reproduced properly.

Table 1 Kinetic parameters (*K_m/V_{max}*; mM/mM min⁻¹) for free AChE and immobilized AChE

	pH	Temp. (°C)	<i>K_m/V_{max}</i> (mM/min ⁻¹)
Free Enzyme	8	50	0.146/1.85
AChE-2AEPS-SalBr	8	50	1.443/0.251

References

- [1] M.C.Daniel, D. Astruc, J. Chem. Rev. 104 (2004) 293.
- [2] W.H. De Jong, P.J.A. Borm, Int. J. Nanomed. 3 (2) (2008) 133.
- [3] E. Hasanoğlu Özkan, N. Kurnaz Yetim, D. Nartop and N. Sarı, J. Indian Eng. Chem., 25 (2015), 180.
- [4] N. Özdem, E. Hasanoğlu Özkan, N. Sarı, F. Arslan and H. Tümtürk, Macromol. Res. 22(12) (2014) 1282.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Karmaz, Emre
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 26.11.1987, Ankara
 Medeni hali : Evli
 e-mail : emre.karmaz@gazi.edu.tr



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi / Kimya Bölümü	Devam Ediyor
Lisans	Erciyes Üniversitesi / Kimya Bölümü	2010

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2013-Halen	Toprak, Gübre ve Su Kaynakları Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	Kimyager
2011-2013	Aricılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	Kimyager

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Karmaz, E., Kurnaz Yetim N., Hasanoğlu Özkan, E., Sarı, N., (2016). *Pd(II) İyonu İçeren Polimerin Hazırlanması ve İmmobilize Asetilkolinesteraz Enziminin Optimum ve Kinetik Parametrelerinin Araştırılması*, VI. Ulusal Polimer Bilim ve Teknoloji Kongresi, 4-7 Eylül 2016, Ankara, Türkiye.
2. Kurnaz Yetim, N., Hasanoğlu Özkan, E., Karmaz E., Sarı, N. (2016). *Double-Arm Schiff Bases-Tagged Nanomaterial; Synthesis and Acetylcholinesterase Immobilization*, 3rd International Congress on Biosensors, October, 5-7, 2016, Ankara, Turkey.



GAZİ GELECEKTİR..