



**FERROSEN İÇEREN YENİ Pd(II), Pt(II) DENDRONLARININ SENTEZİ
VE İMMOBİLİZASYONDA KULLANIMI**

Elvan HASANOĞLU ÖZKAN

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KASIM 2016

Elvan HASANOĞLU ÖZKAN tarafından hazırlanan “FERROSEN İÇEREN YENİ Pd(II), Pt(II) DENDRONLARININ SENTEZİ VE İMMOBİLİZASYONDA KULLANIMI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi KİMYA Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Nurşen SARI

Kimya, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Başkan: Prof. Dr. Nurcan KARACAN

Kimya, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Prof. Dr. Zeliha HAYVALI

Kimya, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Prof. Dr. Ayşen YILMAZ

Kimya, Orta Doğu Teknik Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Doç. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK

Kimya, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Tez Savunma Tarihi: 22/11/2016

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

.....

Prof. Dr. Hadi GÖKÇEN
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.

Elvan HASANOĞLU ÖZKAN

22/11/2016

FERROSEN İÇEREN YENİ Pd(II), Pt(II) DENDRONLARININ SENTEZİ VE İMMOBİLİZASYONDA KULLANIMI

(Doktora Tezi)

Elvan HASANOĞLU ÖZKAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kasım 2016

ÖZET

Bu çalışmada, önce ferrosen çekirdekli birinci (1J) ve ikinci jenerasyon (2J) dendronlar sentezlenmiş, daha sonra amino fenol türevleri, Pd(II) veya Pt(II) katyonları ile “kalıp” yöntemi kullanılarak genişletilmiş ikinci jenerasyon dendronlar [2J-X-Pd(II) ve 2J-X-Pt(II)] (X; -H, -NO₂, -CH₃) elde edilmiştir. Sentezlenen dendronların yapıları, FT-IR, UV-Vis, ¹H-NMR, AAS, LC-MS, MALDI-TOF MS, termal analiz (TGA), molar iletkenlik ve magnetik süsseptibilite ölçümleriyle aydınlatılmıştır. 2J, 2J-X-Pd(II) ve 2J-X-Pt(II) dendronlarına glukoz oksidaz (GOx) ve asetilkolinesteraz (AChE) enzimleri immobilize edilmiş ve optimizasyon parametreleri (pH, sıcaklık, substat derişimi, tekrar kullanım, depolama kararlılığı) belirlenmiştir. *Michaelis-Menten* eşitliği ile *K_m* (mM) ve *V_{mak}* (mM.dk⁻¹) değerleri hesaplanmıştır. İmmobilize glukoz oksidaz enziminin yapay idrar ortamında tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. İmmobilize asetilkolinesteraz enziminin pestisit (Fosmet, Karbaril, Florokloridon) tayininde kullanılabilirlikleri araştırılmıştır.

Bilim Kodu : 20103
Anahtar Kelimeler : Dendron, ferrosen, immobilizasyon, GOx enzimi, AChE enzimi, pestisit
Sayfa Adedi : 194
Danışman : Prof. Dr. Nurşen SARI

SYNTHESIS OF NEW Pd (II), Pt (II) DENDRONS CONTAINING FERROCENE AND
IMMOBILIZATION USAGE

(Ph. D. Thesis)

Elvan HASANOĞLU ÖZKAN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

November 2016

ABSTRACT

In this study, firstly, the first (1J) and second generation (2J) dendrons involving ferrocene were synthesized and then, the expanded second generation dendrimers, [2J-X-Pd(II) and 2J-X-Pt(II)] (X; -H, -NO₂, -CH₃), were obtained using “template method” with aminophenol derivatives, Pd (II) or Pt (II) cations. Their structures were characterized by molar conductivity, magnetic susceptibility thermal analyses (TGA), FT-IR, UV-Vis, ¹H-NMR, MS, LC-MS, Maldi-TOF MS methods. Glucose oxidase (GOx) and acetylcholinesterase (AChE) enzymes were immobilized on the 2J, 2J-X-Pd(II) and 2J-X-Pt(II) dendrons, and their optimization parameters (pH, temperature, substrate concentration, reusability and storage capacity) enzyme were determined. Their *K_m* (mM) and *V_{max}* (mM.min⁻¹) values were calculated from the *Michaelis-Menten* equation. The reusability of the immobilized glucose oxidase enzyme was investigated in artificial urine medium. The use of immobilized acetylcholinesterase enzyme in the determination of pesticides (Phosmet, Carbaryl, Flurochloridon) has been investigated.

Science Code : 20103

Key Words : Dendron, ferrocene, immobilization, GOx enzyme, AChE enzyme, pesticide

Page Number : 194

Supervisor : Prof. Dr. Nurşen SARI

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları aşmamda benden desteğini, yardımını ve bilgilerini eksik etmeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Nurşen SARI'ya saygı ve şükranlarımı sunarım. Çalışmalarım sırasında benden bilgi, öneri ve hoşgörülerini esirgemeyen saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Nurcan KARACAN'a, her zaman tecrübelerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Ali DİŞLİ'ye, Doç. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK'e, Doç. Dr. Fatma ARSLAN'a, uzun yıllar beraber çalıştığım arkadaşım Nurdan KURNAZ YETİM'e ve öğrenim hayatım boyunca bilgi ve desteklerini aldığım bütün hocalarıma ayrıca teşekkür ederim. Bu çalışmayı “Bazı Ferrosen türevlerinin ve Ferrosen-tabanlı makromoleküllerin sentezi” (2013 tamamlandı) ve “Yeni dendrimer ve dendron sentezi, onların biyokataliz araştırmaları” (2016 tamamlandı) isimli projelerle destekleyen Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Müdürlüğü'ne teşekkür ederim. Son olarak, benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sevgili eşime, beni bu günlere getiren, bana olan inançlarını hiçbir zaman kaybetmeyen, her zaman varlıklarıyla beni güçlendiren kıymetli annem Meliha HASANOĞLU, babam Ahmet HASANOĞLU ve ablam Kezban HASANOĞLU ATALAY'a minnet ve teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xx
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	5
2.1. Dendronlar ve Kademeli Moleküllerin Ortaya Çıkışı.....	5
2.1.1. Dendronlar ve kademeli moleküllerin kimyasal yapısı.....	7
2.1.2. Dendronlar ve kademeli moleküllerin sentez yöntemleri	9
2.1.3. Dendritik yapıların özellikleri	9
2.1.4. Dendronlar ve kademeli moleküllerin yapısal olarak sınıflandırılması	14
2.1.5. Dendritik yapıların uygulama alanları	18
2.2. Ferrosenin Tarihçesi ve Özellikleri.....	22
2.3. Enzimler ve İmmobilizasyon	28
2.3.1. Enzimler	28
2.3.2. Enzim immobilizasyonu	32
2.4. GOx ve AChE Enzimleri Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	35
2.4.1. GOx'un analitik tayinlerde kullanımı	36
2.4.2. AChE enziminin analitik tayinlerde kullanımı	39
3. MATERYAL VE YÖNTEM	49

	Sayfa
3.1. Kullanılan Cihazlar	49
3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Enzimler.....	50
3.3. Hazırlanan Çözeltiler	52
4. DENEYSEL YÖNTEM.....	55
4.1. Birinci Jenerasyon Dendronun (1J) Sentezi.....	55
4.2. İkinci Jenerasyon Dendronun (2J) Sentezi	55
4.3. Metal ile Koordine Olan Dendronların Sentezi: [(2J-XM); X: H, NO ₂ , CH ₃ ; M: Pt(II), Pd(II)].....	56
4.3.1. 2J-HPt dendronunun sentezi	58
4.3.2. 2J-HPd dendronunun sentezi	58
4.3.3. 2J-NO ₂ Pt dendronunun sentezi	59
4.3.4. 2J-NO ₂ Pd dendronunun sentezi	60
4.3.5. 2J-CH ₃ Pt dendronunun sentezi	61
4.3.6. 2J-CH ₃ Pd dendronunun sentezi	62
4.4. Dendronların Element Analizi ve Fiziksel Özelliklerinin Belirlenmesi	63
4.5. Dendronların Magnetik Duyarlık Ölçümleri	64
4.6. Dendronların İletkenlik Ölçümleri.....	66
4.7. β -Glukoz Oksidaz (GOx) Enziminin İmmobilizasyonu ve Optimizasyonu	67
4.7.1. İmmobilize edilen β -Glukoz oksidaz enziminin aktifliğine pH etkisi	69
4.7.2. İmmobilize edilen β -Glukoz oksidaz enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	69
4.7.3. İmmobilize GOx enziminin tampon çözelti ve yapay idar ortamında tekrarlanabilirliğinin tayini	70
4.7.4. İmmobilize edilen β -Glukoz oksidaz enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	71
4.7.5. İmmobilize β -Glukoz oksidaz enziminin depolama kararlılığı	72

Sayfa

4.8. Asetilkolinesteraz (AChE) Enziminin İmmobilizasyonu ve Optimizasyonu	73
4.8.1. İmmobilize edilen Asetilkolinesteraz enziminin aktifliğine pH etkisi	74
4.8.2. İmmobilize edilen Asetilkolinesteraz enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi	75
4.8.3. İmmobilize edilen Asetilkolinesteraz enziminin tekrar kullanılabilirliği ..	75
4.8.4. İmmobilize edilen Asetilkolinesteraz enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	76
4.8.5. İmmobilize Asetilkolinesteraz enziminin depolama kararlılığı	77
4.8.6. Enzim inhibitörü pestisitlerin immobilize AChE enzimi üzerine etkisi ve pestisit tayini	77
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	81
5.1. Dendronların Yapılarının Aydınlatılması	81
5.1.1. Birinci jenerasyon dendronun (1J) yapı analizi	81
5.1.2. İkinci jenerasyon dendronun (2J) yapı analizi	87
5.1.3. Metal ile koordine olan dendronların yapı analizi	94
5.2. β - Glukoz Oksidaz Enziminin (GOx) Optimizasyon Çalışmaları	103
5.2.1. Serbest ve immobilize edilen GOx enziminin aktifliğine pH etkisi	103
5.2.2. Serbest ve immobilize edilen GOx enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	108
5.2.3. İmmobilize GOx enziminin tampon çözelti ve yapay idrar ortamında tekrarlanabilirliğinin tayini	111
5.2.4. Serbest ve immobilize edilen GOx enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	115
5.2.5. İmmobilize edilen GOx enziminin depolama kararlılığı	122
5.3. Asetilkolin Esteraz Enziminin (AChE) Optimizasyon Çalışmaları.....	123
5.3.1. Serbest ve immobilize edilen AChE enziminin aktifliğine pH etkisi.....	123
5.3.2. Serbest ve immobilize edilen AChE enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	129

Sayfa

5.3.3. İmmobilize edilen AChE enziminin tekrar kullanılabilirliği	132
5.3.4. Serbest ve immobilize edilen AChE enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi.....	134
5.3.5. İmmobilize edilen AChE enziminin depolama kararlılığı	138
5.3.6. Enzim inhibitörü pestisitlerin immobilize AChE enzimi aktifliği üzerine etkisi ve pestisit tayini	140
6. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ	153
7. ÖNERİLER.....	155
KAYNAKLAR	157
EKLER.....	171
EK-1. 2J-HPt dendronunun FT-IR spektrumu.....	172
EK-2. 2J-HPd dendronunun FT-IR spektrumu.....	173
EK-3. 2J-NO ₂ Pt dendronunun FT-IR spektrumu.....	174
EK-4. 2J-NO ₂ Pd dendronunun FT-IR spektrumu.....	175
EK-5. 2J-CH ₃ Pt dendronunun FT-IR spektrumu.....	176
EK-6. 2J-CH ₃ Pd dendronunun FT-IR spektrumu	177
EK-7. Elementel analiz sonuç raporları	178
EK-7. (devam) Elementel analiz sonuç raporları.....	179
EK-8. Dendronların TGA eğrileri.....	180
EK-9. Tez dışı 1. makalemin ilk sayfası	181
EK-10. Tez dışı 2. makalemin ilk sayfası	182
EK-11. Tez dışı 3. makalemin ilk sayfası	183
EK-12. Tez dışı 4. makalemin ilk sayfası	184
EK-13. Tez dışı 5. makalemin ilk sayfası	185
EK-14. Tez dışı 6. makalemin ilk sayfası	186

ÖZGEÇMİŞ	187
----------------	-----



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Kimyasal listesi.....	50
Çizelge 3.2. Enzim, substrat ve pestisitlerin listesi.....	51
Çizelge 4.1. Sentezlenen dendronların elemental analiz sonuçları ve fiziksel özellikleri.....	65
Çizelge 4.2. Molar iletkenlik değerlerine göre elektrolit tipleri	66
Çizelge 4.3. Sentezlenen dendronların iletkenlik değerleri ve bazı referanslar için iletkenlik değerleri	66
Çizelge 4.4. Çalışılan pestisitlerin açık yapıları ve adlandırılmaları.....	78
Çizelge 5.1. 1J ve 2J dendronlarının ¹ H-NMR spektrum değerleri	90
Çizelge 5.2. Sentezlenen dendronların UV-GB spektrum değerleri (nm)	100
Çizelge 5.3. Sentezlenen dendronların belirgin IR frekansları (cm ⁻¹).....	102
Çizelge 5.4. İmmobilize dendronların optimum pH'ları ve enzimin aktif yan zincirleri	105
Çizelge 5.5. İmmobilize dendronlar için optimum pH, sıcaklık değerleri	110
Çizelge 5.6. İmmobilize dendronların tampon çözelti ortamında tekrarlanabilirlik % aktiflik değerleri	113
Çizelge 5.7. İmmobilize dendronların yapay idrar ortamında tekrarlanabilirlik % aktiflik değerleri	115
Çizelge 5.8. Dendronlar için kinetik parametre değerleri	121
Çizelge 5.9. İmmobilize (GOx) dendronların 12 aylık depolama değerleri	123
Çizelge 5.10. AChE immobilize dendronların optimum pH'ları ve enzimin yapısında bulunan katalitik üçlü enzim.....	127
Çizelge 5.11. İmmobilize (AChE) dendronlar için optimum pH, sıcaklık değerleri	131
Çizelge 5.12. İmmobilize (AChE) dendronların tampon çözelti ortamında tekrarlanabilirlik % aktiflik değerleri.....	134
Çizelge 5.13. İmmobilize(AChE) dendronlar için kinetik parametre değerleri.....	138

Çizelge	Sayfa
Çizelge 5.14. İmmobilize (AChE) dendronların 9 aylık depolama değerleri	140
Çizelge 5.15. İmmobilize (AChE) dendronların % bağıl aktiflikleri üzerine Imidan fosmet'in etkisi.....	143
Çizelge 5.16. İmmobilize (AChE) dendronların bağıl aktiflikleri üzerine karbaril'in etkisi	147
Çizelge 5.17. İmmobilize (AChE) dendronların bağıl aktiflikleri üzerine florokloridon'ın etkisi	148
Çizelge 5.18. Bağıl aktiviteyi 50%'ye indirmek için eklenmesi gereken pestisit hacimleri	151



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Porfirin merkezli dendrimer	1
Şekil 2.1. İlk kademeli moleküllerin sentezi.....	5
Şekil 2.2. <i>Vögtle</i> ve <i>Weber</i> 'in ahtapot molekülü	6
Şekil 2.3. Arborol yapının sentezi.....	6
Şekil 2.4. Dendron ve dendrimer'in yapısal gösterimi	7
Şekil 2.5. a) Amonyak, b) etilendiamin, c) melamin'den başlayan sentezler.....	7
Şekil 2.6. a) Iraksak yöntem, b) yakınsak yöntem ile dendritik yapı oluşum şeması	9
Şekil 2.7. Ağaç dalları ve köklerinin dendritik moleküllerle yapısal benzerliklerin gösterimi	10
Şekil 2.8. Artan jenerasyon sayısına bağlı “nm” cinsinden dendritik yapıların boyutu	10
Şekil 2.9. İki jenerasyonlu dendronun şematik gösterimi.....	11
Şekil 2.10. Dendritik yapıların “starburst etki”den dolayı jenerasyon sayısının belirlenmesi grafiği	12
Şekil 2.11. a) Hiperdallanmış polimerlerin ve dendritik yapıların intrinsik vizkozite, b) yoğun kabuk modeline göre dendrimer molekülündeki yoğunluk dağılım şematik gösterimi.....	14
Şekil 2.12. Karbosilan dendrimerlerin sentez rotası	15
Şekil 2.13. PAMAM çekirdek-kabuk tektodendrimerin temsili gösterimi.....	15
Şekil 2.14. Tomalia ve diğerlerine göre poli(amidoamin) dendrimerlerin gösterimi.....	16
Şekil 2.15. Polipropileniminin diverjent yöntemle sentezlenmesi.....	17
Şekil 2.16. Fréchet tipi dendrimer gösterimi	17
Şekil 2.17. a) Organometalik dendron, b) Pb^{+2} içeren organometalik dendron, c) SEM görüntüsü	19
Şekil 2.18. a) H-Lys-OMe, b) dekstran, c) Hidrazin-FPD açık yapıları.....	20
Şekil 2.19. a) ATP^{-2} anyonu, b) β -D-(+) Glukoz'un açık molekül yapısı, c) organometalik dendronun şematik görüntüsü.....	21

Şekil	Sayfa
Şekil 2.20. Jelsi 3,4,5-trialkoksifenil türevli dendronların üç boyutlu morfolojik yapı görüntüleri	22
Şekil 2.21. a) Ferrosen'in oluşum reaksiyonu, b) görüntüsü	23
Şekil 2.22. a) Silikat-TiO ₂ ve b) Silikat-TiO ₂ -Pd AFM görüntüleri	24
Şekil 2.23. ITO elektrot yüzeyine Fc içerikli polimerlerin ve antibodilerin tutturulması	24
Şekil 2.24. SP'ye duyarlı immünosensör hazırlamasındaki adımlar	25
Şekil 2.25. Ferrosen içeren kopolimer sentezi	26
Şekil 2.26. Biyoyakıt hücresinin şematik gösterimi	26
Şekil 2.27. a) Enzim substrat, anahtar – kilit modeli, b) solvasyon, c) ES kompleksinde elektrostatik kararsızlık	29
Şekil 2.28. Reaksiyon enerji diagramı	29
Şekil 2.29. a) Glukoz'un GOx varlığında Glukonik aside yükseltgenme mekanizması b) açık yapılarının gösterimi	30
Şekil 2.30. GOx enziminde FAD ve aktif bölge atıkları.....	31
Şekil 2.31. AChE'nin aktif bölgeleri (n=6-9, çapraz bağlı aktif bölgeler, hidrofobik etkileşimler)	32
Şekil 2.32. Adsorpsiyon yöntemiyle enzim immobilizasyonunun şematik gösterimi....	33
Şekil 2.33. Kovalent bağlanma yöntemiyle enzim immobilizasyonunun şematik gösterimi	33
Şekil 2.34. Kafes (matriks) içine hapsetme yöntemiyle enzim immobilizasyonunun şematik gösterimi	34
Şekil 2.35. Membran içine hapsetme yöntemiyle enzim immobilizasyonunun şematik gösterimi	34
Şekil 2.36. a) Fc-PNW' nin SEM görüntüsü, b) ferrosen şapkalı peptitnanotellerin sentez rotası.....	36
Şekil 2.37. Fc içeren desteğe GOx'ın immobilize edilmesiyle oluşturulan elektrot	37

Şekil	Sayfa
Şekil 2.38. a) –OH gruplarıyla sonlandırılmış elmasın üzerinde terbütil metilakrilat'ın kendiliğinden fotograflı ve fotopolimerizasyonu, b) Aminometilferrosen ve glukoz oksidaz'ın birleştirilmesi	37
Şekil 2.39. CS–Fc/GO/GOx modifiye elektrot'un ve Glukoz'un GOx ve mediatör Fc varlığında yükseltgenmesinin şematik gösterimi	38
Şekil 2.40. a) Fc içeren kopolimer, b) kopolimer kaplı elektrot yüzeyine karboksilik asit aracılığıyla enzim immobilizasyonu	38
Şekil 2.41. a) PS- <i>b</i> -PBA blok kopolimeri ve b) mika üzerindeki kopolimer filmin [PS- <i>b</i> -PBA] = 1 mg mL ⁻¹ , 0,3% H ₂ O in THF (v/v) AFM görüntüsü	39
Şekil 2.42. a) Klorpirifos ve b) Klorpirifos-etil-okson'ın gösterimi.....	40
Şekil 2.43. Reaktör hücrenin şematik gösterimi	41
Şekil 2.44. a) Seramik yüzeyde sol-jel'e göre hazırlanmış grafitte enzimin hapsedilmesi b) hazırlanmış MWCNT'de enzimin hapsedilmesi	42
Şekil 2.45. Oktadesil süstitüe poröz silika üzerine immobilize AChE'ın karbaril (karbamat insektisit gibi) inhibitör etkisinin şematik gösterimi	42
Şekil 2.46. CaCO ₃ AChE-AuNP-CaCO ₃ konjugatının şematik gösterimi	43
Şekil 2.47. Klomazon'un kimyasal formülü	43
Şekil 2.48. Glifosat (roundap)'ın kimyasal formülü	44
Şekil 2.49. Biyosensör hazırlanmasının şematik gösterimi	44
Şekil 2.50. OP insektisitlerin oksitlenmiş formlarının yapısal gösterimleri; a) ometoat b) malaokson, c) metidation oksit.....	44
Şekil 2.51. Pestisit zeytinyağından ayrılması	45
Şekil 2.52. a)YKM, b) AChE immobilize YKM, şekilleri ve SEM görüntüleri	46
Şekil 2.53. Triazofos'un kimyasal formülü	46
Şekil 2.54. a) Magnetik küre eldesi, b) paraokson ve triklorfon'a duyarlı sensör'ün hazırlanmasında takip edilen yol	47
Şekil 2.55. a) OMC-CS 'in 1µm, b) 500 nm büyüklükteki SEM görüntüsü, c) metamidofos'un açık yapısı'un açık yapısı	47
Şekil 4.1. Birinci jenerasyon dendronun (1J) sentezi için ön görülen tepkime	55

Şekil	Sayfa
Şekil 4.2. İkinci jenerasyon dendronun (2J) sentezi için ön görülen tepkime	56
Şekil 4.3. İki jenerasyonlu dendronun büyütülmesi.....	57
Şekil 4.4. 2J-HPt dendronunun sentezi için öngörülen tepkime.....	58
Şekil 4.5. 2J-HPd dendronunun sentezi için öngörülen tepkime	59
Şekil 4.6. 2J-NO ₂ Pt dendronunun sentezi için öngörülen tepkime.....	60
Şekil 4.7. 2J-NO ₂ Pd dendronunun sentezi için öngörülen tepkime.....	61
Şekil 4.8. 2J-CH ₃ Pt dendronunun sentezi için öngörülen tepkime.....	62
Şekil 4.9. 2J-CH ₃ Pd dendronunun sentezi için öngörülen tepkime	63
Şekil 4.10. İki jenerasyonlu ve büyütülmüş iki jenerasyonlu dendronlara GOx enziminin immobilizasyonu.....	67
Şekil 4.11. a) GOx'ın indirgen ve yükseltgen yarı reaksiyonları, b) renkli bileşik kinoniminin oluşması.....	68
Şekil 4.12. Anahtar-kilit modeli üzerinden enzim-substrat ilişkisi gösterimi	70
Şekil 4.13. Lineweaver-Burk çift-resiprok eğrisi	72
Şekil 4.14. Trinder metoduna göre glukoz'un takip şeması	72
Şekil 4.15. İki jenerasyonlu ve büyütülmüş iki jenerasyonlu dendronlara AChE enziminin immobilizasyonu.....	73
Şekil 4.16. Asetilkolinesteraz (AChE) enziminin biyokataliz mekanizması	74
Şekil 4.17. Ellman metoduna göre Asetiltiyokolin iyodür'ün AChE varlığında verdiği tepkime.....	77
Şekil 5.1. Birinci jenerasyon dendronun IR Spektrumu	82
Şekil 5.2. Birinci jenerasyon dendronun UV spektrumu	83
Şekil 5.3. 1J dendronunun ¹ H-NMR spektrumu	84
Şekil 5.4. 1J dendronunun LC-MS spektrumu.....	86
Şekil 5.5. İkinci jenerasyon dendronun IR Spektrumu	88
Şekil 5.6. İkinci jenerasyon dendronun UV spektrumu.....	89

Şekil	Sayfa
Şekil 5.7. 2J dendronunun ^1H -NMR spektrumu	91
Şekil 5.8. 2J dendronunun LC-MS spektrumu.....	93
Şekil 5.9. 2J-NO ₂ Pt'nin MALDI-TOF MS spektrumu	95
Şekil 5.10. 2J-NO ₂ Pt dendronunun bazı fragmentları	96
Şekil 5.11. Metal ile koordine olan dendronların UV spektrumları	101
Şekil 5.12. Enzim (GOx) aktivitesi üzerine pH etkisi	103
Şekil 5.13. a) His ve b) Glu aminoasitlerinin pH değişimine göre aktif olan grupları.....	106
Şekil 5.14. İmmobilize olmuş 2J-GOx ile yapılan deneylerde ortamda gerçekleştiği gerçekleştiği düşünülen reaksiyonlar	107
Şekil 5.15. İmmobilize olmuş 2J-XM-GOx ile yapılan deneylerde ortamda düşünülen reaksiyonlar	108
Şekil 5.16. Enzim (GOx) aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	109
Şekil 5.17. Tampon çözelti ortamında immobilize (GOx) dendronlar için tekrarlanabilirlik grafikleri.....	111
Şekil 5.18. Yapay idrar ortamında immobilize (GOx) dendronlar için tekrarlanabilirlik grafikleri.....	114
Şekil 5.19. İmmobilize (GOx) dendronlar için Lineaweaver-Burk kalibrasyon grafikleri.....	116
Şekil 5.20. GOx İmmobilize edilmiş dendronlar için depolama kararlılığı grafikleri....	122
Şekil 5.21. Enzim (AChE) aktivitesi üzerine pH etkisi	124
Şekil 5.22. AChE enziminin katalitik aktivitesinin belirlenme mekanizması	126
Şekil 5.23. Enzim (AChE) aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	127
Şekil 5.24. İmmobilize 2J-AChE ile yapılan deneylerde ortamda gerçekleştiği düşünülen reaksiyonlar	128
Şekil 5.25. İmmobilize 2J-X-M-AChE ile yapılan deneylerde ortamda gerçekleştiği düşünülen reaksiyonlar	129
Şekil 5.26. Enzim (AChE) aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	130

Şekil	Sayfa
Şekil 5.27. Tampon çözelti ortamında immobilize (AChE) dendronlar için tekrarlanabilirlik grafikleri.....	132
Şekil 5.28. İmmobilize(AChE) dendronlar için Lineaweaver-Burk kalibrasyon grafikleri.....	135
Şekil 5.29. İmmobilize (AChE) ikinci jenerasyon dendronlar için depolama grafikleri	139
Şekil 5.30. İmmobilize (AChE) dendronların bağıl aktiflikleri üzerine pestisitlerin etkisi grafikleri	141
Şekil 5.31. Organofosforlu bileşiklerin AChE enzim inhibisyon mekanizması.....	144
Şekil 5.32. Organofosfor bileşiği ile AChE enzimi ile oluşan inhibisyon mekanizması	146
Şekil 5.33. Enzim aktifliğini % 50 inhibe eden pestisit miktarları	149
Şekil 5.34. 2J-AChE-Florokloridon'ın kantitatif tayini	152

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
g	Gram
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonun eksi logaritması
μ_{eff}	Manyetik moment
V_{mak}	Maksimum hız
K_m	Michaelis-Menten sabiti
mM	Milimolar
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
ϵ	Molar absorpsiyon katsayısı ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$)
Λ	Molar iletkenlik
m_A	Molekül ağırlığı

Kısaltmalar

Açıklamalar

AAP	Aminoantipirin
AChE	Asetilkolinesteraz
DMF	N,N-dimetilformamit
DMSO	Dimetilsülfoksit
DTNB	5,5 ¹ -ditiyobis-2-nitrobenzoik asit
Florokloridon	3-kloro-4-(klorometil)-1-[3-(triflorometil)fenil]-2-pirolidinon
GOx	β -glukoz oksidaz

Kısaltmalar**Açıklamalar****HRP**

Peroksidaz Enzimi

IR

Kızılötesi Spektroskopisi

İmıdan Fosmet

O,O-dimetilS-ftalimidometil fosforoditiyoat

Karbaril

1-naftil-N-metilkarbamat

NMR

Nükleer Magnetik Rezonans

TGA

Termogravimetri

UV-GB

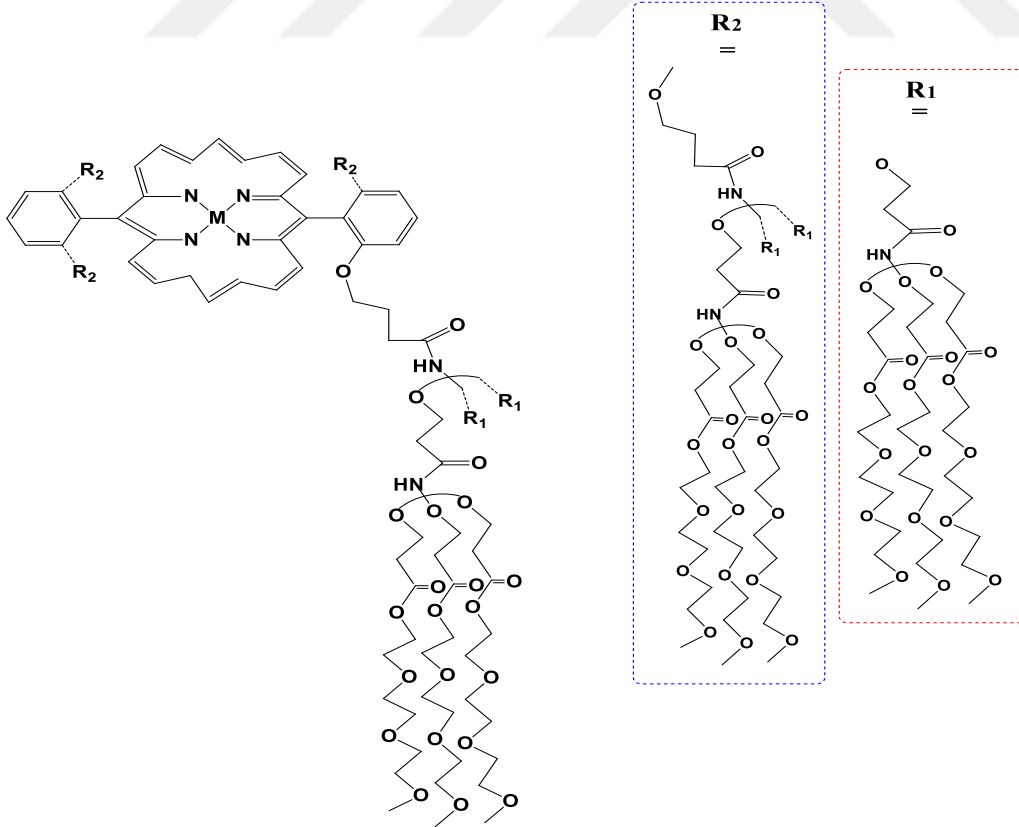
Ultraviyole- Görünür Bölge Spektroskopisi



1. GİRİŞ

Redoks enzimler gibi davranan dendronların sentezi ve özelliklerinin araştırılması ile ilgili çalışmaların 2000’li yıllardan günümüze kadar giderek arttığı görülmektedir [1,2]. Doğaya ve canlı metabolizmasına zarar vermeden, yine doğaya ve canlı metabolizmasına faydalı araştırmaların yapılması 21.yüzyılda rağbet görecektir. Nitekim günümüzde doğayı ve canlı metabolizmayı taklit ederek hem endüstri hem de sağlık alanlarına faydalı olacak modeller geliştirilmektedir.

Taklidi yapılan çalışmalardan birisi, hemeproteinlerin (heamprotein) üzerine olduğu görülmektedir. Bilindiği gibi hemoglobinin yapısında bulunan hem (heam) proteinleri, oksijeni bağlama ve taşımada rol oynar, *Dandliker* ve *diğerleri* hemoglobini model olarak demir-porfirin çekirdekli dendrimeri hazırlamışlar (Şekil 1.1) ve hazırladıkları bu dendrimerin hücrede pek çok kimyevi reaksiyonu katalizleyen sitokrom enzimi gibi çalışabileceğini ifade etmişlerdir [3].



Şekil 1.1. Porfirin merkezli dendrimer

Gerek doğada gerekse canlı metabolizmasında gerçekleşen kimyasal olayların meydana gelmesinde elektron transferlerinin rol oynadığı bu sayede gerek kimyasal iş gerekse mekanik iş üretmede önemli katkısının olduğu bilinmektedir. Bu elektron transferlerinin arzu edilen hızlarda olması teknolojik gelişmelere katkı sağlayacağı söylenmektedir. Bu amaçla çok farklı çalışmaların yer aldığı görülmektedir. Böyle çalışmalardan birisi, *Gray* ve *diğerleri* tarafından metalo proteinleri referans olarak geliştirdikleri geçiş metal merkezli dendrimerleridir. Araştırmacıların hazırladıkları bu dendrimerlerdeki elektron transfer hızına etki eden faktörleri araştırmışlardır. Elektron transfer hızındaki değişimin aktif merkez ile substrat arasındaki uzaklığın artmasıyla azaldığını ifade etmişlerdir [4]. Ayrıca metal içeren dendrimerlerin elektron depolama özelliği göstermesi nedeniyle moleküler bataryalar olarak da dikkate alındıkları kaynaklarda yer almakta ve bu amaçla kullanılan metallerin genellikle Ru^{2+} , Os^{2+} , ferrosenler, kobaltosenler kaynaklı olduğu görülmektedir [5,6].

Yukarıda kısaca bahsedilen ve temeli doğayı taklit etmeye dayanan bu tür araştırmalara katkı sağlamak, tezimin çıkış noktasını oluşturmuştur. Bu amaçla kaynaklarda rastlamadığımız Ferrosen merkezli dendronların hazırlanması, bu dendronların heterosiklik aldehitler ve d^8 konfigürasyonuna sahip geçiş metallerini içermesi ve destek materyal olarak kullanılabilirliği hem yeni hemde ilginç çok fonksiyonlu bileşikler olacağı düşüncesi çalışmamızın temelini oluşturmuştur. Sunulan tezin deneysel bölümü üç başlık altında ele alınmıştır.

Birincisi, ferrosen gövdeli dendronların hazırlanması üzerinedir. Bunun için ferrosenaldehit ile melaminin katılma-ayrılma tepkimesi sonucunda elde edilen ürünün (1J) tereftaldialdehit ile reaksiyona sokulmasıyla iki jenerasyonlu (2J) dendritik yapı elde edilmiştir.

İkincisi, iki jenerasyonlu (2J) dendritik yapının genişletilmesi üzerinedir. Heterosiklik aminler (2-Aminofenol türevleri) ile 2J yapılı dendritik moleküllerin tepkimesi sonucunda oluşan Schiff bazlarına Pd(II)/Pt(II) metallerinin template metoduna göre reaksiyona sokularak genişletilmiş 2J dendronları (2J-HPd, 2J-HPt, 2J-NO₂Pd, 2J-NO₂Pt, 2J-CH₃Pd, 2J-CH₃Pt) elde edilmiştir. Sentezlenen 1J ve 2J dendritik yapıları, ¹H-NMR, FT-IR, UV-GB, LC-MS spektrumları, element analizi ve erime noktası tayini ile yapıları aydınlatılmıştır. Genişletilmiş 2J dendritik yapıların FT-IR, UV-GB spektrumları, termal

analizler (DTA ve TGA), MALDI-TOF MS, iletkenlik ve magnetik duyarlılık ölçümleri ve element analizleri ile aydınlatılmıştır.

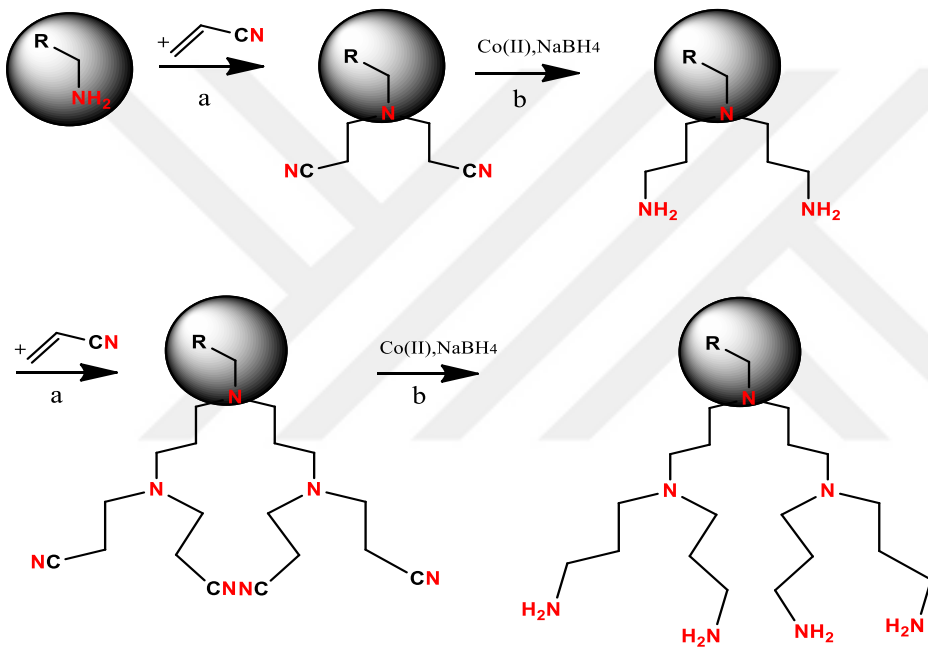
Üçüncüsü, genişletilmiş 2J dendritik yapılara enzim immobilizasyonu ve pratik uygulamaları üzerinedir. İmmobilizasyonda kullanılan enzimler Glukoz oksidaz (GOx), Asetilkolin Esteraz (AChE)'dir. İmmobilize-GOx'ın pratik uygulaması suni idrardaki tekrar sayısının belirlenmesi iken, immobilize-AChE enziminin uygulaması pestisit ve herbisitlerin tayin edilebilirliği üzerinedir.



2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Dendronlar ve Kademeli Moleküllerin Ortaya Çıkışı

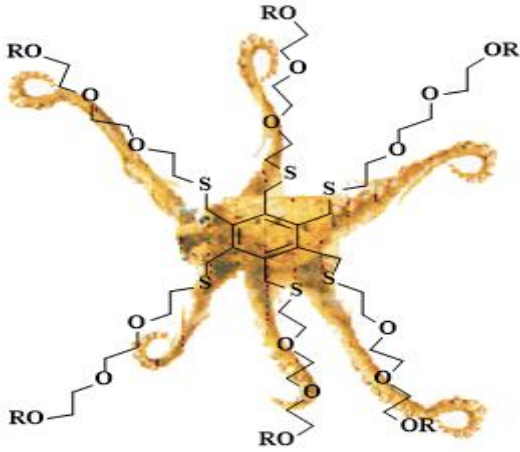
1978 yılında *Vögtle* ve *diğerleri* kademeli molekülleri ilk kez diverjent (ıraksak) yöntemiyle sentezlemiş, bu tarihten sonra bu yapıların popülaritesi artmıştır [7]. *Vögtle* kademeli sentezde monoamin (Şekil 2.1) ve diaminleri, akrilonitril ile tepkimeye sokmuştur. Böylece tekrarlayan bir sentez rotası oluşturmuştur.



Şekil 2.1. İlk kademeli moleküllerin sentezi

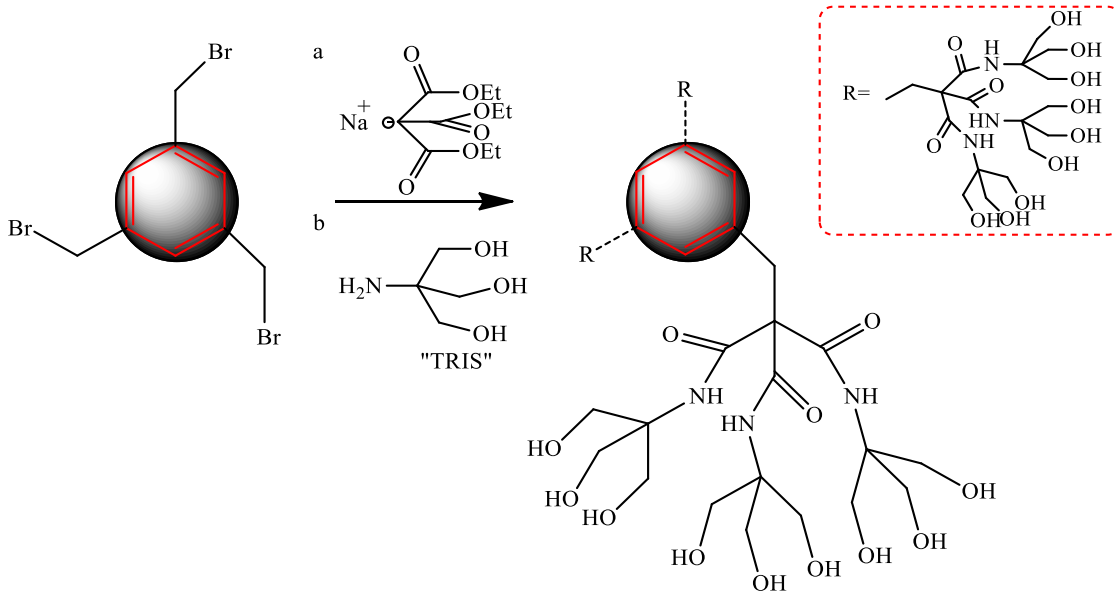
Aslında, *Vögtle* bu çalışmasından birkaç yıl önce, *Weber* ile “ahtapot moleküller” olarak tanımladıkları çok fazla dallanma içeren bir makromolekül (Şekil 2.2) sentezlemiştir [8].

1982 de, *Maciejewski* kademeli olarak geliştirilen yapılara benzer polimerler sentezlemiş [9], *Gennes* ve *Hervet* ise yüksek dallanmış moleküllerin sentezine önemli katkılar sağladıkları için 1983 yılında Nobel ödülünü almışlardır. *Gennes* yüksek dallanmış makro molekülleri yumuşak malzemeler olarak tanımlamış ve sentezinde “kademeli teori” adını verdiği istatistiğe dayalı bir model geliştirmiştir [10,11].



Şekil 2.2. *Vögtle* ve *Weber*'in ahtapot molekülü

1985 yılında *Tomalia* yüksek dallı poliamidoaminleri (PAMAM) geliştirmiş ve bu yapıları “starburst (yıldız genişlemesi) dendrimerler” olarak tanımlamıştır. Daha sonra, bu yapılara “dendrimer” adı verilmiştir. Dendrimer kelimesi yunanca “ağaç” anlamına gelen “dendron” ile, “bölüm” anlamına gelen “meros”un biraraya getirilmesi ile oluşturulmuştur [12]. Aynı sene *Newkome* ve *diğerleri* diverjent sentez yöntemini kullanarak suda çözünen yüksek dallanmış makromolekülleri sentezlemişler, bu molekülleri latince “ağaç” anlamına gelen “arbor” sözcüğünden yola çıkarak “arborol sistemler” (Şekil 2.3) olarak tanımlamışlardır [13].

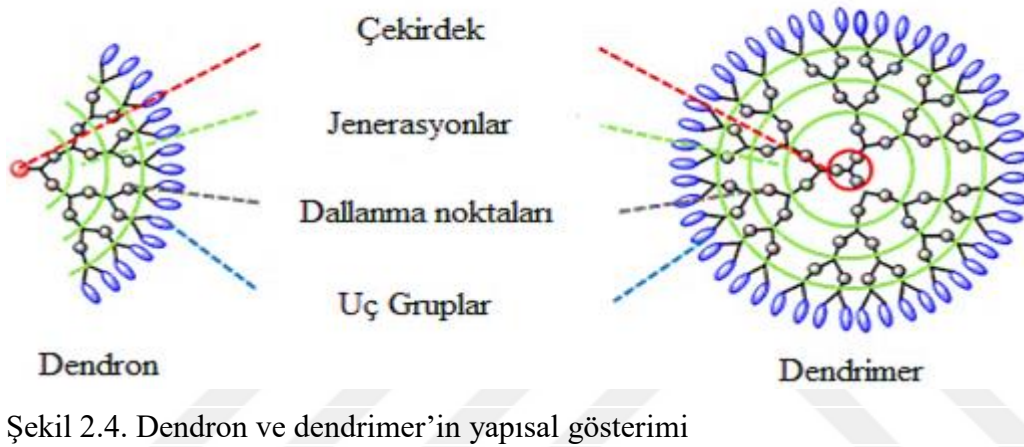


Şekil 2.3. Arborol yapının sentezi

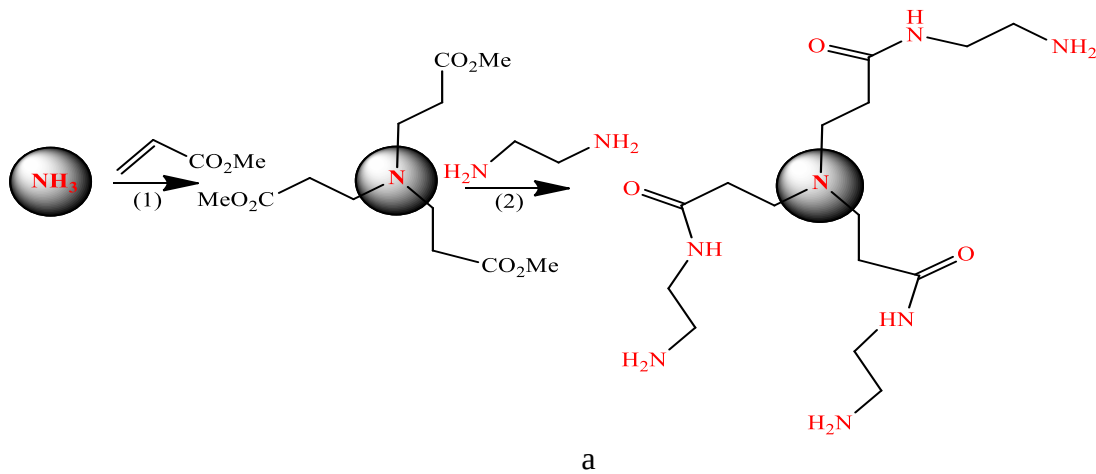
Bu makromoleküller kaynaklarda “dendrimerler”, “dendronlar” ve “arborollar” olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.1.1. Dendronlar ve kademeli moleküllerin kimyasal yapısı

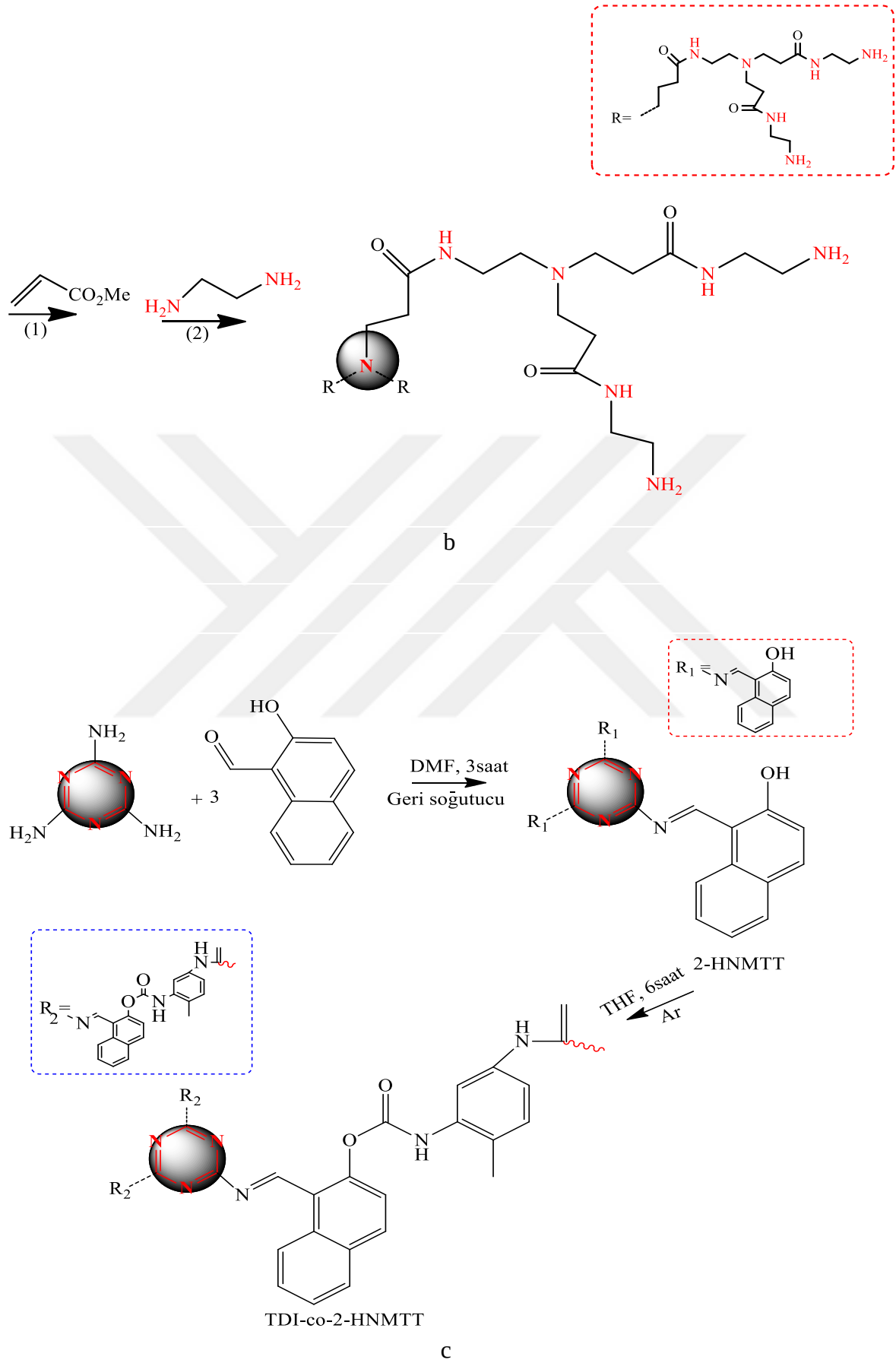
Dendrimerler üç boyutlu, dendronlar ise iki boyutlu yüksek dallanmış makromoleküller (Şekil 2.4) olup, polimerik materyallerin yeni bir sınıfını oluşturmaktadırlar. Polimerlerin önemli bir sınıfını teşkil eden bu yapılar teknolojiye son 25 yıldır kullanılmaktadır [14].



Dendronlar, çok fonksiyonlu bir merkez (çekirdek, öz), her bir dallanma ile oluşan iç tabakalar (jenerasyon, G) ve fonksiyonel grup taşıyan dış yüzeyin bir araya gelmesiyle oluşan yapılardır [15]. Çekirdek olarak genellikle amonyak, etilendiamin, melamin (Şekil 2.5) gibi yapılar kullanılmaktadır [12,16].

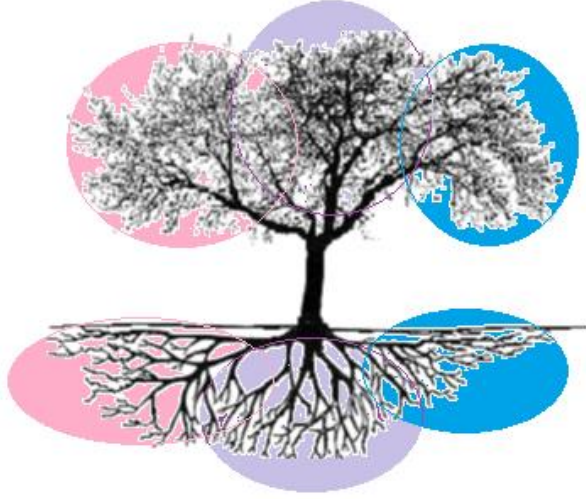


Şekil 2.5. a) Amonyak, b) etilendiamin, c) melamin'den başlayan sentezler



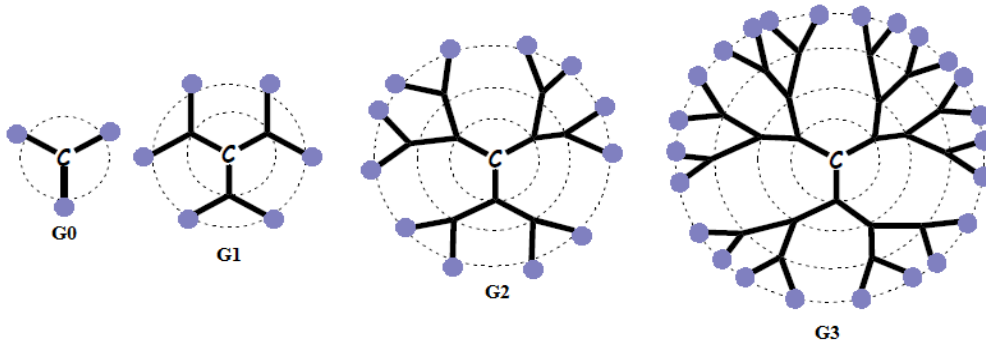
Şekil 2.5. (devam) a) Amonyak, b) etilendiamin, c) melamin'den başlayan sentezler

mercanlar, şimşek, insan vücudundaki ciğer, böbrek, damarlar, nöronlar (sinir hücreleri), kar taneleri gibi metre düzeyinden nanometre düzeyine kadar pek çok örnek verilebilir [20-22].



Şekil 2.7. Ağaç dalları ve köklerinin dendritik moleküllerle yapısal benzerliklerinin gösterimi

Farklı boyutlardaki bu örneklerin, büyük benzerlik göstermesinin nedeni tamamen açıklanamamıştır. Bu yapıların enerjilerini azaltmak ve dağıtmak için maksimum ara yüzey oluşturdıkları ve zaman içinde büyüdükları düşünülmektedir [22].



Çekirdek

>1nm

1-2nm

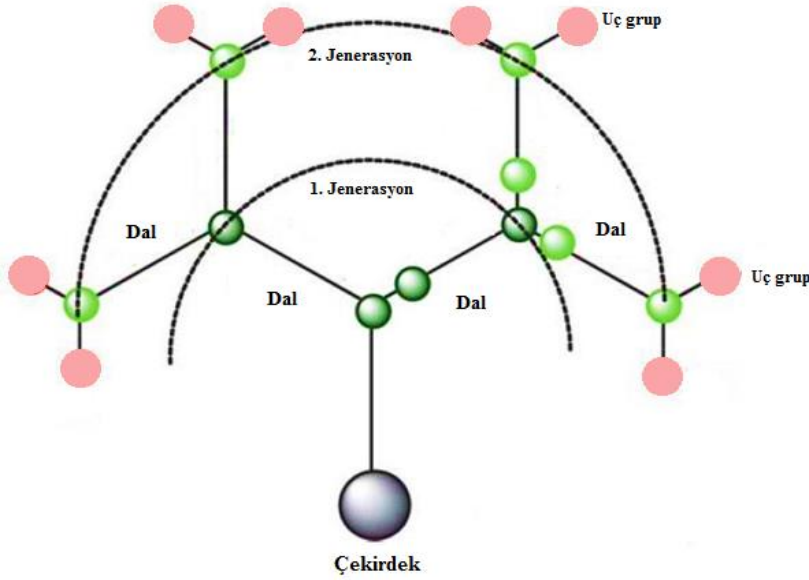
3-6nm

Şekil 2.8. Artan jenerasyon sayısına bağlı "nm" cinsinden dendritik yapıların boyutu

Dendronlarda jenerasyon sayılarının belirlenmesi

Dendritik yapılar, kimyasal anlamda üç farklı bileşenin bir araya gelmesiyle meydana gelmektedir. Bunlar; 1. Çok fonksiyonlu çekirdek, 2. İç tabakalar (Dallar) 3. Çok değerlikli

yüzey (Uç grup)'dir. Merkez molekül (Çekirdek) 0. Jenerasyon (G_0) olarak adlandırılmakta ve bundan sonraki dallanmayı sağlayan her ardışık birim bir sonraki jenerasyonu oluşturmaktadır. Şekil 2.9'da iki jenerasyonlu bir dendronun şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.9. İki.jenerasyonlu dendronun şematik gösterimi

Çekirdekten başlayarak büyüyen zincirler giderek uzamakta ve dendronlar adeta bir kek dilimi görünümüne sahip olmaktadır. Dendronların dış kenarlarının genişlemesiyle kapalı membran tipli, sık istiflenmiş yapılar oluşur. Bu yapılar kritik dallanma noktasına ulaşıldıktan sonra uygun boş alan kalmadığından daha fazla büyüyemezler, buna “starburst etki” adı verilir [23]. Yapıda bulunan reaktif uç gruplar, dendritik yapıyı daha büyütmek yada yapıya başka gruplar ilave etmek için kullanılmaktadır [24]. Dendritik yapılarda uç grupların sayısındaki artışın nasıl olabileceği ile ilgili “Eş. 2.1” türetilmiştir [15].

$$Z = n_c \cdot n_m^G \quad (2.1)$$

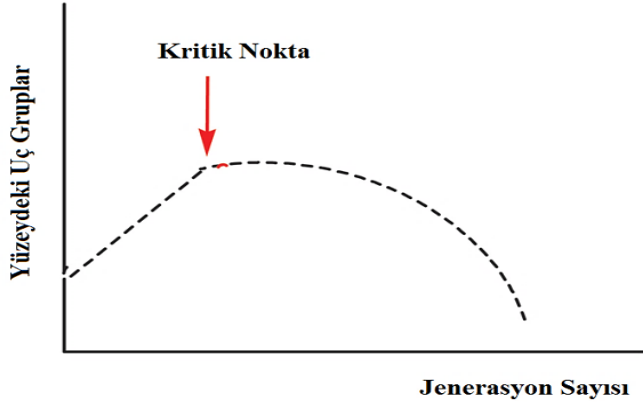
Z: uç grup sayısı

n_c : merkez moleküldeki bağ sayısı

n_m : dallanmayı sağlayan bağ sayısı

G: jenerasyon sayısı

Bu eşitlik, merkez molekülünü, tekrarlayan birimi, tabaka sayısını ve yüzey tabakasının bileşimini içerdiğinden, bu parametreleri değiştirerek, sentezlenecek iki ve üç boyutlu dendritik molekülleri öngörebilmek mümkün olmakta, hatta dendrimerlerin fizikokimyasal ve makroskopik özellikleri de tahmin edilebilmektedir [15].



Şekil 2.10. Dendritik yapıların “starburst etki”den dolayı jenerasyon sayısının belirlenme grafiği

Dendronların fiziksel ve kimyasal özellikleri

Bu yapılar, genellikle çok sayıda aktif uç grup barındırdıklarından yüksek kimyasal aktivite göstermektedir [24]. Ayrıca bu uç gruplar dendronların kararlılıklarını, çözünürlüklerini, agregasyonunu, reaktivliklerini belirlemede rol oynarlar. Bu nedenle uç grupların kimyasal modifikasyonu ile dendritik yapıların özelliklerini değiştirmek mümkün olabilmektedir [21].

Dendritik yapıların çözünürlüğü

Yapılarında çok fazla zincir sonlarının bulunması, çözünürlüklerinin ve karışabilirliklerinin yüksek olmasına neden olmaktadır. Ayrıca dendronların çözünürlüklerine etki eden bir diğer faktör de yüzey gruplarının doğalarıdır. Hidrofobik uç gruplara sahip dendritik yapılar apolar çözücülerde çözünebilirken, hidrofilik gruplar ile sonlanmış olanlar polar çözücülerde çözünebilmektedir. Bu yapıların çözünürlüklerinin ve kimyasal reaktivitelerinin polimerik yapılardan daha iyi olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir [23].

Molekül ağırlığı

Dendritik yapıların boyutları ve molekül ağırlıkları, sentez esnasında kontrol edilebilmektedir. Birinci ve ikinci jenerasyonlarda düşük molekül ağırlığına sahip bileşikler, beşinci ve daha sonraki jenerasyonlarda ise yüksek molekül ağırlıklı bileşikler bulunur. Dendritik yapıların tahmini molekül ağırlıkları matematiksel bir “Eş. 2.2” ile hesaplanabilmektedir [23].

$$M = M_c + n_c \left[M_m \cdot \left(\frac{n_m^G - 1}{n_m - 1} \right) + M_t \cdot n_m^G \right] \quad (2.2)$$

M_c : Merkez molekülün molekül ağırlığı

M_m : Dallanmayı sağlayan monomerin molekül ağırlığı

M_t : Uç grupların molekül ağırlığı

n_c : Merkez molekülün bağ sayısı

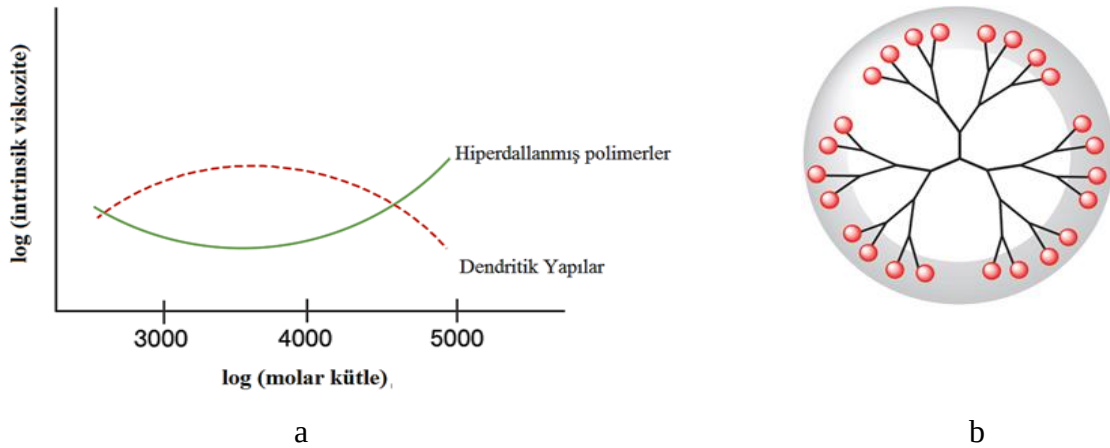
n_m : Dallanmayı sağlayan bağ sayısı

G : Jenerasyon sayısı

Viskozite

Dendritik yapılar çözeltilerde top şeklinde sıkıca paketlenmiş bir yapı oluşturmaktadır. Bu da onların akışkanlık (reolojik) özelliklerini olumlu yönde arttırmaktadır. Çözünmüş lineer polimerler ile kıyaslandıklarında, dendritik moleküllerin düşük viskoziteye sahip oldukları görülmektedir [23]. Bilindiği gibi viskozite molekül büyüklüğü ile doğrudan ilişkilidir. Dendritik yapıların instrinsik viskoziteleri düşüktür ve viskoziteleri molekül ağırlıklarına neredeyse bağlı değildir [25].

Hiperdallanmış polimerlerde ise viskozite molekül ağırlığına ya da jenerasyon sayısına bağlı olarak değişmektedir. Şekil 2.10’da görüldüğü gibi, maksimum nokta üçüncü ve yedinci jenerasyonlar arasında olmaktadır; dendritik yapıya ve çözücünün saflığına bağlı olarak farklılık göstermektedir [26-27].



Şekil 2.11. a) Hiperdallanmış polimerlerin ve dendritik yapıların intrinsik vizkozite, b) yoğun kabuk modeline göre dendrimer molekülündeki yoğunluk dağılım şematik gösterimi

Biyolojik özellikleri

Katyonik dendritik yapılar (amin uç gruplu PAMAM ve düşük pH değerlerinde katyonik grup oluşturan polipropilen imin dendrimerleri v.b.) genellikle hemolitik (kan hücresini parçalayan) ve sitotoksiktir. Bunların toksisiteleri jenerasyonlarına bağlıdır ve artan uç grup sayısı ile birlikte artmaktadır. Buna karşın karboksilat uç grup içeren anyonik dendrimerlerin geniş bir konsantrasyon aralığında sitotoksik etkiye sahip olmadığı bilinmektedir [23].

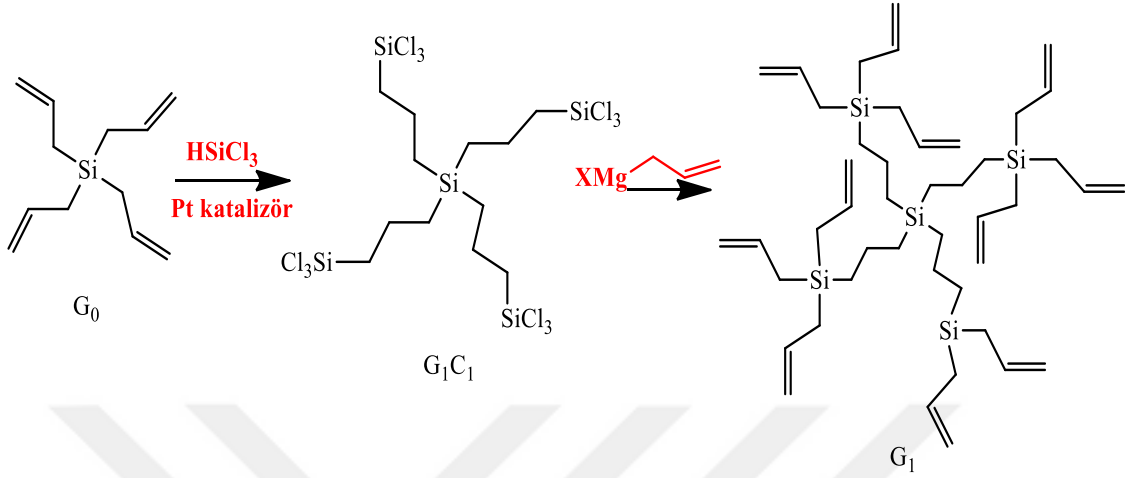
2.1.4. Dendronlar ve kademeli moleküllerin yapısal olarak sınıflandırılması

Dendritik yapı türleri, sıvı kristal, tektodendrimer, kiral dendrimer, PAMAM, PAMAMOS, PPI dendrimerleri, Fréchet tipi dendrimer, peptit dendrimer, glikodendrimer, hibrit dendrimer, multilingual dendrimer, amfifilik dendrimer gibi başlıklar altında incelenmektedir.

Sıvı kristal dendron ve dendrimerler

İlk ışığa duyarlı sıvı kristal dendrimerler 1990 yılında *Tomalia ve diğerleri* tarafından sentezlenmiştir [28]. Bu dendrimerlerin uçlarında sinamil grupları mevcuttur, UV ışığı altında, sinamil gruplarında E-Z izomerizasyonu ve [2 + 2] fotosikloklatılma tepkimesi oluşur ve üç boyutlu bir ağ yapı meydana gelir [29]. Sıvı kristal dendritik yapılar diverjent

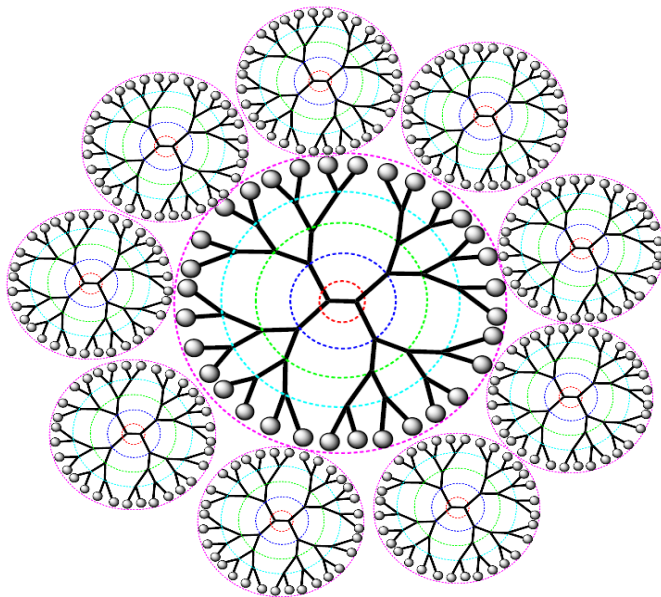
yöntemiyle sentezlenmektedir; bunlara polikanter kristalleri, karbosilan dendrimerleri örnek verilebilir.



Şekil 2.12. Karbosilan dendrimerlerin sentez rotası [30]

Tektodendron ve dendrimerler

Tektodendrimerler, çekirdek bir dendrimer ile bu dendrimerin başka dendrimerler tarafından sarılması sonucunda oluşan dendritik yapılardır. Ayrıca terapötik ajanlarla sarılı dendrimerlerden oluşması nedeniyle bu yapılar “tekto dendrimerler” olarak ifade edilir [31]. Hastalıklı hücrelerin teşhisinde, hastalık derecesinin belirlenmesinde, ilaç salınımında kullanılırlar [32].



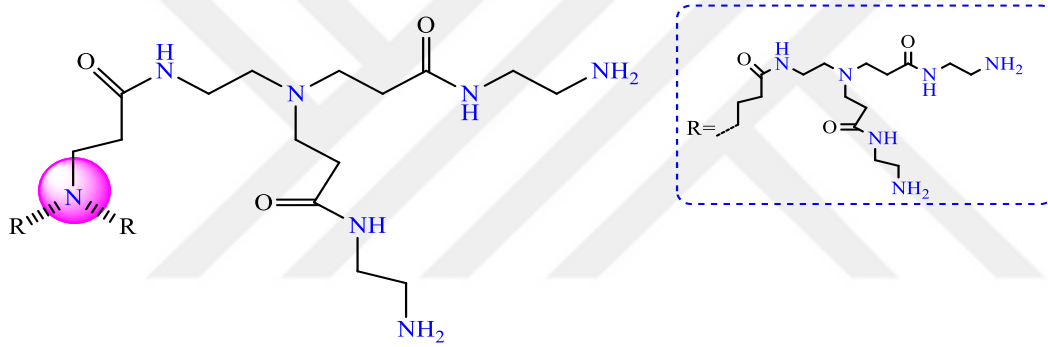
Şekil 2.13. PAMAM çekirdek-kabuk tektodendrimerin temsili gösterimi

Kiral dendrimerler

Bu dendrimerlerde kiralite, şiral merkeze kimyasal olarak benzer fakat yapısal olarak farklı grupların bağlanması ile meydana gelir [33]. Rasemik olmayan dendrimerler, asimetrik kataliz ve şiral moleküllerin tanınmasında kullanılırlar.

PAMAM dendrimerler

İlaç salınımında en yaygın olarak kullanılan poliamidoamin (PAMAM) dendrimerleri ilk kez *Tomalia* tarafından sentezlenmiştir [34]. Birçok amin gruplarına sahip olmasından dolayı çözünürlüğü yüksek olup, diverjent metoduyla sentezlenen dendrimerlerdir [35].



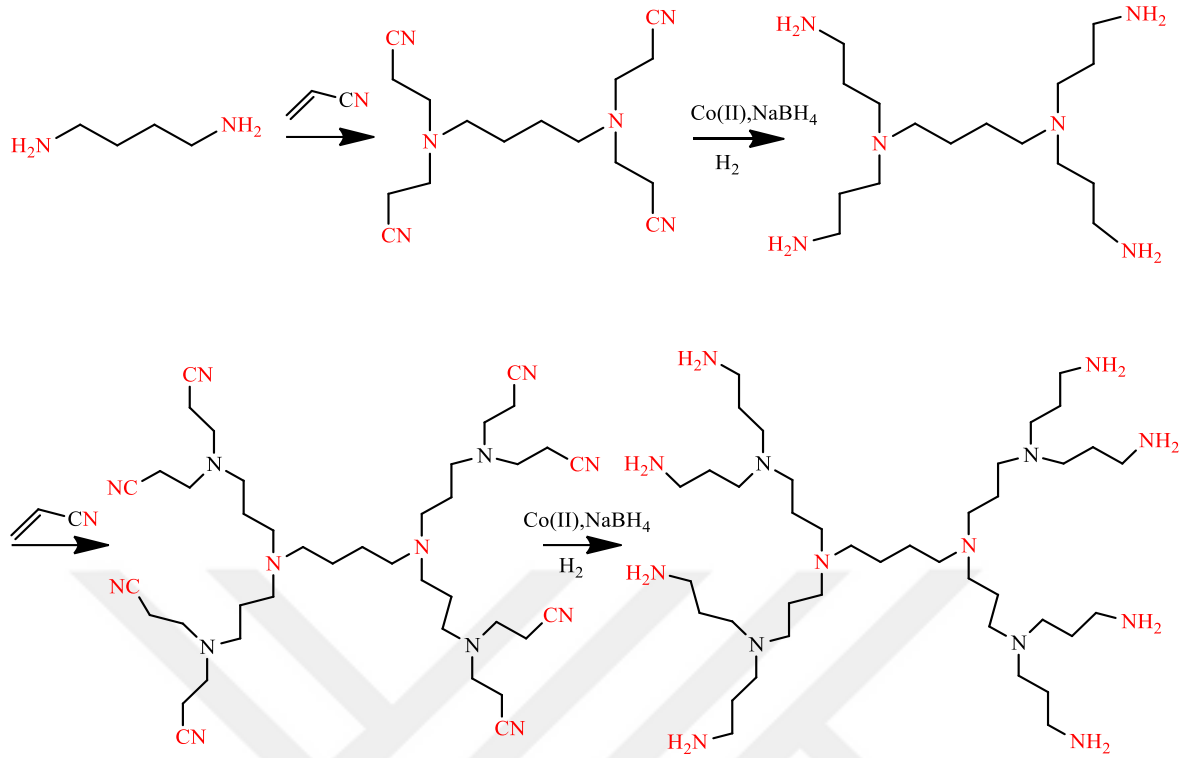
Şekil 2.14. *Tomalia* ve diğerlerine göre poli(amidoamin) dendrimerlerin gösterimi

PAMAMOS dendrimerler

Merkezden çevreye doğru büyüyen poli(amidoamin-organosilisyum) dendrimerleri kısaca “PAMAMOS” olarak ifade edilir. Bu dendrimerler misel yapıya sahip olup, hidrofobik özellikli organosilisyum ve nükleofilik özellikli poliamidoamin’den oluşmaktadır [36].

PPI dendrimerler

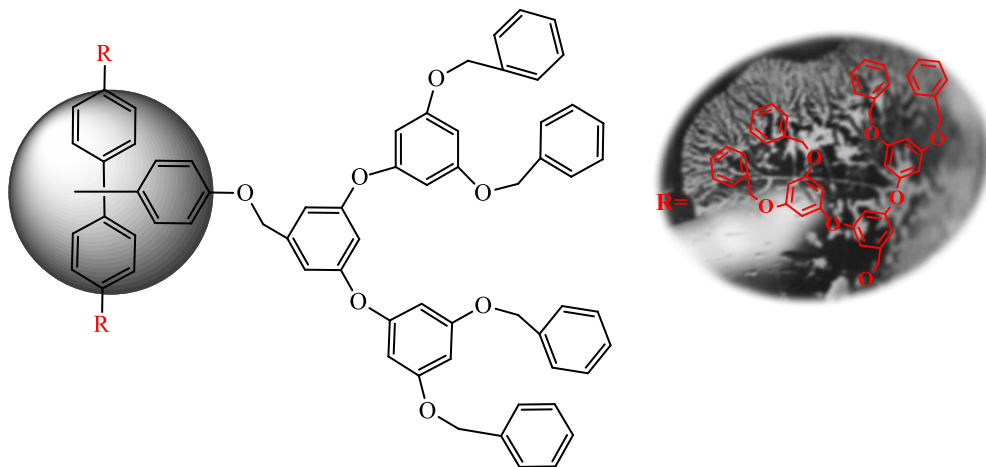
Micheal tipi katılma ile aminin akrilonitrile bağlanması, daha sonra nitril gruplarının indirgenerek primer $-NH_2$ gruplarının oluşması ve böylece büyüyen makromoleküllerin meydana gelmesine dayalı dendritik yapılarıdır. Poli(propilenimin) “PPI” olarak ifade edilen dendritik yapılar ilk defa *Vögtle* tarafından sentezlenmiştir [7].



Şekil 2.15. Polipropileniminin diverjent yöntemle sentezlenmesi

Fréchet tipi dendrimerler

Polibenzileter tabanlı olan bu dendrimerler, *Hawker* ve *Fréchet* tarafından 1990 yılında konverjent metotla sentezlenmiştir [37]. Bu dendrimerlerin genellikle yüzey gruplarını karboksilik asitler oluşturmaktadır. Böylece polar çözücülerde çözünürlükleri artmaktadır.



Şekil 2.16. Fréchet tipi dendrimer gösterimi

Peptit dendrimerler

Çekirdek yada dallanmaların aminoasitlerden oluşması sonucunda meydana gelen ve üç boyutlu olarak büyüyen dendritik yapılara peptit dendrimerler adı verilir [22].

Glikodendrimerler

Yapılarında karbohidrat bulunduran dendrimerlere glikodendrimer denilir. Karbohidrat uçlu, karbohidrat merkezli ve tamamen karbohidratlardan oluşan dendrimerler olmak üzere üç alt sınıfı mevcuttur [38].

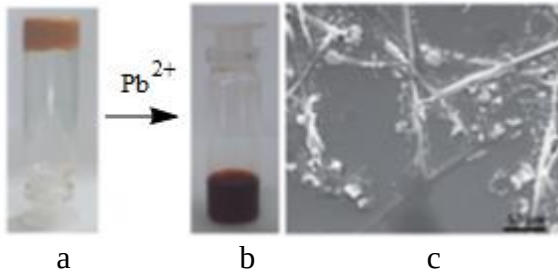
Hibrit dendrimerler

Dendritik ve lineer polimerlerin kombinasyonu sonucu oluşan dendrimerlerdir. Birden çok reaktif zincir uçlarına sahip aktif moleküllerden oluşan küçük dendrimerlerin, lineer polimerlerle etkileşmesi sonucu oluşan hibrit yapılardır.

2.1.5. Dendritik yapıların uygulama alanları

Dendritik moleküller çok fonksiyonlu gruplar içerdiklerinden birçok uygulama alanına sahiptirler. Örnek olarak, fotodinamik tedavi, ilaçların magnetik rezonans görüntüleme, X-Ray, ya da prob olarak kullanılması, ilaç salınımı, göz damlası, kontrollü ilaç salınımı, hedef odaklı ilaç salınımı, gen iletimi, biyomedikal gibi alanları içeren farmositik uygulamalar, kozmetik, çözünürlük arttırmada, ışık toplama özelliğine sahip antenler verilebilir. Bu uygulamalara ait bazı araştırma sonuçları şöyledir.

Dendronlar, tıpkı dendrimerler gibi yoğun formda aktif uç gruplara sahip olması sayesinde, misafir molekülleri hapsetme (kapsülleme) yeteneğine sahiptir [39,21]. Bu özelliğe sahip dendron üzerine olan bir çalışma *Lakshmi* ve *diğerleri* tarafından yapılmıştır. *Lakshmi* ve *diğerleri* ferrosen takılı poli(arileter)'den hazırlanmış organometalik dendronu sentezleyerek Pb^{+2} iyonuna karşı seçiciliği üzerine araştırma yapmışlardır [40]. Hazırlanan organometalik dendron yoğun bir faza sahipken kurşun iyonu (Pb^{+2}) varlığında bu fazın sıvılaştığı (Şekil 2.17 b) rapor edilmiştir.

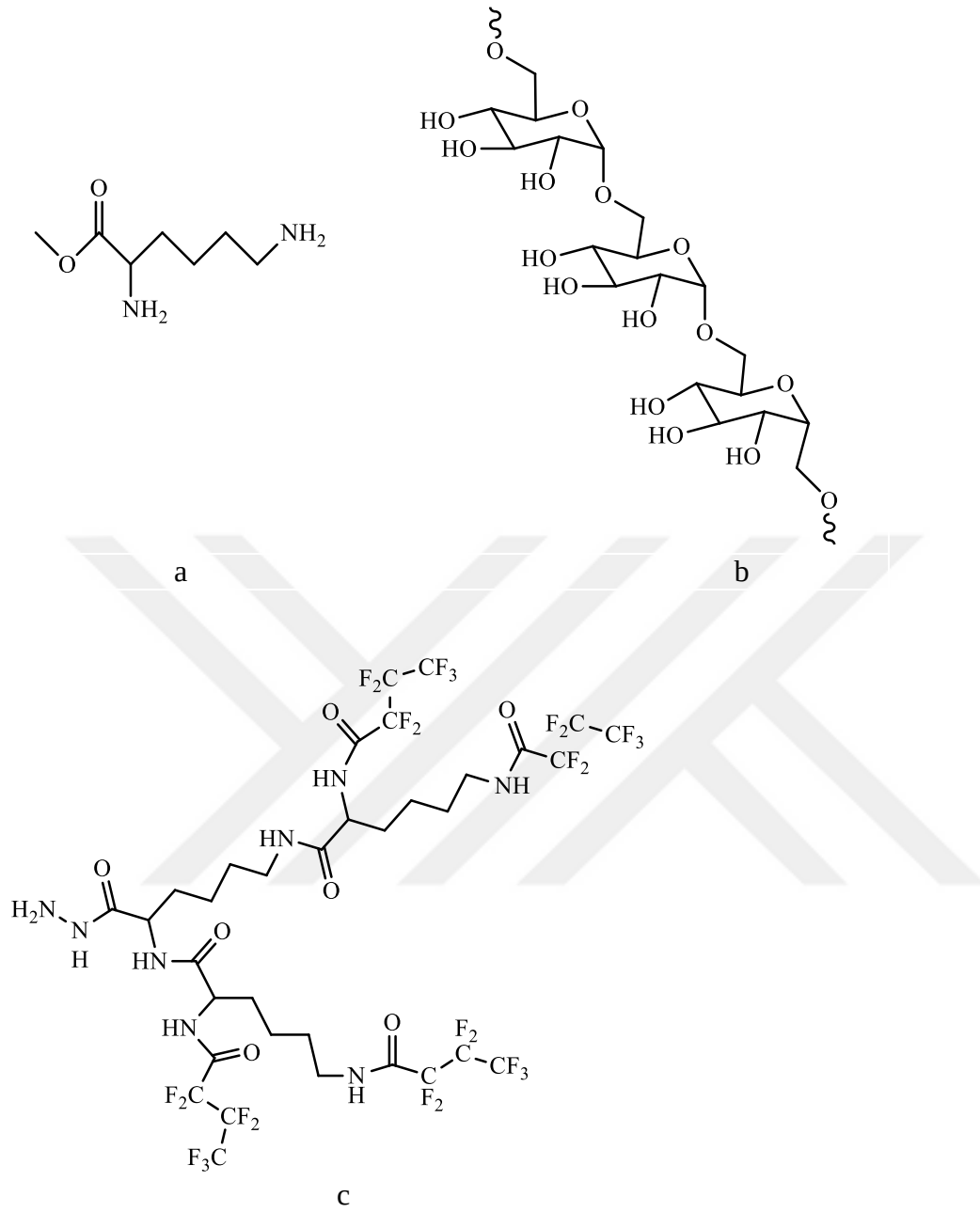


Şekil 2.17. a) Organometalik dendron, b) Pb^{2+} içeren organometalik dendron, c) SEM görüntüsü

Hidrofobik uç gruplar sayesinde kapsül olabilme özelliği gösteren dendronların ilaç salınımlarında önemli role sahip olduğu *Neerman* tarafından belirtilmiştir [41]. Kemoterapide kullanılan Doksorubisin'in kontrollü salınımını yapabilmek için Doksorubisin kaplı Oligoetilenglikol (OEG) dendronunu hazırlayan *Zhao* ve *diğerleri*, karaciğer hücreleri (HepG2) üzerine doksorubisin salınımının daha etkili olduğunu ifade etmişlerdir [42].

Yine başka bir çalışmada, dendrimerlerdeki iç yapının çeşitli molekülleri taşıyabilme özelliğinden yararlanan [43], *Meijer* ve *diğerleri*, en dışında 64 uç grubu bulunan polipropilenimin dendrimerinin içerisine dört rose Bengal molekülünü (4,5,6,7-tetrakloro-3',6'-dihidroksi-2',4',5',7'-tetraiyodo-3*H*-spiro[izobenzofuran-1,9'-ksantin]-3-one) ve sekiz ile on arası p-nitrobenzoik asit molekülünü kapsüllemişlerdir. Daha sonra uçtaki aminleri bir amino asit olan (L-fenilalanin) ile reaksiyona sokarak yüzeyde adeta bir kabuk oluşturarak misafir molekülleri hapsedmişlerdir. Bu çalışmanın devamında ise *Klajnert* ve *Bryszewska* isimli araştırmacılar dış tabakayı hidrolize ederek hapsedilen moleküllerin serbest kaldığını ifade etmişlerdir [44].

Akut lösemi ve lenfoma tedavisinde kullanılan [45] “doksorubisin” hidrofobik bir moleküldür. Doksorubisin'in karaciğer hücrelerine salınımı üzerine bir araştırma yapan *Ma* ve *diğerlerinin* hazırladıkları dendron, dekstran tabanlı bir polisakkarittir [46]. Araştırmacılar bu polisakkaritten florlanmış peptit dendronlarını (FPD) (Şekil 2.18) hazırlamak için, H-Lys-OMe.2HCl'den faydalanarak amin uçlu bir makro molekülü sentezlemişler, daha sonra heptaflorobütirik anhidrit ile etkileştirmişlerdir. Bu polisakkarit biyouyumlu olması nedeniyle sağlıklı hücreler için düşük sitotoksik etki göstermiştir.



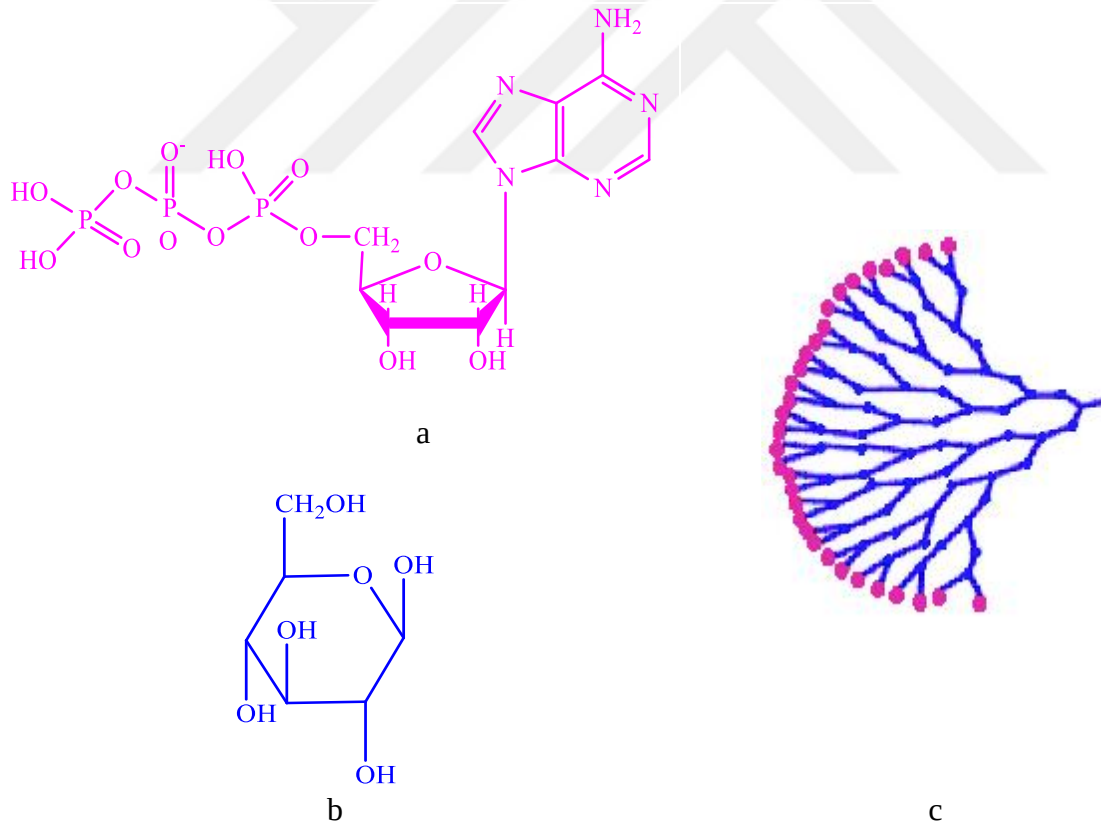
Şekil 2.18. a) H-Lys-OMe, b) dekstran, c) hidrazin-FPD açık yapıları

İbuprofen katkılı yüksek dallanmış bir dendrimer sentezleyen *Kolhe* ve *diğerleri* akciğer kanser hücrelerine olan salınımın daha hızlı olduğunu bu nedenle klinik uygulamalarda kullanılabileceğini ifade etmişlerdir [47].

Pilokarpin, göz küresinde basınç artışı sonucunda oluşan Glukoma tedavisi için kullanılmaktadır. *Vandamme* ve *Brobeck* isimli araştırmacılar, pilokarpin salınımını araştırmak için, pilokarpin kaplı poliamidoamin (PAMAM) dendronunu hazırlamışlardır.

Dendronsuz pilokarpın salınımının daha yavaş olduğunu, buna karşın dendronlu pilokarpın salınımının hedef hücreye etkili bir şekilde ulaştığını ifade etmişlerdir [48,49].

Bilindiği gibi genetik mühendisliğinin temel fonksiyonlarından birisi de gen terapisi üzerine olan çalışmaların uygulanabilirliğini geliştirmektir. Bu amaçla gen terapisinde kullanılabilecek materyallerin hazırlanması, pek çok hastalığın tedavisine yeni bir bakış açısı getirecektir. Hasarlı genleri pasif hale getirerek kontrol altına almak yüzyılımızın önemli araştırma konularındandır. Bu amaçla PAMAM (poliamidoamin) dendrimerleri ilk kullanılan dendrimerlerden olduğu gibi hala yaygın olarak kullanılmaktadır [50]. PAMAM dendrimeri ile ilgili genel bir değerlendirme yapan araştırmacılar, hücre zarından difüzyonla geçemeyecek büyüklükteki moleküllerin hücre içine alınabilmesi (Endositoz) için, jenerasyon sayısı düşük olan PAMAM denrimeri ile olan çalışmanın daha başarılı olduğunu belirtmişlerdir [51-53].

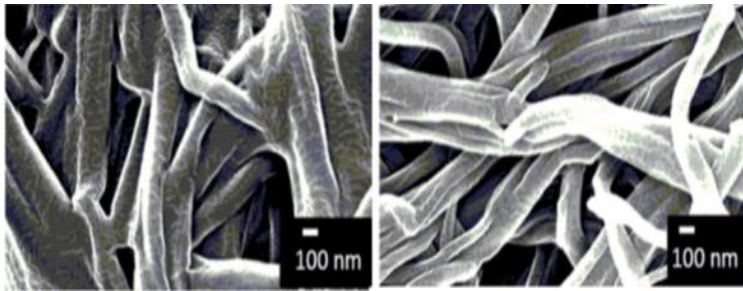


Şekil 2.19. a) ATP²⁻ anyonu, b) β-D-(+) Glukoz'un açık molekül yapısı, c) organometalik dendronun şematik görüntüsü

ATP anyonu (Adenozin-5'-trifosfat, ATP²⁻) ve glukozun elektrokimyasal olarak doğrudan tayini için yüksek dallanmış bir organometalik dendron sentezleyen Xiao ve diğerleri

dendronun yapısını aydınlattıktan sonra, dendronun elektrokimyasal davranışlarını incelemişlerdir [54].

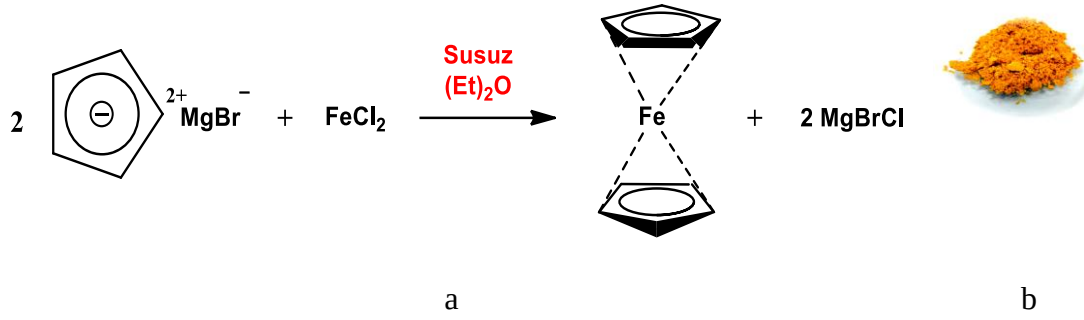
3,4,5-trialkoksifenil türevli dendronların jelatin özelliğini inceleyen *Ando* ve *Ito* isimli araştırmacılar giriş maddesi olarak 3,4,5-trihidroksibenzoat'tan faydalanmışlardır [55]. Jellerin morfolojik yapılarını SEM analizi ile incelemişler, oluşan ağimsı fiber yapıların yaklaşık olarak 100 nm lik çapa sahip olduğunu ve üç boyutlu olarak görüldüğünü ifade etmişlerdir (Şekil 2.20).



Şekil 2.20. Jelsi 3,4,5-trialkoksifenil türevli dendronların üç boyutlu morfolojik yapılarının görüntüleri

2.2. Ferrosenin Tarihçesi ve Özellikleri

Her ne kadar organometaller kimyasının temelleri 1800'lü yılların ilk çeyreğinde atılmış olsa da, bu konudaki çalışmalar 1950'lerde X-ışınları kırınımı metodunun bulunmasıyla ivme kazanmıştır [56]. 1951 yılında, İngiliz kimyacı *Pauson* ve öğrencisi *Kealy*, bir Grignard reaktifi olan siklopentadienilmagnezyum bromür (C_5H_5MgBr) ile demir(II) klorürü ($FeCl_3$) etkileştirerek fulvalen sentezlemeye çalışmış, fakat bunun yerine “ferrosen’i” sentezlediklerini ifade etmişlerdir [57]. Önceleri *Pauson* ve *Kealy* elde ettikleri molekülde iki metal-karbon σ bağının olduğunu düşünmüşler ancak 1952 yılında *Miller* ve grubu tarafından X-ışınları difraksiyon yardımıyla yapısı karakterize edilebilmiştir [58]. Buna göre Bis(siklopentadienil)demir kompleksindeki demir atomlarının yükseltgenme basamağı “+2”’dir. Demir atomu her iki halka ile bağ oluşturmaktadır, bu bağın belli bir karbon atomu ile Fe atomu arasında değil, demir ile halka arasında delokalize şeklinde olduğu açıklanmıştır. Bu bağa *Wilkinson* “sandviç” adını verirken, *Woodward* ise “ferrosen bağı” olarak isimlendirmiştir [59].



Şekil 2.21. a) Ferrosen'in oluşum reaksiyonu, b) görüntüsü

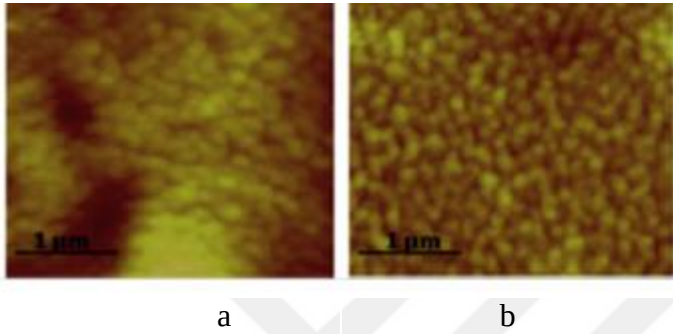
Siklopentadienil (Cyp) halkalarına sahip olması nedeniyle Fc, termal olarak çok kararlı aromatik bileşiktir. Bu termal kararlılık, demir atomu ile karbon atomu arasındaki bağ kopmadan, siklopentadienil grupları üzerinden birçok reaksiyona girmesinden kaynaklanır. Fc, erime noktası 174°C, bozunma sıcaklığı 400°C'nin üzerinde, kuvvetli asit, kuvvetli baz ve sudan etkilenmeyen, kapalı formülü $C_{10}H_{10}Fe$ olan moleküldür. Bunlara ek olarak Fe(II)'nin yarı dolu d orbitalleri sayesinde Fc bileşikler genelde kırmızı ve turuncumsu renge sahip bir katıdır. Belirgin renkleri sayesinde kolon kromatografisi yapıldığında, kolondan ayrılması çıplak gözle rahatça görülebilmektedir. Ayrıca redoks özelliği, hem organik hemde inorganik karakterde oluşu, çözücülerde iyi çözünbilme özelliği ile Fc, araştırmacıların dikkatini çeken bir bileşiktir. Yirminci yüzyılın ikinci yarısından itibaren ferrosen türevleri üzerinde pek çok çalışma yapılmıştır [56].

Fc türevlerinin ilaç uygulamalarında, antitümör, antibakteriyal, antimalariyal, antibiyotik (penisilin), antitüberküloz, antimikrobiyal, antianemik, antifungal gibi geniş alanlarda biyolojik aktiviteye sahip olmalarından ötürü gelecek yıllarda birçok hastalığın tedavisinde etken madde olarak kullanılabileceği düşünülmektedir [60-62]. Günümüzde Fc türevleri, kompozit roket yakıtlarında, malzeme biliminde, polimerik özellikleri iyileştirmede, sensör yapımında, doğrusal olmayan optik alet yapımında ve katalizör vb. gibi pek çok amaç için kullanılmaktadır.

1962 yılında, ilk defa *Clark* ve *Lyon* isimli araştırmacılar elektrot yüzeylerine enzim entegre ettiklerini açıklamışlardır. Bu tarihten sonra, enzim içerikli elektrokimyasal tabanlı biyosensör üzerine çalışmaların çeşitlendiği görülmektedir [63]. Ferrosen içerikli elektrot yüzeyleri içeren bazı araştırma sonuçları aşağıda sunulmuştur.

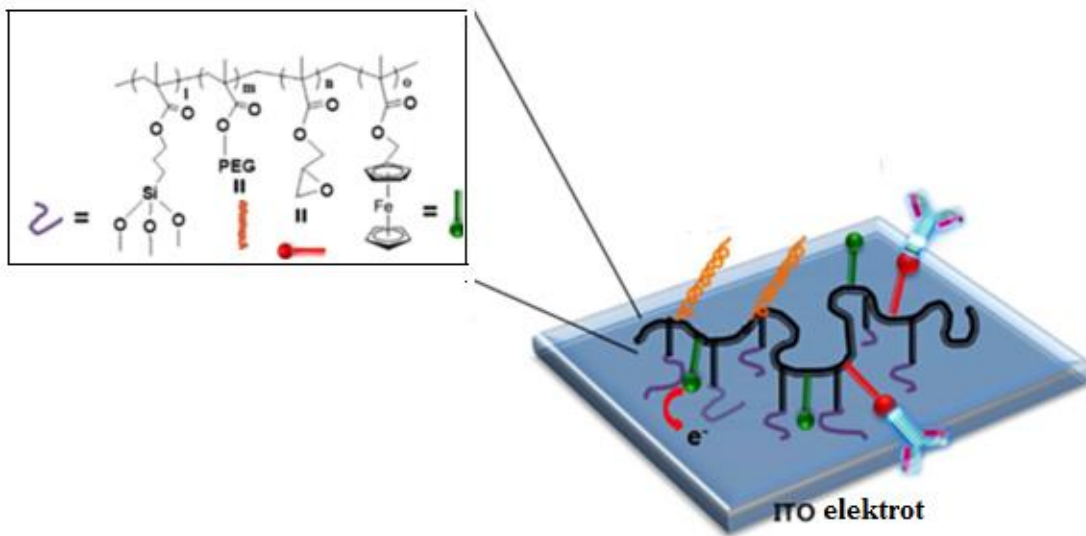
Pandey ve Prakash, sol jel metodu ile hazırlanmış olan nano yapılı silikat-TiO₂, silikat-TiO₂-Pd yapılarına, redoks mediatör özelliği gösteren ferrosen ve ferrisiyanür katarak bu bileşiklerin redoks davranışlarının nasıl değişebileceğini araştırmak için bir elektrot tasarlamışlardır.

Araştırmalarının sonucunda silika-TiO₂, silikat-TiO₂-Pd temelli elektrotların, ferrosen ve ferrisiyanür mediatörlerinin redoks davranışlarının farklı olduğunu söylemişlerdir [64].



Şekil 2.22. a) Silikat-TiO₂ ve b) Silikat-TiO₂-Pd AFM görüntüleri

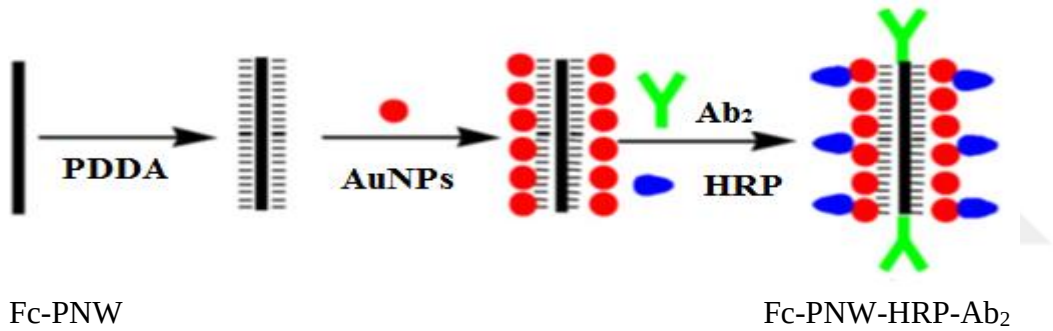
Redoksça aktif materyallerin son yıllarda değişik kullanım alanlarına sahip olmasından dolayı, *Sung ve Yang* indiyum titan oksit (ITO) elektrodu üzerine, radikalik polimerizasyon yöntemiyle ferrosen içeren multifonksiyonlu redoks kopolimer sentezlemişlerdir.



Şekil 2.23. ITO elektrot yüzeyine Fc içerikli polimerlerin ve antibodilerin tutturulması

Araştırmacılar bu elektrot yüzeyine IgG (immünoglobulin) ve PSA (prostat spesifik antijen) gibi antiadileri immobilize etmiş, ELİSA testinde immünosensör olarak kullanmışlardır [65].

1931 yılında fiziksel veya zihin bozukluklarında nöropeptit bir madde olan SP nin arttığı rapor edilmiştir. Bundan sonra SP'nin biyomedikal ve klinik olarak tayini önem kazanmıştır. Bu amaçla *Zhang* ve *diğerleri*, (SP) tayini için ferrosen (Fc) ile fonksiyonelleşmiş peptitnanotel (Fc-PNW) hazırlamışlardır. Hazırlanan bu nanotelin yüzeyini difenil alanin peptidi (FF) ile kapladıktan sonra, altın nanopartiküllerini yüzeye tutturmuşlardır. Bu işlemi takiben perosidaz (HRP) enzimi aracılığıyla ikincil (SP) antibodi Fc-PNW-HRP-Ab₂ oluşturarak, SP tayini yapabilecek yüksek duyarlılıklı sensör tasarlamışlardır [66].

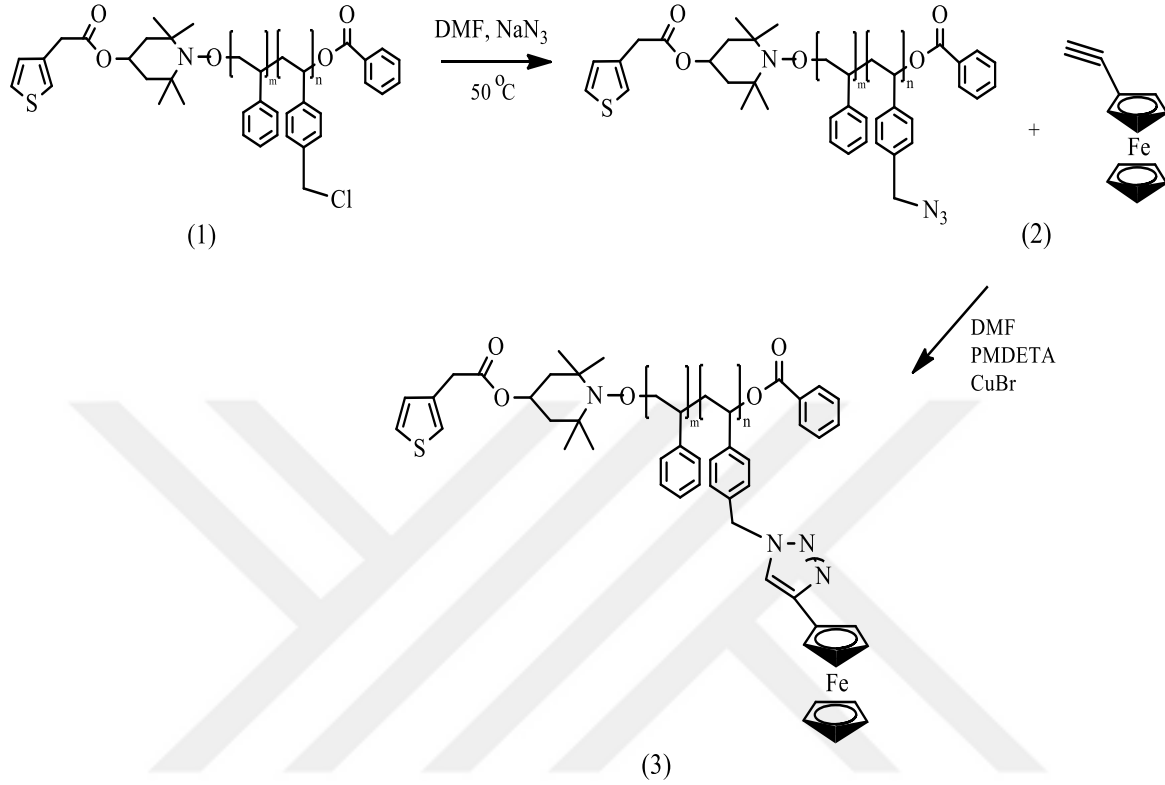


Şekil 2.24. SP'ye duyarlı immünosensör hazırlamasındaki adımlar

Boya esaslı güneş pillerinin (DSCs) yapısında nanokristal özellikli TiO₂ bulunmaktadır. Boya esaslı güneş pillerinde sürekli bir akım elde etmek için molekülde indirgeme ve yükseltgeme işlemlerinin tekrarlı olması gerekir. Ferrosenin iyi bir redoks özelliğine sahip olması nedeniyle *Daeneke* ve *diğerleri* boya esaslı güneş pillerinde ferrosenin kullanılabilirliği üzerine araştırma yapmışlar, araştırmalarının sonucunda bu pillerin endüstride kullanılmasıyla, günlük hayatta kullanılan güneş pillerinin oluşturduğu kadar enerji elde edebildiklerini (18-35 kJmol⁻¹) söylemişlerdir [67].

Bilindiği gibi, kimya endüstrisinde ve biyokimyada anyonlar önem arz etmektedir. Özellikle fosfat, enerji depolama, sinyal iletimi hatta bitki ve hayvanların temel besin kaynaklarının içerisinde bulunması nedeniyle önemli anyonlar arasındadır. Hiperparatiroidizm, D vitamini eksikliği ve Fanconi sendromu (Glikojen depo rahatsızlığı) gibi rahatsızlıklar, vücut sıvısında varolan fosfat iyonlarının derişimlerinin ölçülmesiyle

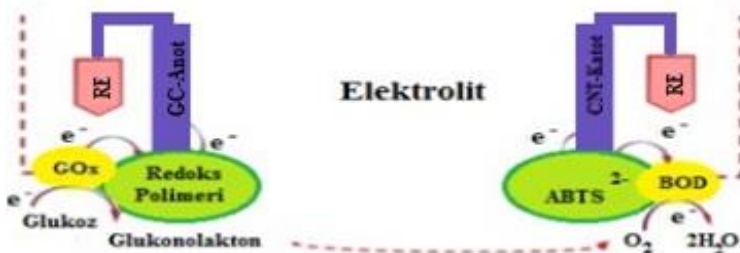
teşhis edilmektedir. Bu nedenle *Karagöllü ve diğerleri* fosfat tayini için ferrosen takılı bir kopolimeri hazırlamak için etinilferrosen'den faydalanmışlardır (Şekil 2.25).



Şekil 2.25. Ferrosen içeren kopolimer sentezi

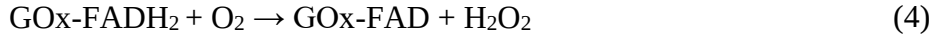
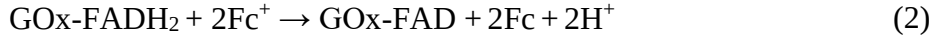
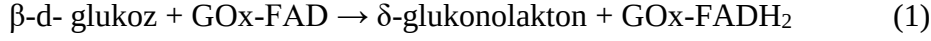
Hazırladıkları kopolimeri fosfolipit gibi fosfat içeren organik moleküllere karşı bir prob olarak kullanmışlardır [68].

Enerji teknolojisinde biyoyakıtların önemli yere sahip olmasından dolayı, *Bunte ve diğerleri* ferrosen içeren bir redoks polimerini biyoanot olarak hazırlamış ve GOx enzimini bu redoks polimerine immobilize etmişlerdir [69]. Hazırladıkları biyoyakıt hücrelerini, 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonat)diamonyum tuzu ile bilirubin oksidazı immobilize ederek hazırlamışlardır (Şekil 2.26).

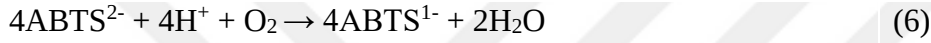


Şekil 2.26. Biyoyakıt hücresinin şematik gösterimi

Ayrıca biyoanot ve biyokatot'ta yürüten tepkimelerin aşağıda verildiği gibi meydana geldiğini belirtmişlerdir (Mekanizma (1-5), (6)). Biyoanot'ta gerçekleşen reaksiyonlar;

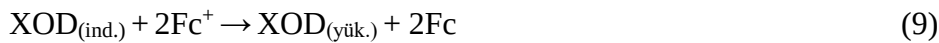
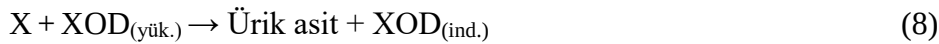


Biyokatotta gerçekleşen reaksiyonlar;



Elektron transferi sağlamada çeşitli mediatörlerin, demir ve osmiyum içeren komplekslerin, hidrokinon, metilen mavisi gibi organik boyar maddelerin biyosensör yapımında yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir [70,71]. Bunlar arasında ferrosen içerikli makromoleküller yaygın olarak kullanılmaktadır. Ferrosen etiketinin kullanılarak çeşitli sensörlerin hazırlandığı ve bu tür materyallerin geliştirilmesi üzerine olan çalışmaların çeşitlendiği görülmektedir [72,73].

Inosinmonofosfat (IMP), balık etindeki kokuyu ve tadı veren bileşiktir. Zamanla IMP'nin katabolizma reaksiyonu sonucunda indirgenerek hipoksantine (Hx) dönüşmesi etin tadında istenmeyen bir değişime neden olmaktadır. Bu nedenle hipoksantin tayini için, *Lawal* ve *Adeloju* isimli araştırmacılar polipirol filmi içerisine ferrosen karboksilik asit ve ksantin oksidaz enziminin (XOD)'ın hapsedilmesine dayalı bir potansiyometrik enzim elektrodu hazırlamışlardır [74]. Hazırlanan enzim elektrodunda oluşan reaksiyonun aşağıdaki şekilde olduğunu belirtmişlerdir (Mekanizma(7-10)).



Suda çözünen çapraz bağlı ferrosenler, katalitik aktiviteyi arttırmakta [75], alkolü yükseltgeyebilmekte [76], polisakkaritlerin tayininde [77], redoks bataryalarının yapımında [78], elektrodun yüzey modifikasyonunda [79] kullanılmaktadırlar.

2.3. Enzimler ve İmmobilizasyon

Bu bölümün alt başlıklarında, GOx ve AChE enzimlerinin tarihçesi, enzimlerin özellikleri, enzimatik reaksiyonlar, immobilizasyon ve yöntemleri, immobilizasyonun avantaj ve dezavantajlarına yer verilmiştir.

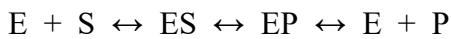
2.3.1. Enzimler

Enzimler üzerine çalışmalar 18. yüzyılın ikinci yarısında başlamış, İsveçli kimyacı *Jon Jakob Berzelius* 1835 yılında ilk kez enzimlerin kimyasal tepkimelerde katalizör olarak kullanılabileceğini rapor etmiştir [80-84]. 1940'lı yıllarda ise hastalıkların teşhisinde kullanılmaya başlanmıştır. Üreaz enzimi, ilk kez Cornell Üniversitesinden *James B. Sumner* tarafından soya fasulyesinden izole edilmiştir; *Sumner* bu çalışmasıyla 1947 yılında Nobel ödülünü almıştır. Ancak enzimlerin kataliz mekanizmalarının ve biyokimyasal reaksiyonlardaki rollerinin araştırılması son yıllarda popüler olmuştur.

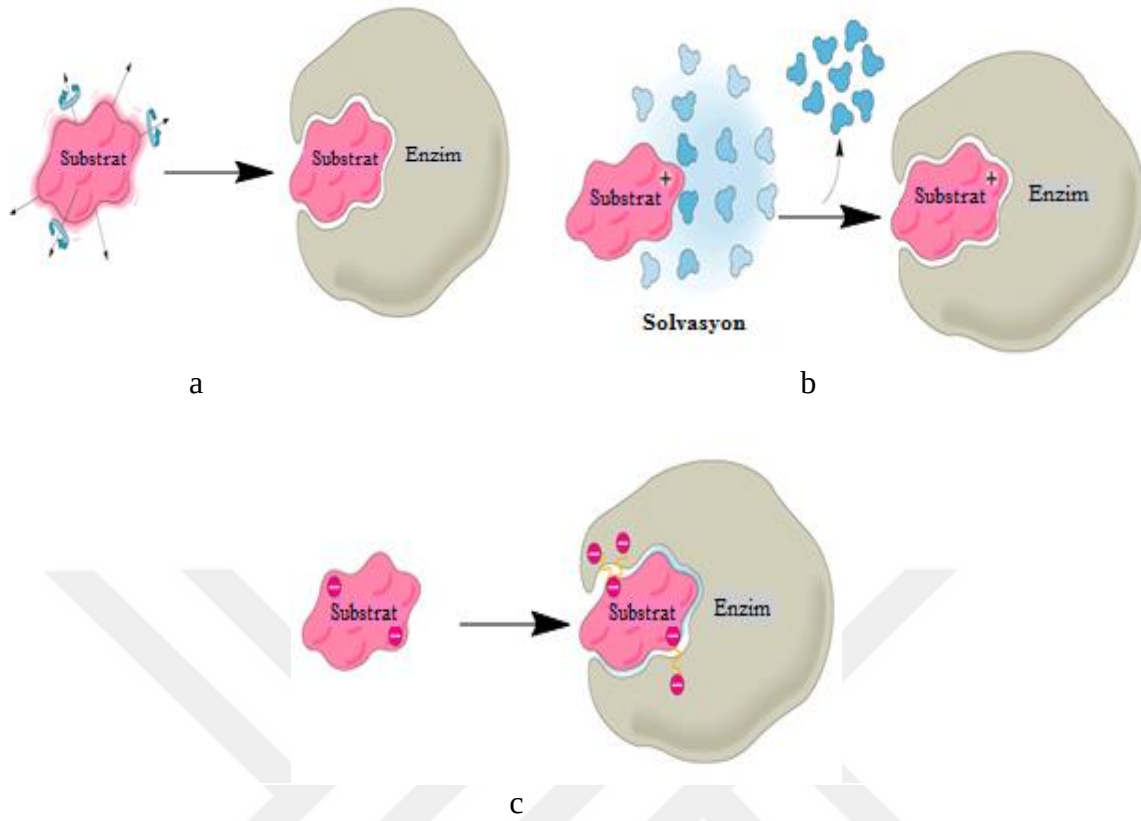
Enzimler biyokimyasal katalizörlerdir [85,86]. Katalizörlerin, termodinamik yönden istemli bir reaksiyon hızını 10^{11} kat veya daha fazla arttırabildiği bilinmektedir. Enzimler, hücre dokularının oluşmasında, eski dokuların yıkılmasında, alınan gıdaların enerjiye dönüştürülmesinde, atık maddelerin dışarıya atılmasında vb. kısacası hayat diye ifade ettiğimiz tüm faaliyetlerin gerçekleşmesinde rol oynayan kimyasal ajanlardır.

Enzim moleküllerinde aktif bölge olarak ifade edilen özel bir bölge bulunur. Bu bölge, substrat ile uyumlu olan üç boyutlu bir yüzey olup aminoasit yan zincirlerinden oluşur.

En basit enzimatik reaksiyon aşağıdaki gibi belirtilmektedir.

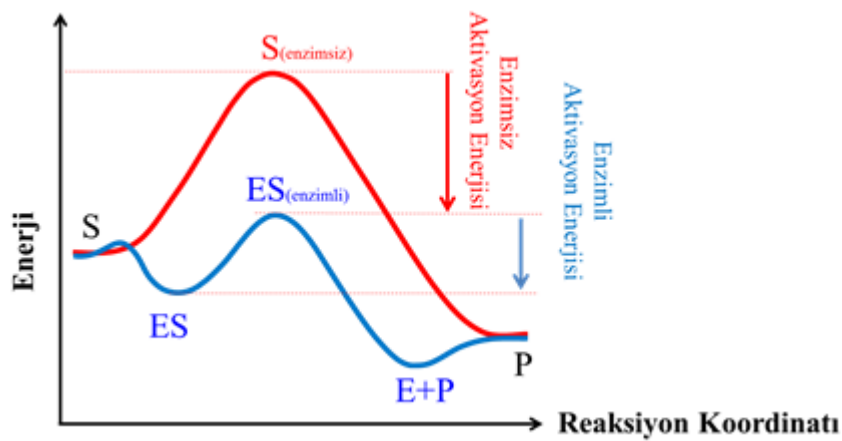


E: Enzim, ES: Enzim-Substrat Kompleksi, P: Ürün, S: Substrat (Enzimin etki ederek ürüne dönüştürdüğü molekül)'tır.



Şekil 2.27. a) Enzim substrat, anahtar-kilit modeli, b) solvasyon, c) ES kompleksinde elektrostatik kararsızlık

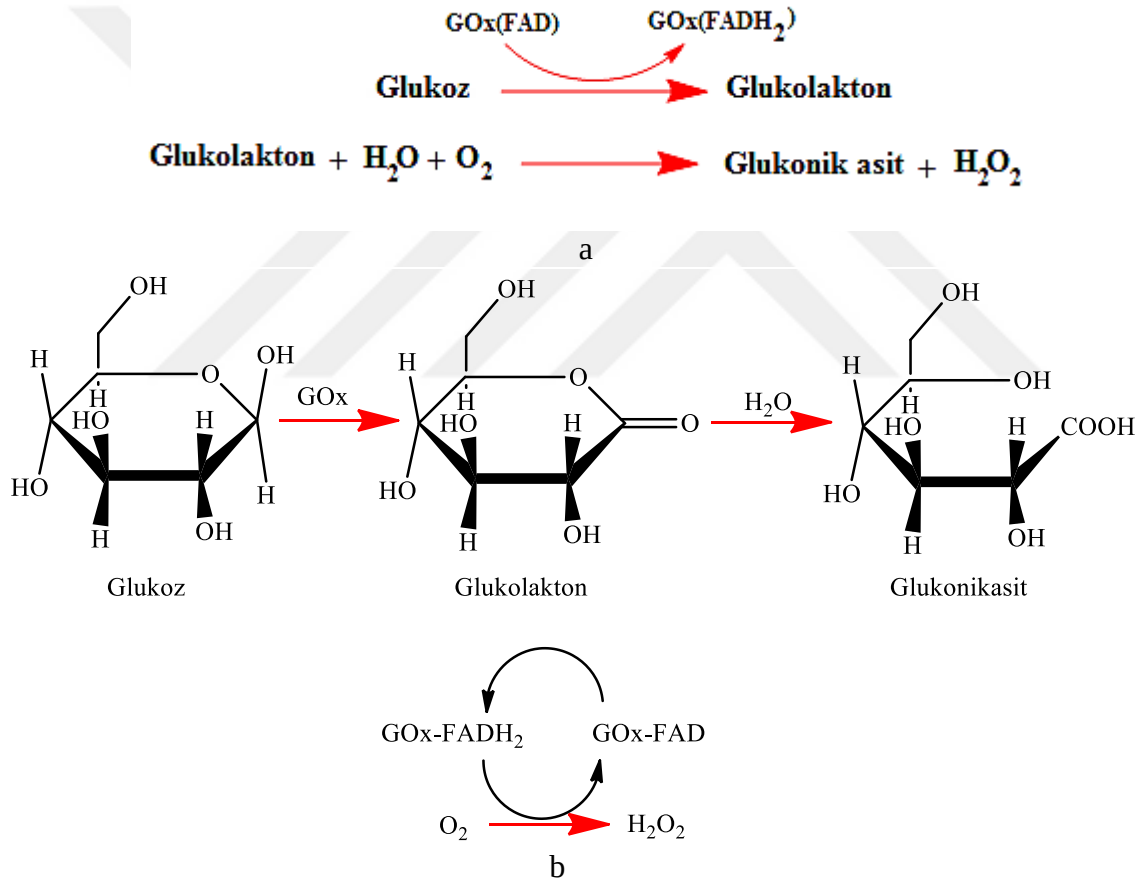
Enzimin aktif bölgesine substrat bağlanarak ES kompleksi meydana gelir. Daha sonra, enzim-ürün (EP) kompleksinden enzim ayrılır, böylece ürün serbest (E+P) hale geçer. Enzim, tepkimenin aktivasyon enerjisini düşürerek tepkimeyi hızlandırır [87].



Şekil 2.28. Reaksiyon enerji diagramı

Glukoz oksidaz (GO_x) enzimi

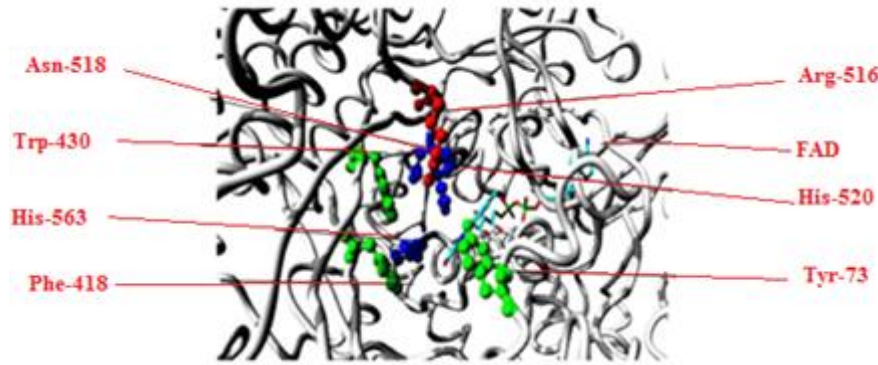
1950'li yılların başlarından itibaren teknolojik uygulamalarda geniş çapta kullanılan Glukoz oksidaz enzimi (GO_x) farklı mantarlardan, özellikle *Aspergillus niger* ve *Penicillium*'dan saflaştırılarak elde edilmektedir [88,89]. Oksidoredüktaz bir enzim olan GO_x (β-D-Glukoz; oksijen 1-oksidoredüktaz, IUPAC kodu: EC 1.1.3.4) β-D-Glukozun glukonik aside yükseltgenmesini katalizler. Yükseltgenme sırasında, oksijen molekülü elektron alarak H₂O₂ meydana gelir [90]. GO_x'ın prostetik grubu, flavin adenin dinükleotittir (FAD) ve her 1 mol β-Glukoz oksidaz , 2 mol FAD içerir.



Şekil 2.29. a) Glukoz'un GO_x varlığında Glukonik aside yükseltgenme mekanizması, b) açık yapılarının gösterimi [91]

Optimum pH aralığı 5,0-6,5 ve optimum sıcaklık aralığı 40-50 °C olan GO_x [92], diş macununda katkı maddesi [93], yiyeceklerde koruyucu ve antioksidan olarak [94] ve glukozu duyarlı sensör yapımında kullanılmaktadır [95]. GO_x'ın aktif bölgesindeki aminoasit kalıntıların Tyr-73, Phe-418, Trp-430, Arg-516, Asn-518, His-520 ve His-563, enzimin kinetik parametrelerinde rol oynadığı ifade edilmektedir [96]. Bu aminoasitlerden

Arg-516 in, β -D-Glukoz'a bağlandığı Witt ve diğerleri tarafından açıklanmıştır. Ayrıca tepkime sırasında, aromatik yapıdaki Tyr-73, Phe-418 ve Trp- 430 aminoasitlerin substrat ile olan etkileşimin hızlı olmasına yardımcı olduğu, His-520 ve His-563 aminoasitlerinin ise Glukoz'un 1-OH grubuyla hidrojen bağı oluşturarak ürünün oluşumuna katkı sağladığını söylemişlerdir.

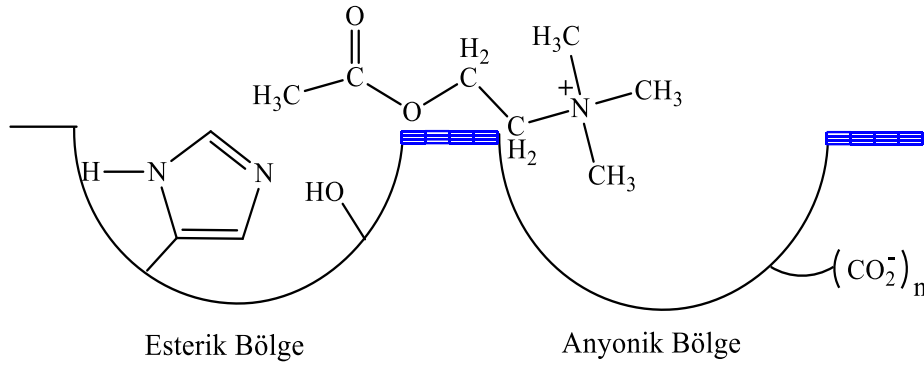


Şekil 2.30. GO_x enziminde FAD ve aktif bölge atıkları [97]

Asetilkolin esteraz (AChE) enzimi

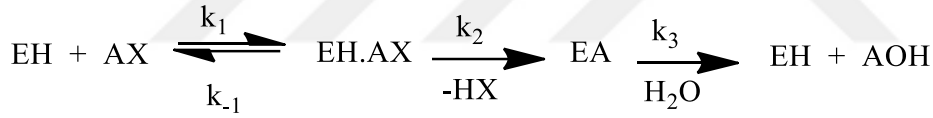
Polimorfik bir enzim olan Asetilkolin esteraz'ın (AChE) fizyolojik rolü, kolinerjik sinapslarda sinir impulslarının sonlandırılmasını sağlamaktır. İlk kez 1938 yılında elektrik balığından (*Torpedo marmoreta*) saflaştırılan AChE, asetilkolin molekülünü hidroliz eder. En güçlü hidrolaz enzim olan AChE, 150 ms'lik dönüşüm süresi (turnover süresi) ile, dakikada 4×10^5 adet ACh molekülünü hidroliz eder [98]. AChE'in aktif merkezi uzun ve dar bir oluk yapısındadır. Üç önemli aktif merkeze sahiptir. Bunlar sırasıyla;

1. Esterik Bölge; Serin amino asidini içerir, ayrıca katalitik üçlü olarak ifade edilir. (Ser-200, His-440 ve Glu-327)
2. Anyonik Bölge; Esterik bölgeden 4,7 Å'dan daha büyüktür.
3. Hidrofobik Bölge; Esterik veya anyonik bölgeye bitişik olan aril substratların bağlandığı bölgedir [99-101].



Şekil 2.31. AChE'nin aktif bölgeleri ($n = 6-9$, çapraz bağlı aktif bölgeler, hidroforbik etkileşimler)

AChE tetramer (G4) yapısında olup suda çözündüğünde dimer yapısında (G2) bulunabilir. Alzheimer hastalarının beyinlerinin belli bölümlerinde G4 formundaki AChE'nin azaldığı rapor edilmiştir [102]. Aşağıda tepkimesi verilen, Asetilkolinin(ACh) hidrolizinde, enzim-substrat kompleksi (EH.ACh) oluşuktan sonra, kolin molekülü (HCh) açığa çıkar. Bunu takiben asetik asit (AOH) ile asetillenmiş enzim (EA) yapısı oluşur. Daha sonra asetillenmiş enzim hidrolizlenir ve enzim serbest hale geçer.



2.3.2. Enzim immobilizasyonu

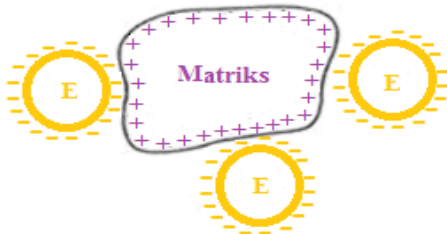
İmmobilizasyon, kimya terminolojisinde enzimlerin ya da mikroorganizmaların katalitik aktifliğini koruyarak, sürekli ve tekrarlı kullanımını sağlamak amacıyla organik ve inorganik taşıyıcılara tutturulması veya hapsedilmesi anlamına gelir [103]. İmmobilizasyon çalışmalarının yaygınlaşmasının nedeni, enzimlerin kontrolünü sağlayarak maliyeti düşürmektir. Bilindiği gibi, serbest enzim kullanıldıktan sonra istenildiği anda ortamdan uzaklaştırılmaz. Enzimin uzaklaştırılabilmesi için ortama inhibitör eklenmelidir. Ancak, inhibitörün eklenmesi ortamın daha da kirlenmesine neden olur. Bu durum enzimin yeniden kullanılmasını zorlaştırır [104]. İmmobilizasyon ile bu sakıncalar ortadan kalkar.

İmmobilizasyon yöntemleri

Enzim immobilizasyon metodları temel olarak dört grup altında incelenir.

Adsorpsiyon

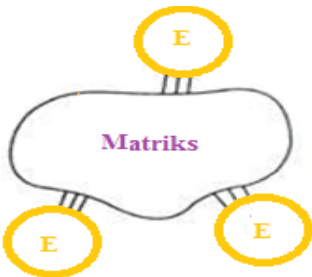
Enzim moleküllerinin hidrofobik ya da iyonik etkileşimlerle destek yüzeyinde tutunmasıdır. Bu yöntem ile enzim tutuklanması, substratın derişimine, ortamın pH'sına ve iyonik şiddetine bağlıdır. Bundan dolayı destek materyalin seçimi önemlidir. Yaygın olarak kullanılan destek materyalleri, gözenekli karbon, kil, sulu metal oksitler, cam ve polimer yapılı aromatik reçinelerdir.



Şekil 2.32. Adsorpsiyon yöntemiyle enzim immobilizasyonunun şematik gösterimi

Kovalent bağlanma

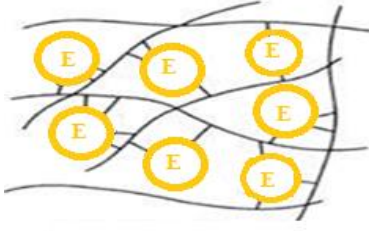
Enzim molekülleri desteğe kovalent bağ ile bağlanır. Bu bağlar kuvvetli olduğundan, çalışmalar esnasında enzim kaybı meydana gelmez. Kovalent bağ, destek ile enzimdeki yan zincirlerde bulunan fonksiyonel gruplar arasındaki etkileşim sonucu oluşur. Oluşan bu bağın kuvveti aşağıda verilen fonksiyonel grup sırasına ($-S^- > -SH > -O^- > -NH_2 > -COO^- > -OH \gg -NH_3^+$) göre değişmektedir [105]. Yaygın olarak kullanılan destek materyallere örnek; agaroz, selüloz ve poliakril amitler verilebilir.



Şekil 2.33. Kovalent bağlanma yöntemiyle enzim immobilizasyonunun şematik gösterimi

Hapsetme

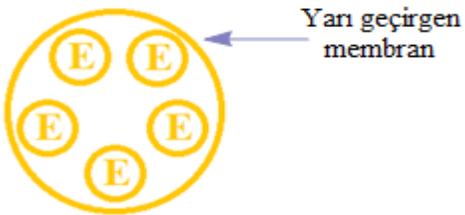
Enzim moleküllerinin jel veya fiber gibi destek madde içerisine hapsedilmesidir. Kovalent olmayan hapsetme yönteminde enzim molekülleri kafes içerisinde yer alır. Kovalent bağlanmanın olduğu hapsetme yönteminde ise, enzim ile destek arasında uygun bir ajan kullanılması gerekir.



Şekil 2.34. Kafes(matriks) içine hapsetme yöntemiyle enzim immobilizasyonunun şematik gösterimi

Membran (Mikrokapsül) içerisinde hapsetme

Enzim moleküllerinin susuz ortamda yarı geçirgen bir membran içerisinde hapsedilmesidir. Yarı geçirgen membranın gözenek boyutları, substrat ve ürünün giriş ve çıkışına izin verirken, enzimin çıkışına izin vermez. Yöntemin avantajı, herhangi bir kimyasal bağlanma olmadığı için enzimin aktifliğinin serbest enzimin aktifliğine yakın olmasıdır.



Şekil 2.35. Membran içine hapsetme yöntemiyle enzim immobilizasyonunun şematik gösterimi

İmmobilizasyonun avantaj ve dezavantajları

1. Enzimler pahalı katalizörlerdir. Polar çözücülerde çözünen enzimlerin çözücü ortamından tekrar kazanımları oldukça zor ve maliyetlidir. İmmobilizasyon, enzimlerin tepkime ortamından kolayca ayrılmasını ve tekrar kullanılmasını mümkün kılar. Bu durum maliyetlerin düşmesini sağlar.

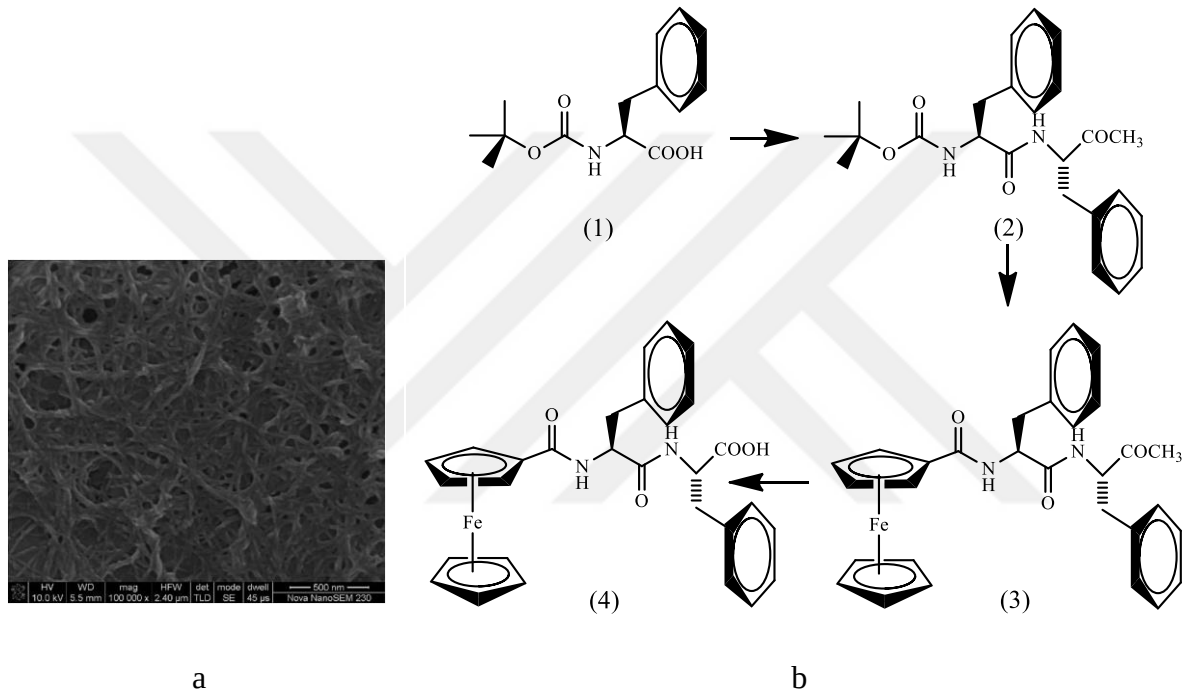
2. Oluşan ürünün enzimden ayrılması daha kolaydır.
3. İmmobilizasyon sayesinde susuz ortamda da enzimin kullanılabilirliği mümkün olmaktadır.
4. Ürün oluşumunun devamlılığı, immobilizasyon ile mümkün olurken serbest enzim ile mümkün olmamaktadır.
5. Bazı enzimlerin termal kararlılığı immobilizasyon sayesinde artabilir. *Örnek:* Glukoz izomeraz 45°C de çözeltide bozunurken immobilizasyonla 65°C de yaklaşık bir yıl boyunca kararlılığını sürdürür.
6. Enzimin geri kazanımı mümkün olduğu için çözelti ortamından uzaklaştırılması sırasındaki problemler azaltılmış olur.
7. İmmobilize enzimler serbest enzime göre daha derişik kullanılabilirler.
8. İmmobilizasyon ek bir maliyete neden olur. Özellikle pahalı enzimlerin hem ekonomik, hem de süreç açısından bir avantaja sahip olması durumunda kullanılır.
9. İmmobilizasyon, enzimlerin aktifliğine ve/veya kararlılığına olumsuz etkileri olabilir. Bu gibi durumlarda uygun immobilizasyon yöntemi geliştirilmelidir.
10. Substratlardan biri çözünür değilse bu yöntem uygulanamaz.
11. Bazı immobilizasyon yöntemleri, düfizyonel sınırlamalar nedeniyle substratın enzimle etkileşimine engel olabilir.
12. İmmobilize enzimlerin kullanılması durumunda ürün prosesinde bazı değışikliklerin yapılması gerekebilir.
13. Hücre immobilizasyonunda kirlilik oldukça önemlidir. Böyle durumlarda antibiyotikler kullanılabilir.
14. Canlı hücreler immobilize edildiğinde bu hücreler çoğalabilirler. Bu durum ürünün kirlenmesine sebep olduğu gibi ayrılmasını zorlaştırır. Dolayısıyla substratın kullanılabilirliği azalır.

2.4. GOx ve AChE Enzimleri Üzerine Yapılan Çalışmalar

Bu bölümde son yıllarda literatürde yer alan Glukoz oksidaz (GOx) ve Asetilkolinoksidaz (AChE) enzimlerinin immobilizasyonu ve uygulamaları üzerine yapılmış çalışmalara yer verilmiştir.

2.4.1. GOx'un analitik tayinlerde kullanımı

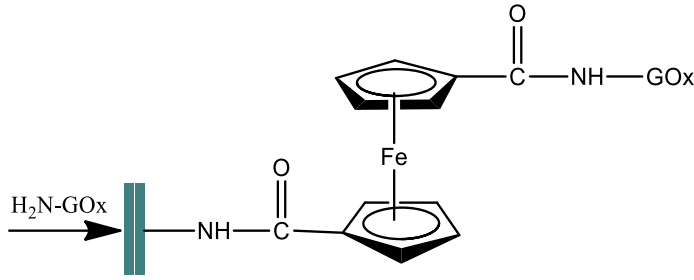
Wang ve diğ^{er}leri çift ferrosenli difenilalaninin (FF) kendiliğinden düzenlenme yoluyla Ferrosen şapkalı peptitnanotelleri sentezlemişler (Fc-PNWs) (Şekil 2.36 b), taramalı elektron mikroskopuyla (SEM) Fc-PNWs'nin yüzey morfolojisini inceledikten sonra GOx'ı immobilize etmişlerdir. Böylece glukozun elektrokimyasal tayinini yapabilecek bir kit geliştirdiklerini ifade etmişlerdir [63].



Şekil 2.36. a) Fc-PNW' nin SEM görüntüsü, b) ferrosen şapkalı peptitnanotellerin sentez rotası

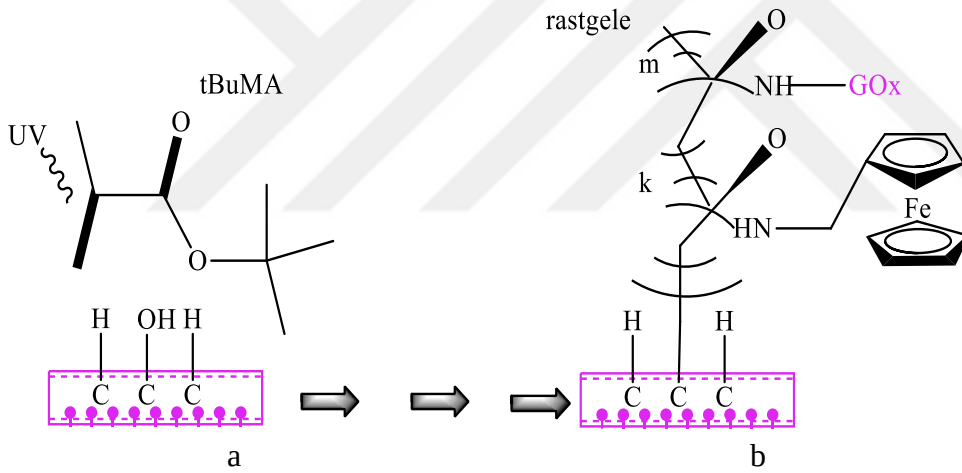
Çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNTs) ve ferrosenin çitosan üzerine kaplanmasından sonra glukozoksidaz enzimi (GOx) immobilize ederek kararlı bir glukoz biyosensörü hazırlayan *Fatoni ve diğ^{er}leri* bu sensörün glukoz tayininde kullanılan Hekzokinaz metodu (Enzimatik Ultraviyole Metod) kadar etkili olduğunu ifade etmişlerdir [106].

Shim ve diğ^{er}leri etilendiaminli grafit karbona kovalent bağla ferrosen dikarboksilik asiti bağladıktan sonra, GOx enzimini immobilize ederek (Şekil 2.37) enzimatik biyoyakıt hücresi oluşturmuşlardır. Bu enzimatik biyoyakıt hücresiyle nötral elektrolit ortamında bulunan 20 mmol'lık glukozu başarılı bir şekilde tayin ettiklerini ifade etmişlerdir [107].



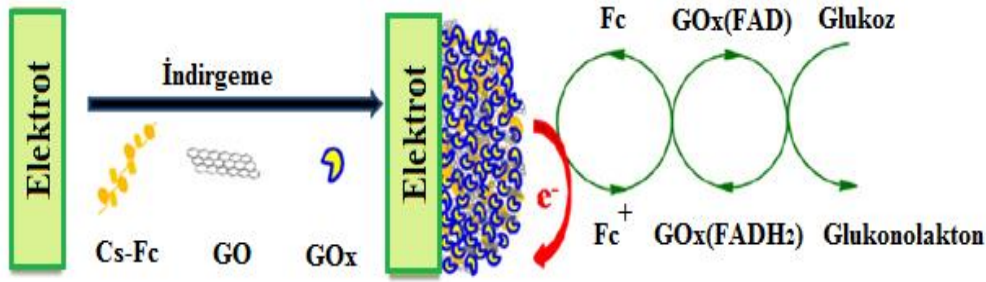
Şekil 2.37. Fc içeren desteğe GOx'ın immobilize edilmesiyle oluşturulan elektrot

Elmas yüzeyinin fonksiyonelleştirilmesine dayalı çalışmaların artmasının nedeni, elmasın son derece kararlı ve dayanıklı olmasıdır. Bu amaçla *Reitinger* ve *diğerleri* elmas yüzeyinde, poli(metakrilik asit) (PMA) fırçalarını oluşturduktan sonra, aminometilferrosen ve glukozoksidaz (GOx) enzimini birlikte immobilize etmişlerdir. Biyouyumlu olan bu polimerik fırçaların çok kararlı olduğunu ifade etmişlerdir [108].



Şekil 2.38. a) -OH gruplarıyla sonlandırılmış elmasın üzerinde terbütül metilakrilat'ın kendiliğinden fotografit ve fotopolimerizasyonu, b) Aminometilferrosen ve glukoz oksidaz'ın birleştirilmesi

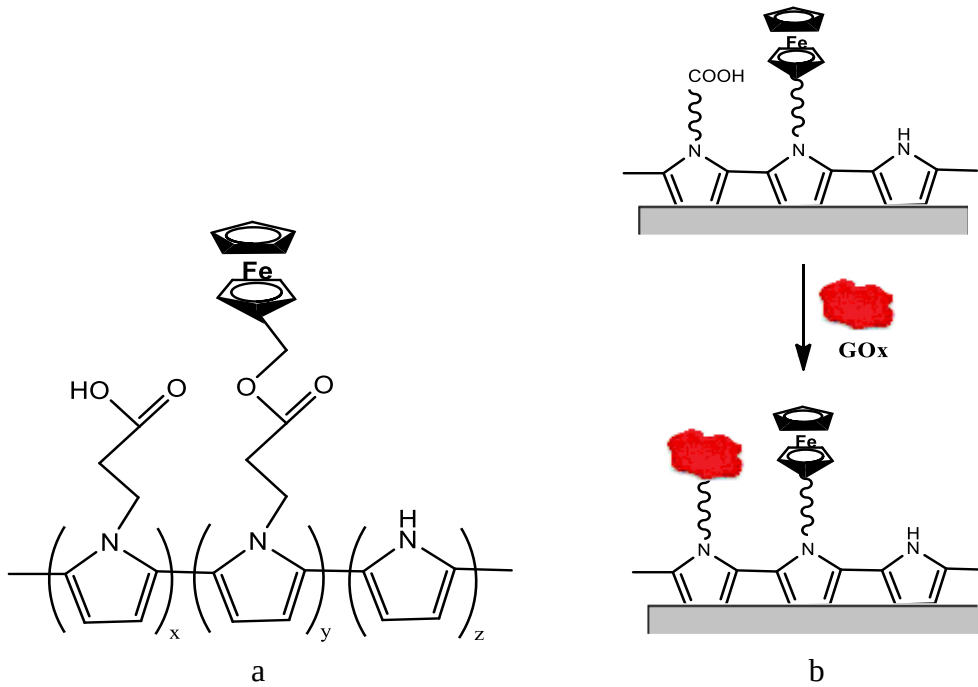
Çitosan, selülozdan sonra en yaygın olarak kullanılan bir biyopolimerdir. Çitosanın bu özelliğinden faydalanan *Qiu* ve *diğerleri* enzim elektrodu hazırlarken, Grafen oksit ve ferrosenden de faydalanmışlardır. Grafen oksitin kararlı olması ve ferrosenin redoks özelliği göstermesi nedeniyle araştırmacılar hazırladıkları elektrodun yüzeyine yapılan immobilizasyonun daha kararlı olabileceğini öngörmüşlerdir. Bu nedenle, üç bileşeni enzim elektrodu hazırlayan *Qiu* ve *diğerleri* fizyolojik ortamda negatif yüklü GOx enzimini immobilize etmişlerdir (Şekil 2.39).



Şekil 2.39. CS-Fc/GO/GOx modifiye elektrot'un ve Glukoz'un GOx ve mediatör Fc varlığında yükseltgenmesinin şematik gösterimi

Böylece hazırladıkları elektrodun GOx tayinindeki performansının, tekrarlanabilirliğinin ve duyarlılığının iyi olduğunu belirtmişlerdir [109].

N-(3-(1H-pirol-1-il)etil)ferrosenkarboksil (Py-Fc) monomerini (Şekil 2.40.a) sentezleyen Şenel elektrokimyasal polimerizasyonla bir kopolimer oluşturarak, elektrot yüzeyine GOx enziminin immobilizasyonunu gerçekleştirmiştir. Amperometrik enzim tabanlı olan biyosensörün (Şekil 2.40.b) kan-glukoz seviyesini belirlemede kullanılabileceğini ifade etmiştir [110].

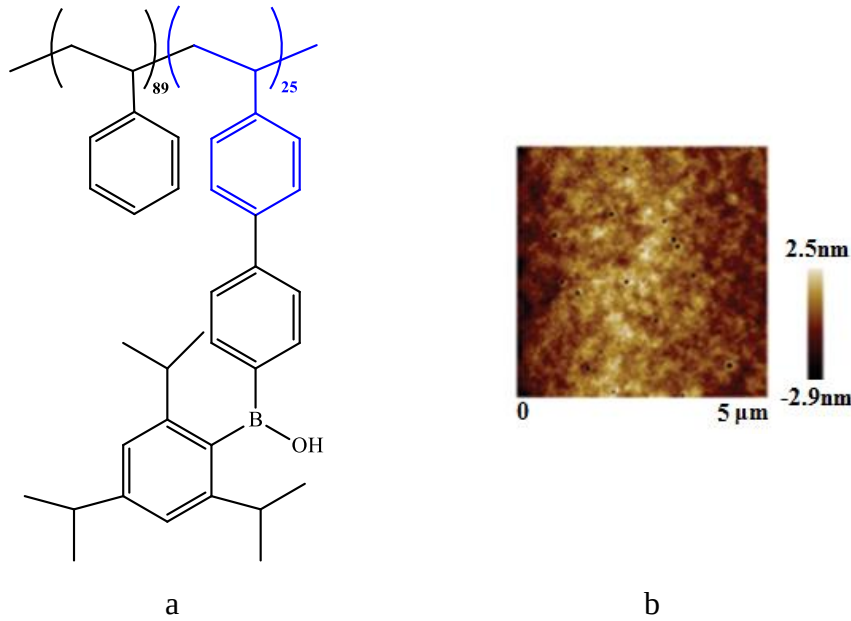


Şekil 2.40. a) Fc içeren kopolimer, b) kopolimer kaplı elektrot yüzeyine karboksilik asit aracılığıyla enzim immobilizasyonu

2.4.2. AChE enziminin analitik tayinlerde kullanımı

Barik ve diğerleri Asetilkoline duyarlı bir transistör tasarlanmasında, yarı iletken olan n-tipi karbon nanotüp ile çitosan/nikel oksitten faydalanmışlardır. Araştırmacılar 1,25 V'luk bir akım ile 25°C'de 0,01–0,2 mM asetilkolini duyarlı bir şekilde ölçebildiklerini ifade etmişlerdir. Hazırlanan bu transistörün ömrünün on yıl olduğunu ifade eden araştırmacılar, biyomedikal uygulamalarda ve çeşitli biyoinorganik ortamlarda nano yapıları mükemmel bir sensör tasarladıklarını ifade etmişlerdir [111].

Bor içeren polimerik materyallerin son yıllarda yeni fonksiyonel materyaller olarak dikkat çektiği görülmektedir [112]. Özellikle triarilbor ile fonksiyonel hale getirilmiş polimerlerin, lüminesans özellik göstermesi yada boroksol ile fonksiyonelleştirilmiş polimerlerin biyomedikal gibi alanlarda kullanılması nedeniyle, bor içerikli materyallerin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar yaygınlaşmıştır [113,114]. *Cheng ve diğerleri* borik asit blok kopolimerlerini sentezleyerek asetilkolin esterazı immobilize ettikten sonra asetil tiyokoline duyarlı sensör tasarlamışlardır. Asetilkolin esterazın hazırladıkları kopolimere kovalent olarak bağlandığını, bağlanmayan enzimin ise tamponla uzaklaştırdıklarını ifade etmişlerdir [115].



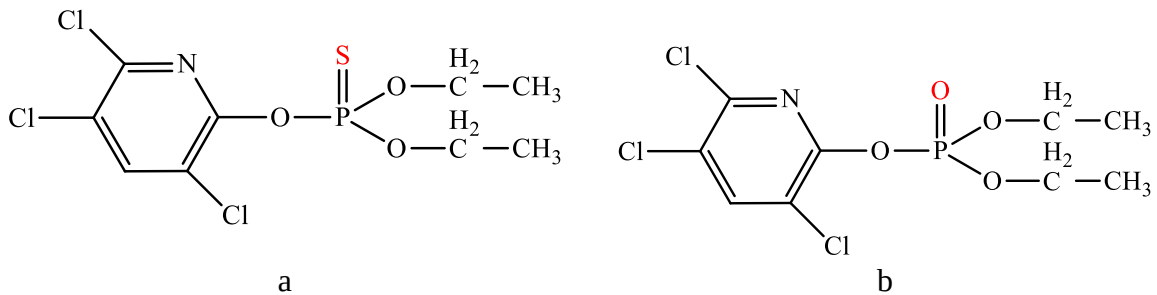
Şekil 2.41. a) PS-*b*-PBA blok kopolimeri, b) mika üzerindeki kopolimer filmin [PS-*b*-PBA] = 1 mg mL⁻¹, 0,3% H₂O in THF (v/v) AFM görüntüsü

Fransızca olarak ifade edilen “pesticide” kelimesinin Türkçe karşılığı olan pestisit; insektisit, herbisit, fungusit, rodentisit gibi sınıflandırılan kimyasal maddelerin tümünü kapsamaktadır [116]. Pestisitlerin kullanımına dair ilk çalışmaların M.Ö. 1500’lü yıllarda bit, pire, eşek arıları gibi insektisitler üzerinde olduğu yazılı kaynaklarda görülmektedir.

Bir grup pestisit olan organofosfat bileşiklerinin (OP) kimyasal silah olarak kullanıldıkları bilinmektedir. OP lar canlıların sinir sistemindeki AChE enzimini tersinmez olarak inhibe ettikleri için, bu bileşikler AChE enziminin inhibisyonunun ölçülmesinde iyi bir biyomarker olarak kullanılmaktadırlar [117]. Bu nedenle çevredeki OP tayini önemlidir. OP pestisitlerin tayininde, gaz kromatografisi (GC), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), enzime bağlanmış immunosorbent deneyi (ELİSA) ve kalorimetrik metodlar kullanılmaktadır [118]. Enzim immobilizasyon yöntemi kullanarak pestisit tayini ile ilgili araştırmaların son on yıldır yapılmaktadır. Aşağıda konu ile ilgili araştırmaların bir özeti geçmişten günümüze doğru sunulmuştur.

Vakurov ve diğerleri, dönüşümlü voltametri (CV) kullanarak 4-nitrobenzeni, 4-aminobenzene indirgemiş ve 4-aminobenzen ile baskılanmış (screen-printed) karbon elektrot yüzeyini hazırlamışlardır. Sonra bu elektrot yüzeyini glutaraldehit ve tereftaldikarboksialdehit ile modifiye etmişler ve elektrotların yüzeyine 2,5 mg/mL AChE enzimini immobilize etmişlerdir [119].

Klorpirifos-etil-okson (CPF) bileşiği, bahçe, tarım ve orman zararlılarına karşı yaygın olarak kullanılan bir insektisittir. *Zejl ve diğerleri* sonojel karbon elektrot üzerine Al_2O_3 -AChE’ı (0,7mIU) yüklenmesi ile biyosensör hazırlamışlar ve saklama koşullarının +4°C’de, pH 7 tamponunda olması gerektiğini ifade etmişlerdir.

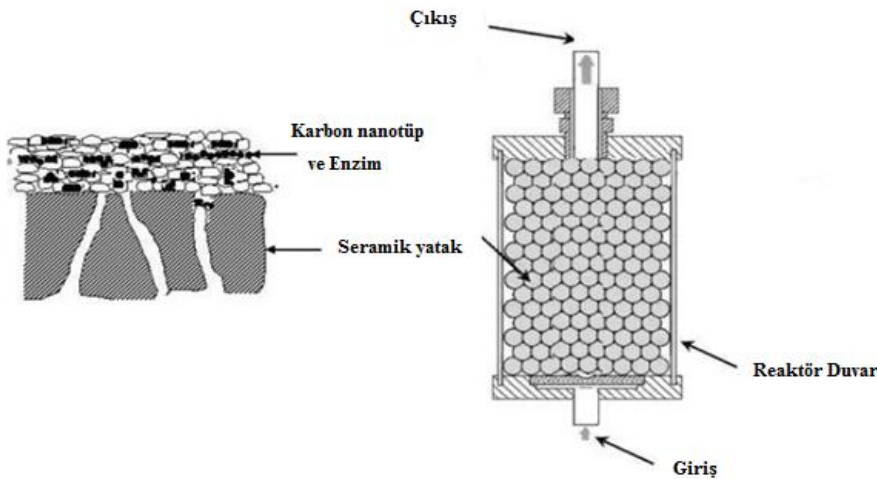


Şekil 2.42. a) Klorpirifos, b) Klorpirifos-etil-okson’ın gösterimi

Hazırlanan elektrokimyasal biyosensörün, CPF pestisitine (Şekil 2.42.b) olan duyarlılığın yüksek olduğunu ve tayin sınırının $2,5 \times 10^{-10}$ M olduğunu belirtmişlerdir [120].

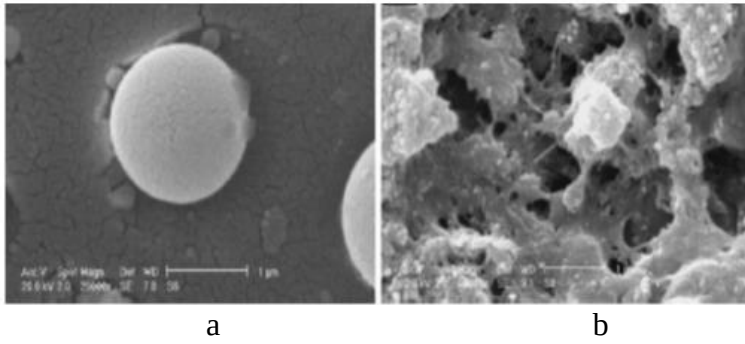
Karbon nanotüplerin elektriksel iletkenliği, mekanik direnci ve kararlılığının büyük olmasından dolayı *Periasamy* ve *diğerleri*, çok katmanlı karbon nanotüp, altın nanopartikül, zirkon nanopartikül, kadmiyum sülfid nanopartiküllerden oluşan nanomateriyallerin yüzeyine AChE'nin immobilize edilmesi sonucunda hazırlanan nanomateriyal tabanlı sensörlerin organofosfat pestisit tayinlerinde başarılı şekilde kullanıldığını belirtmişlerdir [121].

Ebrahimi ve *diğerleri* pestisit tayininde kullanmak üzere, kesintisiz bir akış sistemi hazırlamak için çok katmanlı nanotüp ve AChE enziminden oluşan bir karışım hazırlamışlardır. Bu karışımı seramik silindirler üzerine immobilize etmişlerdir. 120 gün sonunda 74% aktiflik gösteren immobilize enzim, paraokson tayininde kullanılmıştır; 14 dakikalık bir inkübasyon süresi sonunda tayin sınırının $7,3 \times 10^{-12}$ mol olduğunu rapor edilmiştir [122].



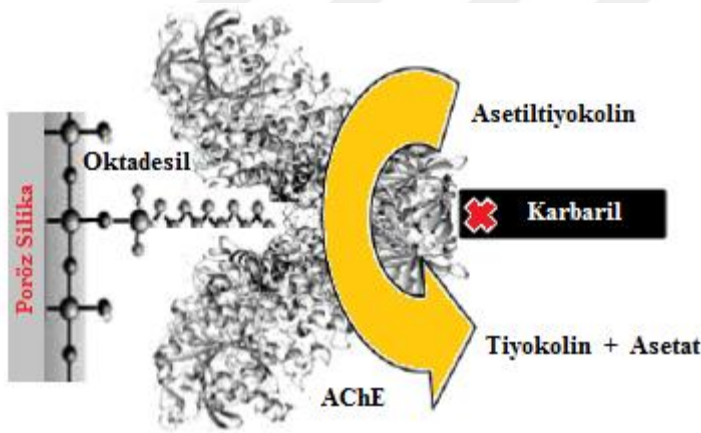
Şekil 2.43. Reaktör hücrenin şematik gösterimi

Aynı araştırmacılar bir yıl sonra, sol-jel metoduyla hazırladıkları çok katmanlı karbon nanotüpü seramik silindirler üzerine kaplayarak (MWCNT) oluşturdukları desteğin yüzeyine yapmış oldukları immobilizasyonun (MWCNT-AChE), yine sol-jel metoduyla hazırlanan grafit kaplı seramik silindirlere (Grafit-AChE) göre immobilizasyonun daha verimli olduğunu ifade etmişlerdir. MWCNT üzerine immobilizasyon için kullanılan AChE 2840 μ L iken, grafit için 590 μ L olduğunu belirtmişlerdir [123].



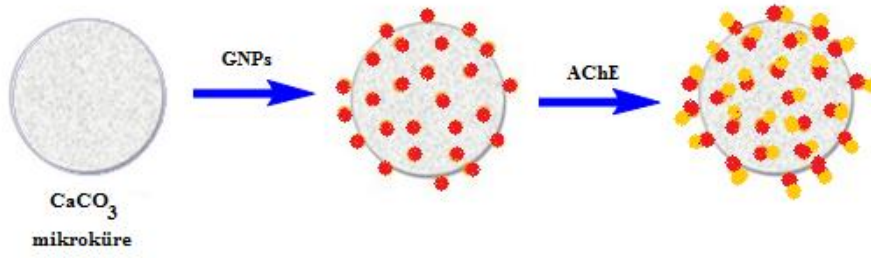
Şekil 2.44. a) Seramik yüzeyde sol-jel'e göre hazırlanmış grafite enzimin hapsedilmesi, b) hazırlanmış MWCNT'de enzimin hapsedilmesi

AChE enzimi iki sinir hücresi arasında bağlantıyı sağlayan önemli bir moleküldür. Karbamat pestisitlerinin AChE enzimini tersinir olarak inhibe edebilmesinden yola çıkan *Norouzy ve diğerleri* karbaril analizini yapabilmek için gözenekli silika yüzeyini oktadesil ile modifiye ettikten sonra asetiltiyokolinesterazı immobilize etmişler. Böylece yüksek bir depolama ve tekrarlanabilirliğine sahip olan immobilize enzim ile karbaril tayin sınırının 50 μL olduğunu belirtmişlerdir [124].



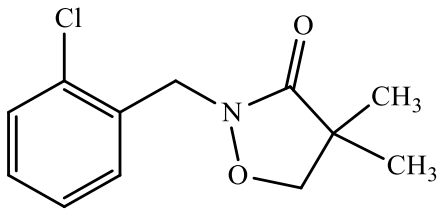
Şekil 2.45. Oktadesil süstitüe poröz silika üzerine immobilize AChE'nin karbaril (karbamat insektisit gibi) inhibitör etkisinin şematik gösterimi

Gözenekli yapıya sahip kalsiyum karbonat mikrokürelerinin oyuklarına yerleştirilen altın nanopartiküllerden oluşan materyali hazırlayan *Chauhan ve diğerleri* bu materyal üzerine AChE enzimini immobilize etmişlerdir. Hazırladıkları bu sensörün, OP insektisitlerinin tayini için kullanılabileceğini ifade etmişlerdir [125]. *Chauhan ve diğerleri* bu sensör ile malation ve klorpirifos (*Bkz.* Şekil 2.42.a) pestisitlerinin tayininin hassas bir şekilde yapılabildiğini, 50 tekrar kullanım sonunda aktifliğinde önemli bir kaybın olmadığını belirtmişlerdir.



Şekil 2.46. $\text{CaCO}_3\text{AChE-AuNP-CaCO}_3$ konjugatının şematik gösterimi

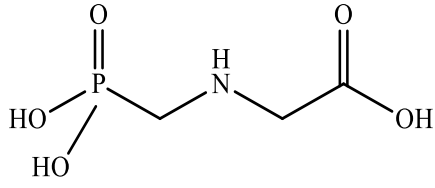
Klomazon herbisiti 1993 yılında Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (USEPA) tarafından tescillendikten sonra, tarım alanında (soya fasulyesi, ayçiçeği, tütün, şeker kamışı gibi) yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. DNA, protein ve enzimleri inhibe eden klomazonun kontrollü kullanımı gereklidir. Bu kontrollerin yapılabilmesi için, AChE enziminin inhibisyonuna dayalı biyomarkerlar geliştirilmiştir. Böyle bir biyomarker hazırlayan *Santi ve diğerleri* herbisite maruz kalmış eritrositlerdeki klomazon miktarını tayin etmek için, dolaylı olarak tiyobarbitürik asit reaktif maddesi (TBARS) miktarının ölçülmesine dayalı yöntemi kullanmışlardır. TBARS miktarının artışı ile eritrositlerin klomazona maruz kalma seviyesi arasında bir ilişkinin olduğunu ifade etmişlerdir [126].



Şekil 2.47. Klomazon'un kimyasal formülü

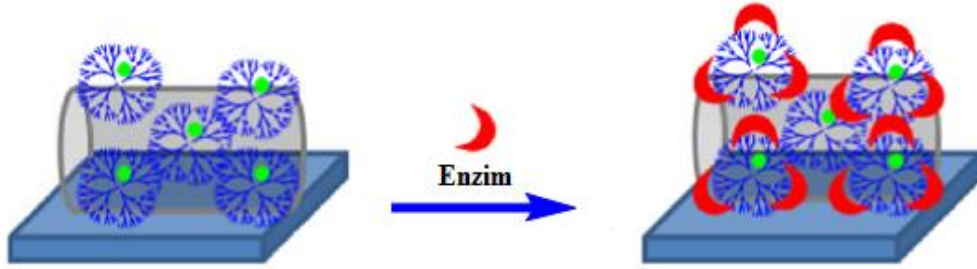
Bu amaçla AChE ve kolinoksidaz enzimlerini kullanarak biyoelektrot hazırlayan *Han ve diğerleri*, enzimleri immobilize ederken destek olarak poli(L-lisin) ve glutaraldehiti kullanmışlardır. Toksik bir pestisit olan diazinonu (DZN) oldukça düşük derişimlerde (0,8 ppm) ve kısa zamanda tayin ettiklerini söylemişlerdir [127].

Gholami-Seyedkolaei, Glifosat (roundap) herbisitinin tayini için AChE enziminin aktifliğindeki değişime dayalı yöntemi kullanmışlar; karaciğer, beyin ve kaslardaki AChE enziminin azalmasını takip etmişlerdir. Beş günün sonunda AChE aktifliğinde belirgin bir azalmanın meydana geldiğini gözlemlemişlerdir [128].



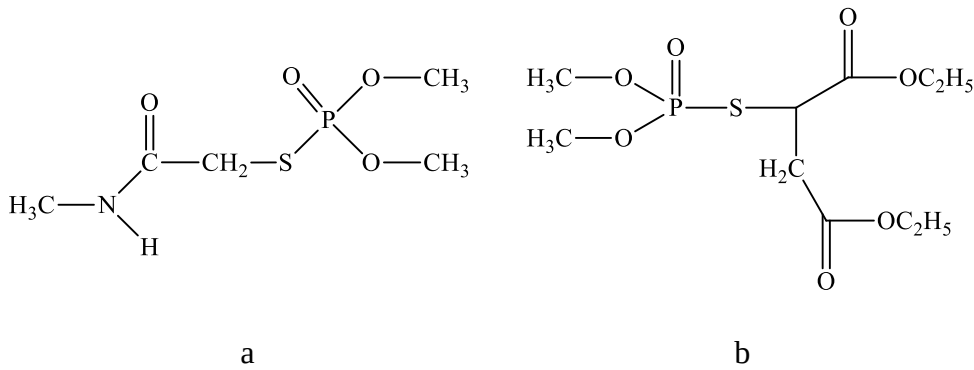
Şekil 2.48. Glifosat (roundap)'ın kimyasal formülü

Karbon nanotüp, platin nanopartikül ve dendrimer içerikli üç farklı elektrokimyasal biyosensörü hazırlamak için *Siriviriyannun* ve *diğerleri* AChE/Kolinoksidaz/Peroksidaz'dan oluşan üçlü enzim kombinasyonundan faydalanmışlardır. Araştırmacılar H_2O_2 'in 0,09V'taki potansiyel ölçümüne dayalı yöntemi uygulayarak, özellikle dendrimer içerikli biyosensörün enzimler için kararlı bir konjugasyon oluşturduğunu ifade etmişlerdir [129].

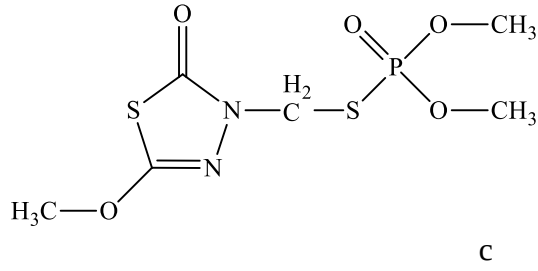


Şekil 2.49. Biyosensör hazırlanmasının şematik gösterimi

Ouji ve *diğerleri* zeytin ağaçlarının korunmasında yaygın olarak kullanılan malation, methidation, dimetoat insektisitlerinin 10^{-9} M derişimindeki tayini için baskılanmış elektrot üzerine AChE enzimini immobilize ederek amperometrik biyosensör hazırlamışlar, mediatör olarak kobalt ftalosiyaniini kullanmışlardır [130].

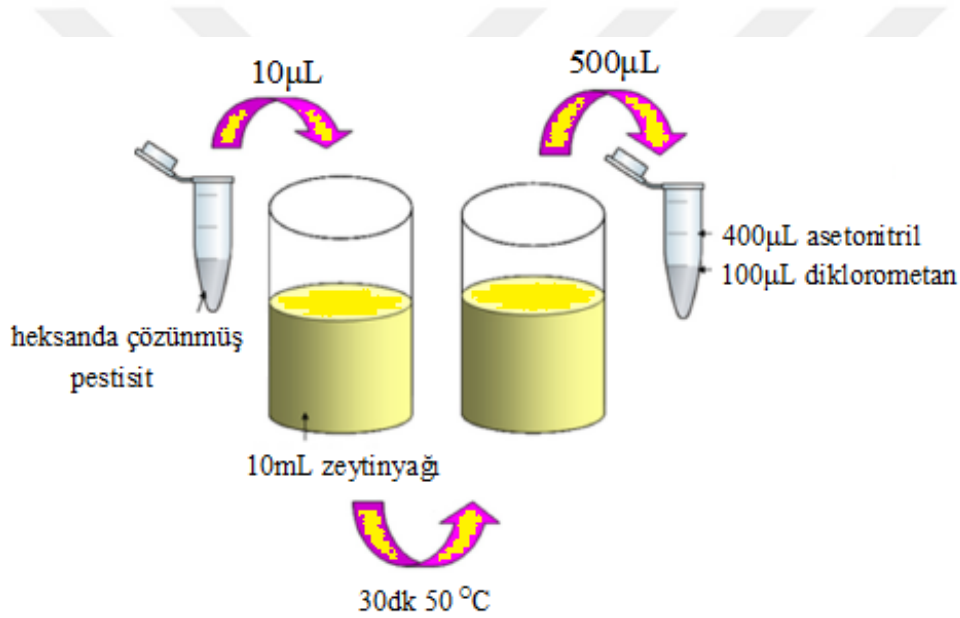


Şekil 2.50. OP insektisitlerin oksitlenmiş formlarının yapısal gösterimleri, a) ometoat, b) malaokson, c) metidation oksit



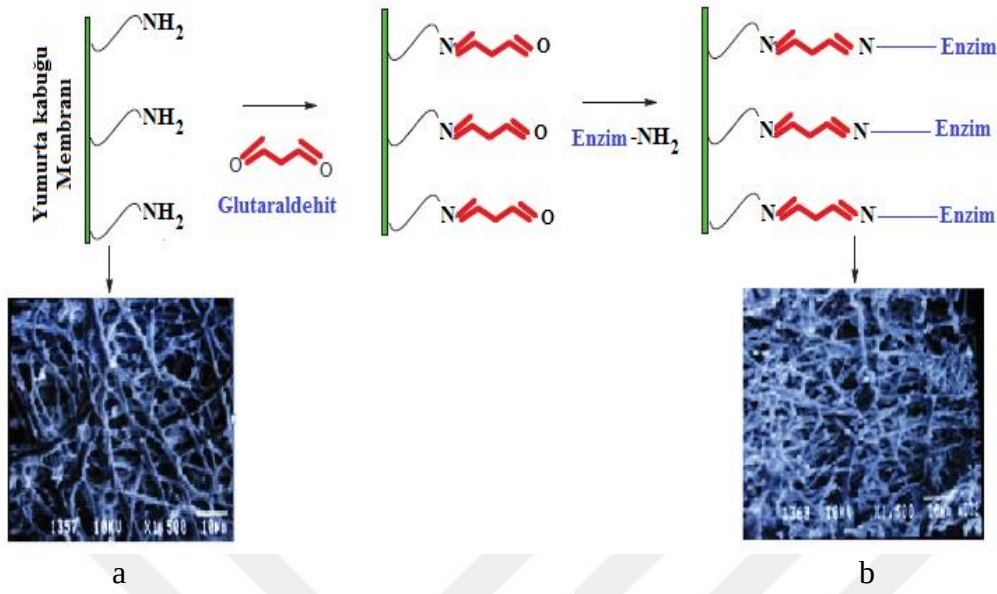
Şekil 2.50. (devam) OP insektisitlerin oksitlenmiş formlarının yapısal gösterimleri;
a) ometoat, b) malaokson, c) metidation oksit

2014 yılında *Oujji ve diğerleri*, zeytinyağı içinde aynı insektisitlerin tayini için kolorimetrik test uygulamışlardır. Asetiltiyokolinin enzimatik hidrolizi sonucunda oluşan ürün olan tyonitrobenzoata ait 412 nm'deki absorbans değişimini izlemişlerdir [131].



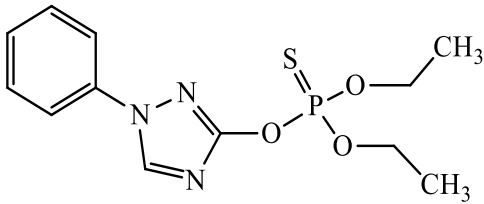
Şekil 2.51. Pestisitın zeytinyağından ayrılması

Yumurta kabuğu membranına (YKM) glutaraldehiti çapraz bağ ile bağladıktan sonra AChE enzimini immobilize eden *Kaur ve diğerleri* malationa duyarlı optik biyosensör hazırlamışlar, bu biyosensörün 0,1-50 µg/mL derişimindeki pestisit tayininde kullanılabileceğini ve tekrarlanabilirliğinin 31 olduğunu belirtmişlerdir [132].



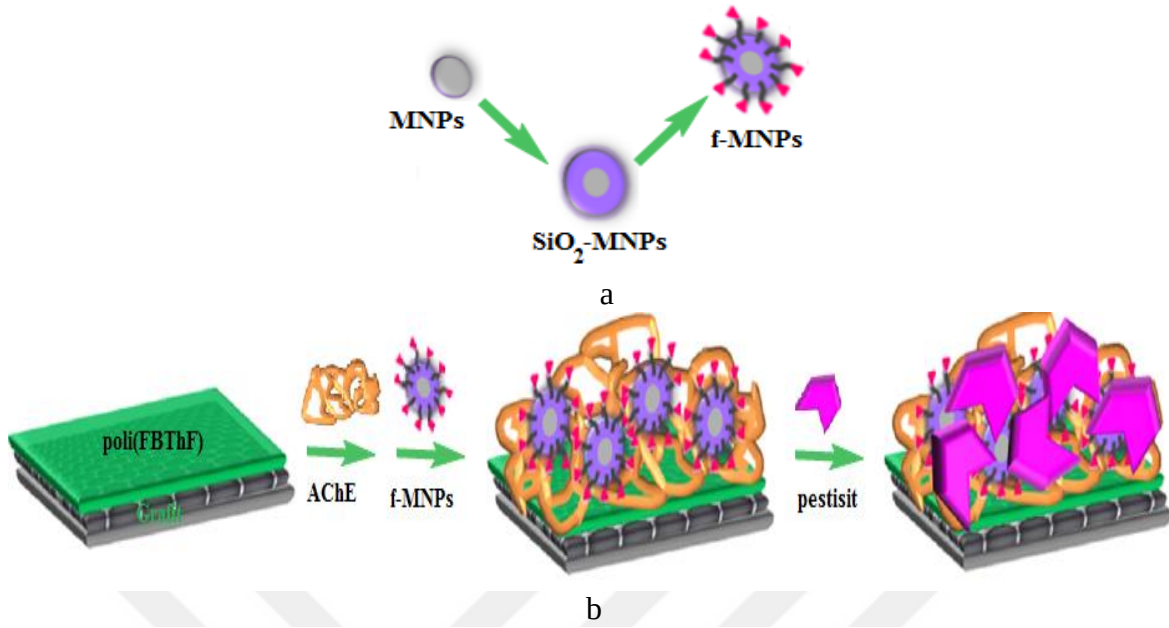
Şekil 2.52. a)YKM, b) AChE immobilize YKM, şekilleri ve SEM görüntüleri

Triazofoslar (Şekil 2.53) kuvvetli zehir etkisine sahip olup, pestisit olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu nedenle kolay ve hızlı triazofos tayinini yapabilmek önemlidir. *Ju ve diğerleri* grafen oksit yüzeyini indirgedikten sonra altın nanoküreler içeren bir nanokompozit hazırlamışlar ve AChE enzimini immobilize etmişlerdir. Bu biyosensörün tayin sınırını 210 ppb olarak belirlemişlerdir [133].



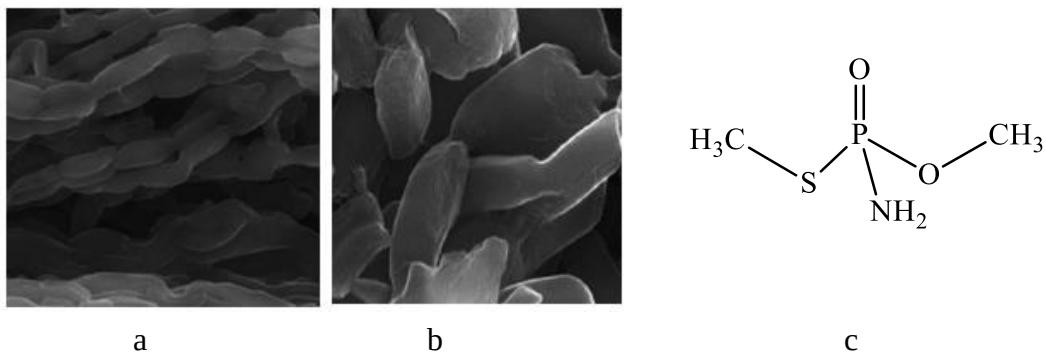
Şekil 2.53. Triazofos'un kimyasal formülü

Pestisitlerin tayini için geleneksel yöntemlerden vazgeçilmesi gerektiğini söyleyen *Cancar ve diğerleri* immobilize edilmiş AChE tabanlı elektrokimyasal biyosensörü hazırlamışlardır. 4,7-di(furan-2-il)benzo[c][1,2,5]tiadiazol (FBThF) monomerini, elektrokimyasal olarak elektrot yüzeyinde polimerleştiren araştırmacılar, karboksil uçlu nanopartiküllerle, AChE içeren hibriti immobilize etmişlerdir. Hazırladıkları bu sensör ile pestisitlerden paraokson ve triklorfon tayini yapılabileceğini ifade etmişlerdir [134].



Şekil 2.54. a) Magnetik küre eldesi, b) paraokson ve triklorfon'a duyarlı sensör'ün hazırlanmasında takip edilen yol

Baskılanmış (screen-printed) karbon elektrot yüzeyini hazırlayan Zhang ve diğerleri daha sonra bu yüzeyi mezogözenekli karbon(OMC)-Çitosan(CS) ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$ ile modifiye ederek biyosensör hazırlamışlardır. Araştırmacılar lahanı ve marul için kullanılan metamidofos (Şekil 2.55.c) pestisitinin tayin edilebilirliği ile ilgili yöntem geliştirmişlerdir [135].



Şekil 2.55. a) OMC-CS'in 1µm, b) 500 nm büyüklükteki SEM görüntüsü, c) metamidofos'un açık yapısı



3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

^1H -NMR spektrumları; Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi Analiz Laboratuvarında, 300 MHz'lik Bruker Ultrashield AC300 Plus sıvı NMR Ultra-Shield ile 100 MHz'de CD_3OD kullanılarak alındı.

FT-IR spektrumları Üniversitemizdeki Fotonik Uygulama ve Araştırma Merkezinde 4000-400 cm^{-1} aralığında alındı. UV-GB spektrumları UV-1800 ENG240V, SOFT model spektrofotometre ile 700-180 nm aralığında DMSO'da dendronlar için 10^{-4} M'lık çözeltileri hazırlanarak alındı. LC-MS Spektrumları Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarında alındı.

MALDI-TOF MS spektrumları; Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi Analiz Laboratuvarında, Bruker Microflex LT cihazı kullanılarak alındı. Numunelerin termal bozunmaları 25°C - 900°C sıcaklık aralığında $10^\circ\text{C}/\text{dakika}$ ısıtma hızında ve $\text{N}_{2(g)}$ atmosferinde Perkin Elmer Pyris 1 Termogravimetrik Analiz (TGA) cihazı ile ODTÜ Merkez Laboratuvarlarında incelendi.

Element analizleri LECO, CHNS-932 Elementel Analiz Cihazı ile ODTÜ Merkez Laboratuvar, AR-GE ve Ölçme merkezinde yapıldı. Metal iyonu içeren dendronların metal yüzdelere ODTÜ Merkez Laboratuvarında Perkin Elmer Analyst 400 marka Atomik Absorpsiyon Spektrofotometrisi Cihazı ile yapıldı. Dendritik yapıların erime noktaları, Barnstead-Electrothermal-9200 model erime noktası cihazı ile belirlendi.

Metal iyonu içeren dendronların magnetik duyarlılık ölçümleri bölümümüzdeki Sherwood Scientific MKI model Gouy terazisi ile yapıldı. Standart olarak $[\text{Hg}(\text{NCS})_4]$ kullanıldı. Havanda ince toz haline getirilen numuneleri, boyu 7cm, çapı 3mm olan pyreks camdan yapılmış duyarlılık tüpü içerisine, numune yüksekliği 1,5 cm'den az olmamak kaydıyla konuldu. Sonra tüp manyetik alandan uzak tutulan Gouy terazisinin ölçüm haznesine yerleştirildi ve değer sabitlenene dek beklendi, ölçümler kaydedildi.

İletkenlik ölçümleri inoLab Cond 730 iletkenlik cihazı ile $26 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ 'de DMSO içerisinde 1×10^{-3} M'lık çözeltileri hazırlanarak yapıldı. Orion 420 A model pH metre cihazı, tampon çözeltilerin pH'sını ayarlama, ST 402 NÜVE marka sıcaklık kontrollü çalkalamalı su banyosu ise serbest ve immobilize enzimlerin optimum şartları belirlenirken kullanıldı.

3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Enzimler

Deneyisel çalışmalar sırasında kullanılan kimyasal maddelerin, enzimlerin, substratların, pestisitlerin kodları ve firma bilgilerine aşağıda yer verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kimyasal listesi

Kodu	Kimyasal Madde	Firma
M2659	Melamin, 99% saflıkta	Aldrich
T220-7	Tereftaldialdehit, 99% saflıkta	Aldrich
S4777278 042	Ferrosenkarboksialdehit, 98% saflıkta	Merck
520632	PtCl ₂ , $\geq 99,9\%$ saflıkta	Aldrich
205885	PdCl ₂ , 99,9% saflıkta	Aldrich
A71301	2-Aminofenol, 99% saflıkta	Aldrich
303585	2-Amino-5-nitrofenol	Aldrich
144916	2-Amino-5-metilfenol, 98% saflıkta	Aldrich
K40013743929	Dimetilsülfoksit $\geq 99,8\%$ saflıkta	Merck
227056	N,N-Dimetilformamid, susuz 99,8% saflıkta	Sigma-Aldrich
322415	Metanol, susuz 99,8% saflıkta	Sigma-Aldrich
32205	Etanol, absolute $\geq 99,8\%$ saflıkta	Sigma-Aldrich
244511	Toluen, susuz 99,8% saflıkta	Sigma-Aldrich
439126	Aseton, 99,8% saflıkta	Sigma-Aldrich
S8282	Sodyum DihidrojenFosfat(NaH ₂ PO ₄ ,120g/mol)	Sigma-Aldrich
452289	Fosforik Asit (H ₃ PO ₄ 106,09 g/mol)	Aldrich
45726	Asetik Asit (CH ₃ COOH)	Sigma
W302406	Sodyum Asetat (CH ₃ COONa, 82,02 g/mol)	Aldrich
NIST2186II	Disodyum hidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄ ,142 g/mol)	Sigma-Aldrich
71997	Boraks/ (Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O, 201,24 g/mol)	Sigma-Aldrich

Çizelge 3.1. (devam) Kimyasal listesi

71687	Sodyum hidroksit (NaOH,40 g/mol)	Sigma-Aldrich
33528	4-Aminoantipirin (4-AAP) (203,24 g/mol)	Sigma-Aldrich
P5566	Fenol (94,11 g/mol)	Sigma-Aldrich
D8130	5,5 ¹ -ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB)	Sigma
S5761	Sodyumbikarbonat	Sigma
69775	Laktik asit	Fluka
251275	Sitrik asit	Sigma-Aldrich
U4883	Üre	Sigma
C5670	Kalsiyum klorür	Sigma
S7653	Sodyum klorür	Sigma-Aldrich
M2643	Magnezyum sülfat	Sigma
204447	Sodyum sülfat (Na ₂ SO ₄) , ≥ 99,9 % saflıkta	Aldrich
PHR1330	Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich
P5504	Potasyum hidrojen fosfat (K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O)	Sigma-Aldrich
A9434	Amonyum klorür	Sigma

Çizelge 3.2. Enzim, substrat ve pestisitlerin listesi

<u>Kodu</u>	<u>Enzimler/ Substratlar/ Pestisitler</u>	<u>Firma</u>
49180	Glukoz Oksidaz(<i>Aspergillus niger</i> 'dan izole) (192 U/mg)	Sigma
G8270	Glukoz (180,16 g/mol)	Sigma
P8375	Peroksidaz Enzimi(yaban turbundan izole) (≥250 U/mg) (HRP)	Sigma
C3389	AChE (elektrikli yılan balığından izole) (518 units/mg, 10KU)	Sigma
A5626	Asetil tiyokolin iyodür, ≥98 % saflıkta	Sigma
32055	Karbaril (1-naftil-N-metilkarbamat)	Sigma-Aldrich
G005510	(O,O-dimetil-S-ftalimidometil fosforoditiyoat)	Supelco

3.3. Hazırlanan Çözeltiler

GOx ve AChE enzimlerinin yeni sentezlenen dendronlara immobilizasyonu, immobilize desteklerin optimizasyon çalışmaları ve immobilize destekler ile yapılan uygulama çalışmaları sırasında kullanılan çözeltilerin nasıl hazırlandıklarına 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 dihidrojenfosfat) 250 mL su içerisinde çözündü. Üzerine derişik 85%'lik H_3PO_4 çözeltisinden pH 3 olana kadar damla damla eklendi.

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

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 eklendi.

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 eklendi.

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 eklendi.

Stok Glukoz çözeltisi (50 mM-0,5 mM); 50 mM stok glukoz çözeltisi hazırlamak için; 0,45 gram glukoz tartılıp çalışılan pH tampon ile 50 mL ye tamamlandı. 20 mM, 18 mM, 16 mM, 14 mM, 12 mM, 10 mM, 8 mM, 6 mM, 4 mM, 2 mM, 1 mM ve 0,5 mM glukoz çözeltileri hazırlanırken 50 mM stok glukoz çözeltisinden seyreltilerek hazırlandı.

β -Glukoz Oksidaz çözeltisi; 0,0013 g serbest enzim saf suda çözölüp 250 mL'ye tamamlandı.

Yapay idrar çözeltisi; 1,1 mM laktik asit, 2,0 mM sitrik asit, 25 mM sodyum bikarbonat, 170 mM üre, 2,5 mM kalsiyum klorür, 90 mM sodyum klorür, 2,0 mM magnezyum sülfat,

10 mM sodyum sülfat, 7,0 mM potasyum dihidrojen fosfat, 7,0 mM potasyum hidrojen fosfat ve 25 mM amonyum klorür çözeltileri karıştırıldı. Hazırlanan yapay idrar çözeltisinin pH'sı 0,1 M'lık HCl çözeltisi ilavesi ile pH 6'ya ayarlandı [136].

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

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 tamamlandı.

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 çözöndü, üzerine 15 mg sodyum bikarbonat ilave edildi.

İmıdan Fosmet (O,O-dimetilS-ftalimidometil fosforoditiyoat)çözeltisi; $1,37 \times 10^{-6}$ M'lık (0,5 ppm) fosmet çözeltisini hazırlamak için; 0,5 mg fosmet tartılarak 1L'lik saf su: asetonitril (4:1) karışımında çözöndü. (Bu çözeltinin derişimi Türk Gıda Kodeksinde elma ve süt ürünleri için belirlenmiş maksimum değeri (MRL) referans alınarak belirlenmiştir.)

Karbaril (1-naftil-N-metilkarbamat) çözeltisi; $1,49 \times 10^{-5}$ M'lık (3 ppm) karbaril çözeltisini hazırlamak için; 3 mg tartılarak 1 L'lik saf su: asetonitril (4:1) karışımında çözöndü.

Florokloridon (3-kloro-4-(klorometil)-1-[3-(triflorometil)fenil]-2-pirolidinon) çözeltisi; $6,41 \times 10^{-8}$ M'lık (0,02 ppm) flurokloridon çözeltisini hazırlamak için; 0,02 mg flurokloridon tartılarak 1 L'lik saf su:asetonitril (4:1) karışımında çözöndü. (Bu çözeltinin derişimi Türk Gıda Kodeksinde havuç ve patates için belirlenmiş maksimum değeri (MRL) referans alınarak belirlenmiştir.)

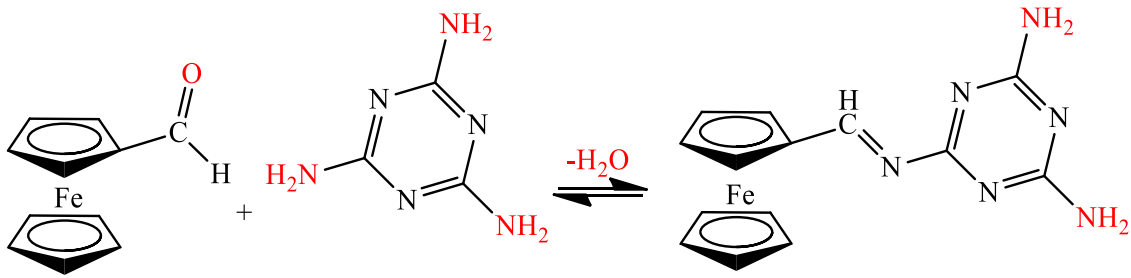


4. DENEYSEL YÖNTEM

Bu çalışmada, önce ferrosen çekirdekli birinci ve ikinci jenerasyon dendronlar sentezlendi. Sonra ikinci jenerasyon dendrona üç farklı amino fenol türevi (X: -H, -NO₂, -CH₃) katılarak “kalıp” yöntemi ile Pd(II) ve Pt(II) metalleri içeren genişletilmiş ikinci jenerasyon dendronlar sentezlendi.

4.1. Birinci Jenerasyon Dendronun (1J) Sentezi

Birinci jenerasyon dendron (çekirdek) 80°C’de geri soğutucu altında sentezlendi. Geri soğutucuya bağlanmış iki boyunlu cam balona 20 mL DMF’de çözünmüş 1×10^{-3} mol (0,214 g) ferrosenaldehit konuldu. Geri soğutucu altında karıştırma işlemi yapılırken damlatma hunisi içerisindeki 1×10^{-3} mol (0,126 g) DMF’de çözünmüş melamin damla damla balondaki aldehit çözeltisi üzerine ilave edildi. Amin çözeltisi eklendikten sonra 6 saat geri soğutucu altında karıştırma ve ısıtma işlemine devam edildi. Reaksiyonun sonlanması TLC ile kontrol edildi. Altı saatin sonunda temiz bir behere alınan karışım oda sıcaklığına geldikten sonra, aseton eklenerek çöktürüldü, süzüldü [16]. 1J sembolü çökelek (Şekil 4.1) 1:1 metanol:aseton karışımı ile 3 defa yıkandı ve daha sonra 80°C’deki etüvde 1 gün boyunca kurutuldu (Verim 83%).

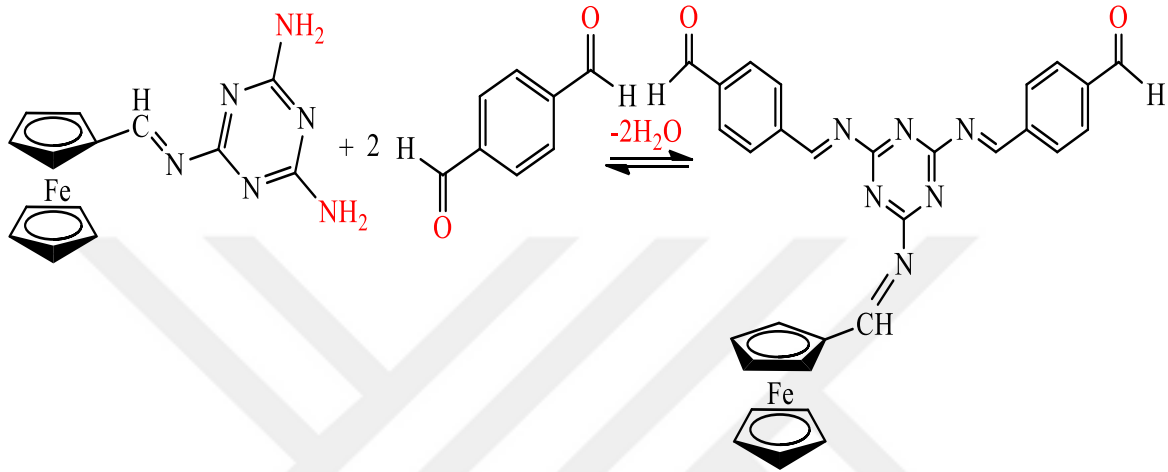


Şekil 4.1. Birinci jenerasyon dendronun (1J) sentezi için ön görülen tepkime

4.2. İkinci Jenerasyon Dendronun (2J) Sentezi

İkinci jenerasyon dendron (2J) 80°C’de geri soğutucu altında sentezlendi. Geri soğutucuya bağlanmış iki boyunlu cam balonda 2×10^{-3} mol (0,268 g) tereftaldialdehiti DMF’de çözdükten sonra, 30 mL DMF’de çözünmüş 1×10^{-3} mol (0,322 g) 1J çözeltisi damlatma hunisi içerisine alınarak reaksiyon ortamına damla damla ilave edildi. 1J çözeltisi

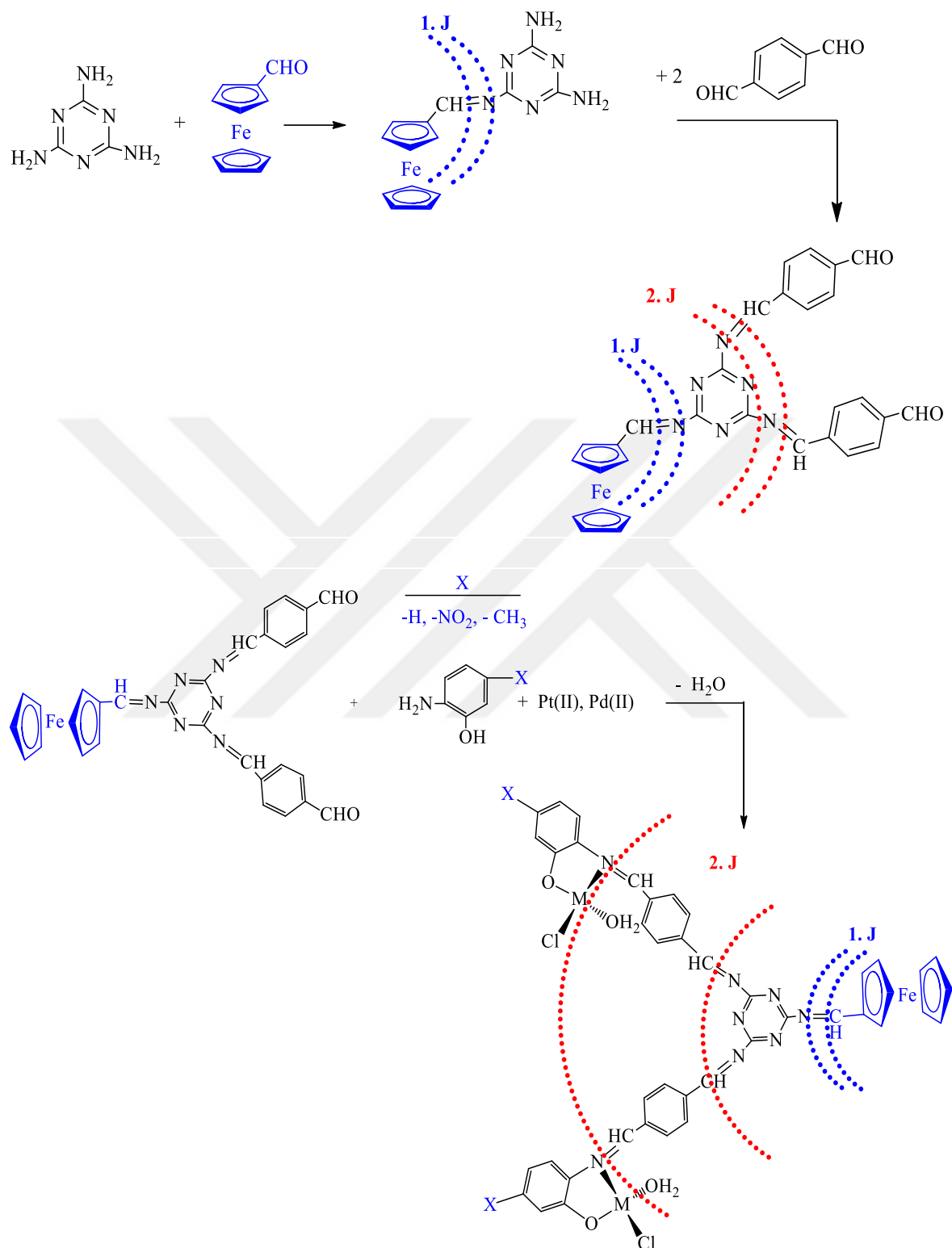
eklendikten sonra 6 saat geri soğutucu altında karıştırma ve ısıtma işlemine devam edildi. Reaksiyonun sonlanması TLC ile kontrol edildi. Altı saatin sonunda temiz bir behere alınan karışım oda sıcaklığına geldikten sonra, aseton eklenerek çöktürüldü, süzüldü. 2J sembolü çökelek (Şekil 4.2) 1:1 metanol:aseton karışımı ile 3 defa yıkanıp süzildükten sonra 2 gün boyunca 80°C’de etüvde kurutuldu (Verim 55%).



Şekil 4.2. İkinci jenerasyon dendronun (2J) sentezi için ön görülen tepkime

4.3. Metal ile Koordine Olan Dendronların Sentezi: [(2J-XM); X: -H, -NO₂, -CH₃; M: Pd(II), Pt(II)]

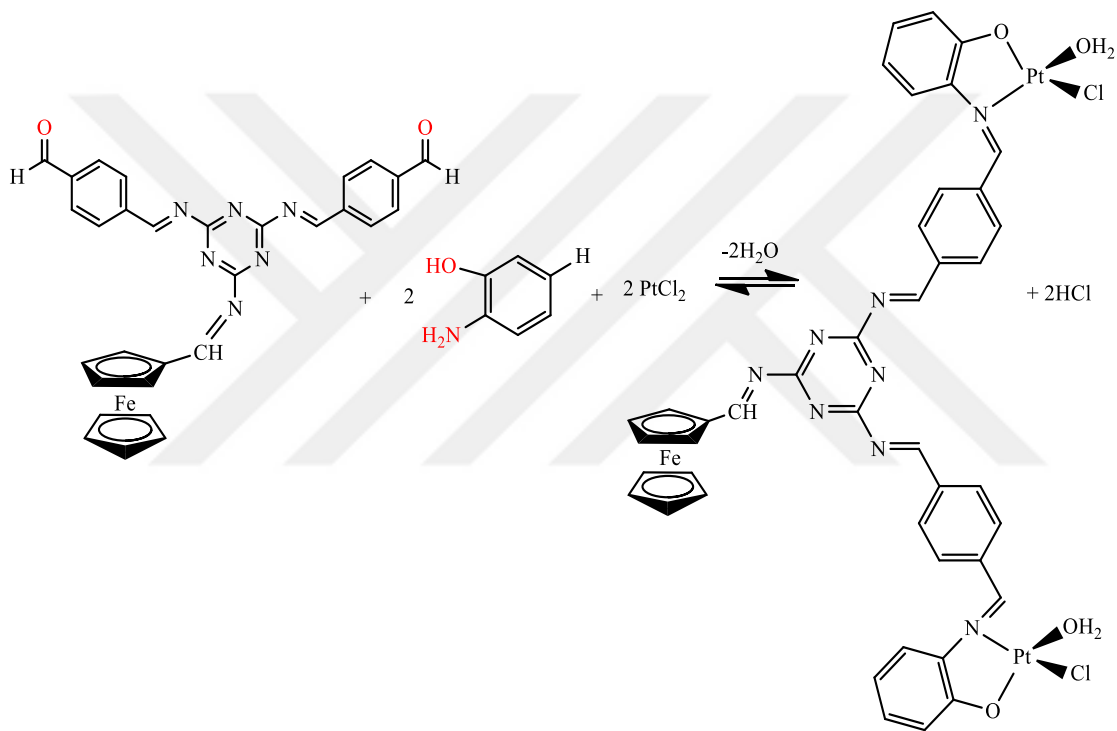
Geri soğutucuya bağlanmış cam balona 20 mL DMF:C₂H₅OH (1:5)’de çözünmüş 2J dendronu konuldu. Geri soğutucu altında karıştırma işlemi yapılırken aminofenol türevleri oda sıcaklığında ilave edildi. Çözelti 24 saat boyunca magnetik karıştırıcıda 85°C’de karıştırıldı. Daha sonra reaksiyon ortamına 10 mL DMF içerisinde çözünmüş metal tuzları (PdCl₂ ve PtCl₂) ilave edilerek 24 saat boyunca magnetik karıştırıcıda 85°C’de karıştırıldı. Reaksiyonun sonlanması TLC ile kontrol edildi. 24 saatin sonunda temiz bir behere alınan karışım oda sıcaklığına geldikten sonra, toluen eklenerek çöktürüldü. Çökelek 1:1 metanol:toluen karışımı ile 3 defa yıkandı. Daha sonra 80°C’de, 1 gün boyunca etüvde kurutuldu.



Şekil 4.3. İkinci jenerasyon dendronun büyütülmesi

4.3.1. 2J-HPt dendronunun sentezi

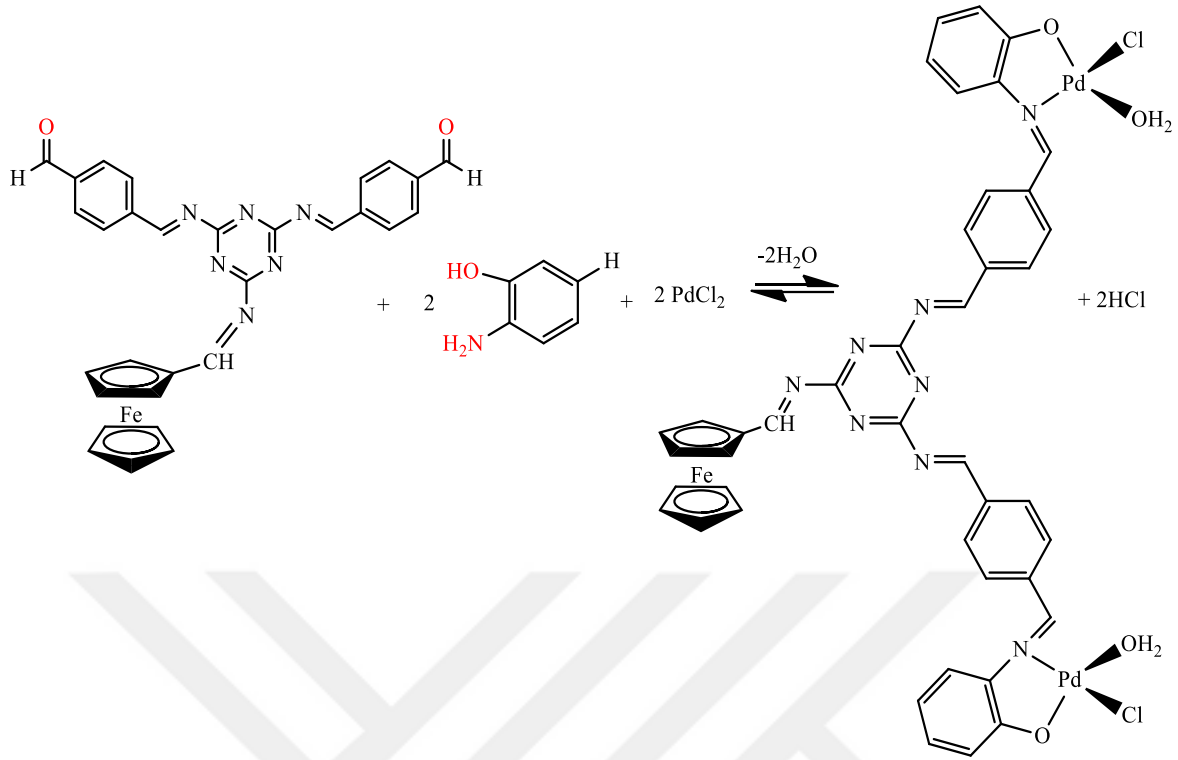
1×10^{-3} mol (0,554 g) ikinci jenerasyon (2J) dendron geri soğutucuya bağlanmış iki boyunlu cam balona alınarak 20 mL DMF:C₂H₅OH (1:5) içerisinde çözündü. 2×10^{-3} mol (0,218 g) 2-Aminofenol'ün 5 mL DMF'de çözünmüş çözeltisi, damlatma hunisi içerisinde konularak çözelti ortamına oda sıcaklığında yavaş yavaş ilave edildi. Daha sonra reaksiyon ortamına 2×10^{-3} mol (0,532 g) PtCl₂ konularak Bölüm 4.3.'de belirtilen yöntemle sentezlendi (Verim 75%).



Şekil 4.4. 2J-HPt dendronunun sentezi için öngörülen tepkime

4.3.2. 2J-HPd dendronunun sentezi

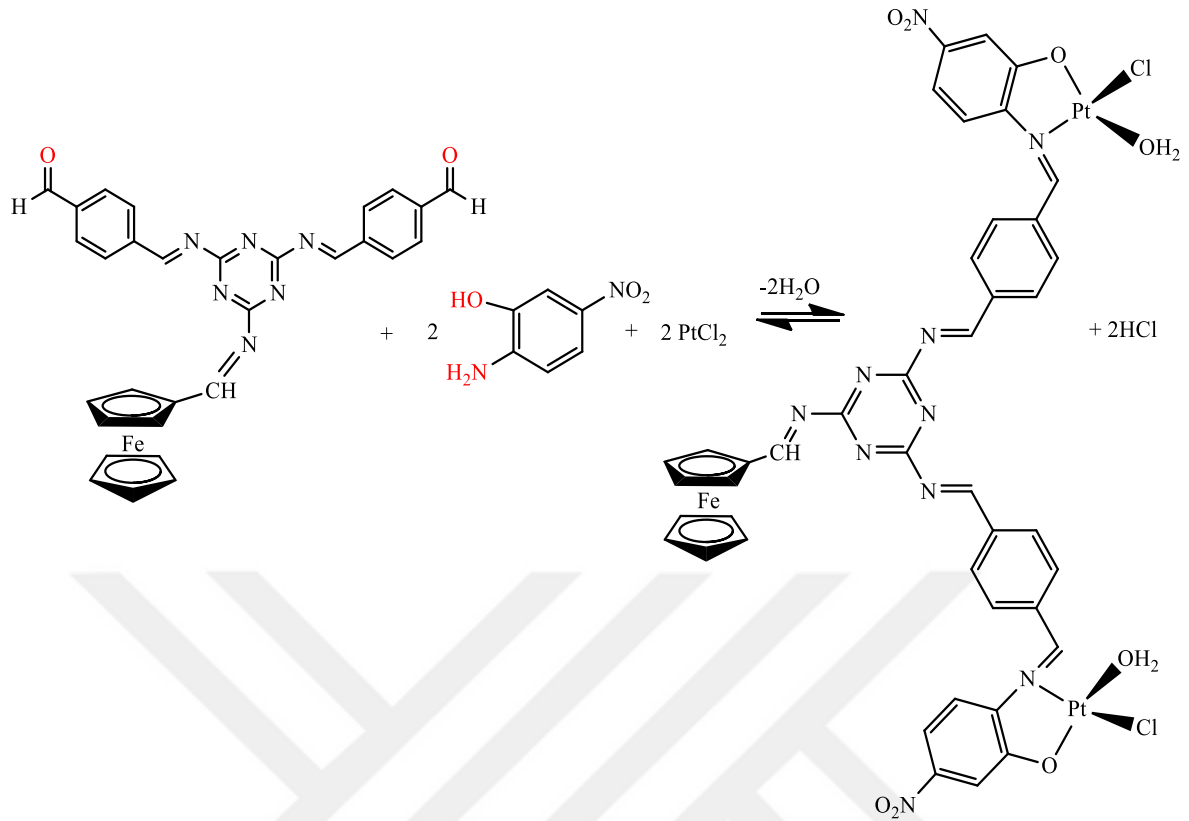
1×10^{-3} mol (0,554 g) ikinci jenerasyon (2J) dendron geri soğutucuya bağlanmış iki boyunlu cam balona alınarak 20 mL DMF:C₂H₅OH (1:5) içerisinde çözündü. 2×10^{-3} mol (0,218 g) 2-Aminofenol'ün 5 mL DMF'de çözünmüş çözeltisi, damlatma hunisi içerisinde konularak çözelti ortamına oda sıcaklığında yavaş yavaş ilave edildi. Daha sonra reaksiyon ortamına 2×10^{-3} mol (0,355 g) PdCl₂ konularak Bölüm 4.3.'de belirtilen yöntemle sentezlendi (Verim 69%).



Şekil 4.5. 2J-HPd dendronunun sentezi için öngörülen tepkime

4.3.3. 2J-NO₂Pt dendronunun sentezi

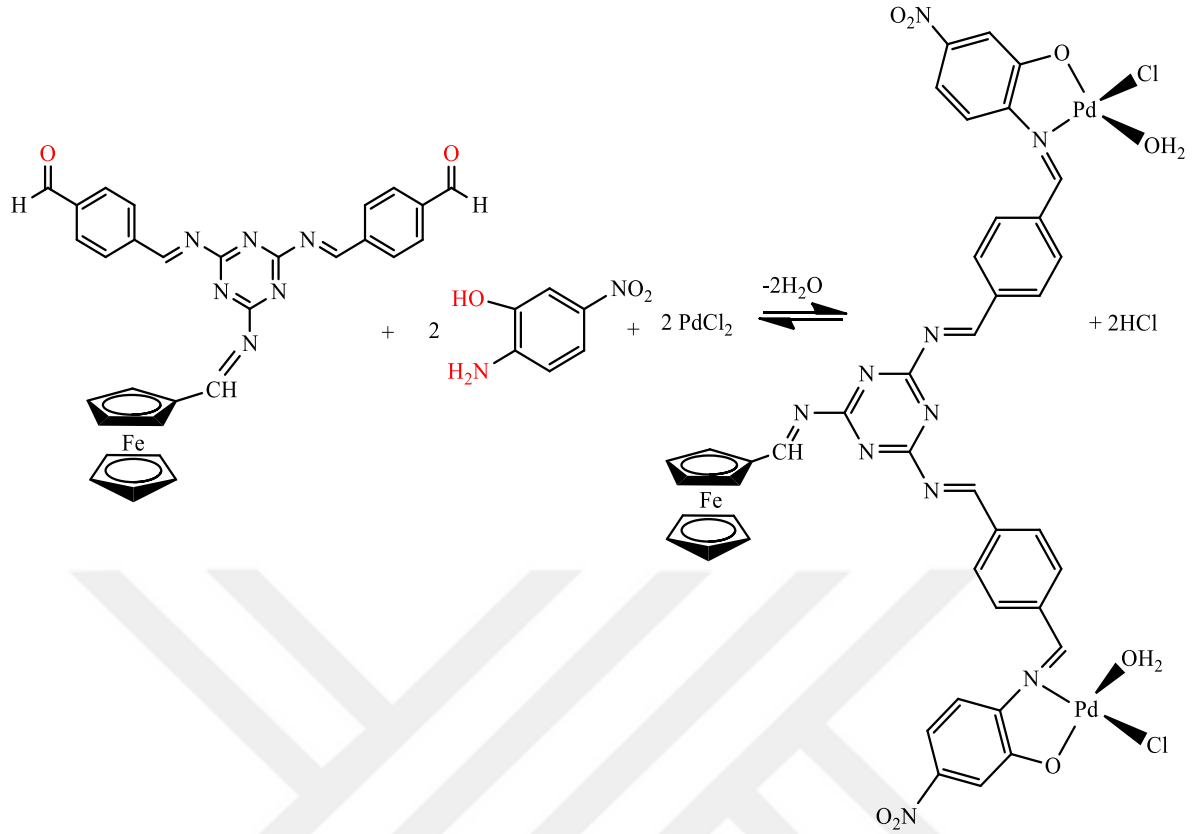
1×10^{-3} mol (0,554 g) ikinci jenerasyon (2J) dendron geri soğutucuya bağlanmış iki boyunlu cam balona alınarak 20 mL DMF:C₂H₅OH (1:5) içerisinde çözündü. 2×10^{-3} mol (0,308 g) 2-Amino-5-nitrofenol'ün 5 mL DMF'de çözünmüş çözeltisi, damlatma hunisi içerisinde konularak çözelti ortamına oda sıcaklığında yavaş yavaş ilave edildi. Daha sonra reaksiyon ortamına 2×10^{-3} mol (0,532 g) PtCl₂ konularak Bölüm 4.3.'de belirtilen yöntemle göre sentezlendi (Verim 71%).



Şekil 4.6. 2J-NO₂Pt dendronunun sentezi için öngörülen tepkime

4.3.4. 2J-NO₂Pd dendronunun sentezi

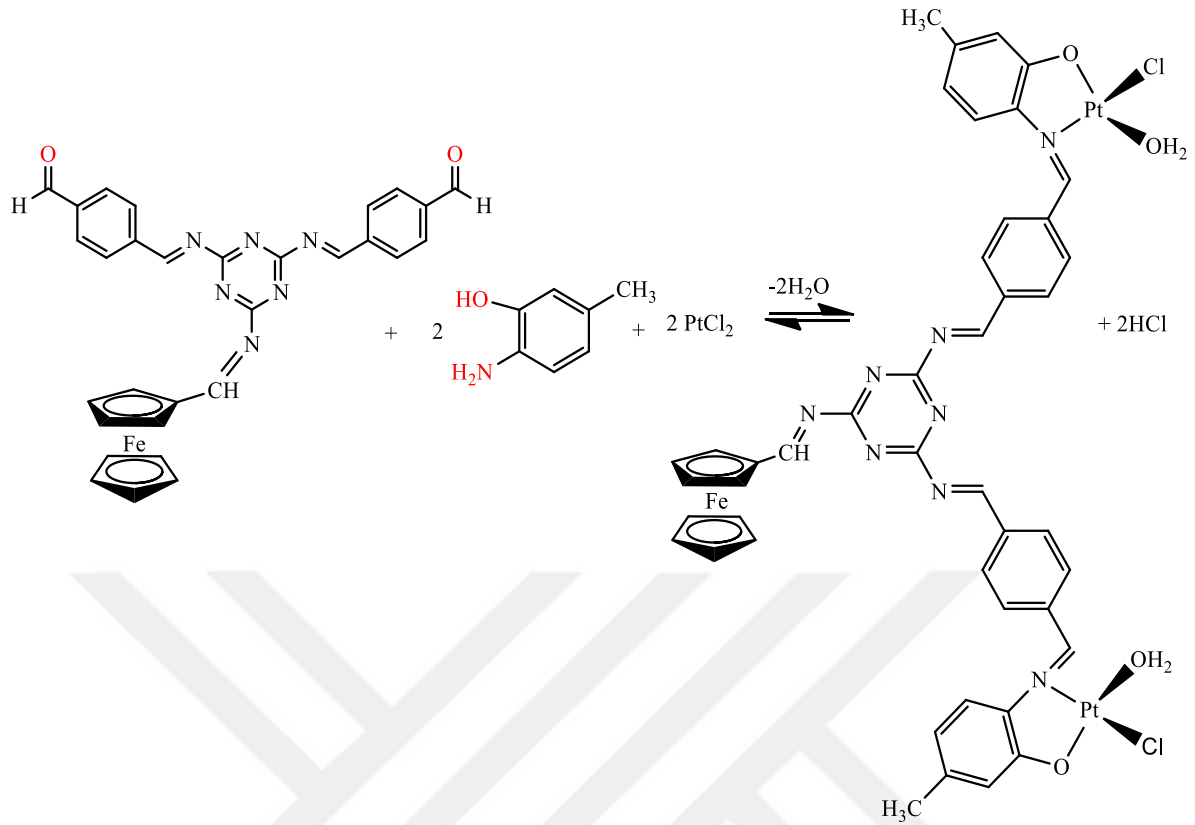
1x10⁻³ mol (0,554 g) ikinci jenerasyon (2J) dendron geri soğutucuya bağlanmış iki boyunlu cam balona alınarak 20 mL DMF:C₂H₅OH (1:5) içerisinde çözündü. 2x10⁻³ mol (0,308 g) 2-Amino-5-nitrofenol'ün 5 mL DMF'de çözünmüş çözeltisi, damlatma hunisi içerisine konularak çözelti ortamına oda sıcaklığında yavaş yavaş ilave edildi Daha sonra reaksiyon ortamına 2x10⁻³ mol (0,355 g) PdCl₂ konularak Bölüm 4.3.'de belirtilen yöntemle göre sentezlendi (Verim 67%).



Şekil 4.7. 2J-NO₂Pd dendronunun sentezi için öngörülen tepkime

4.3.5. 2J-CH₃Pt dendronunun sentezi

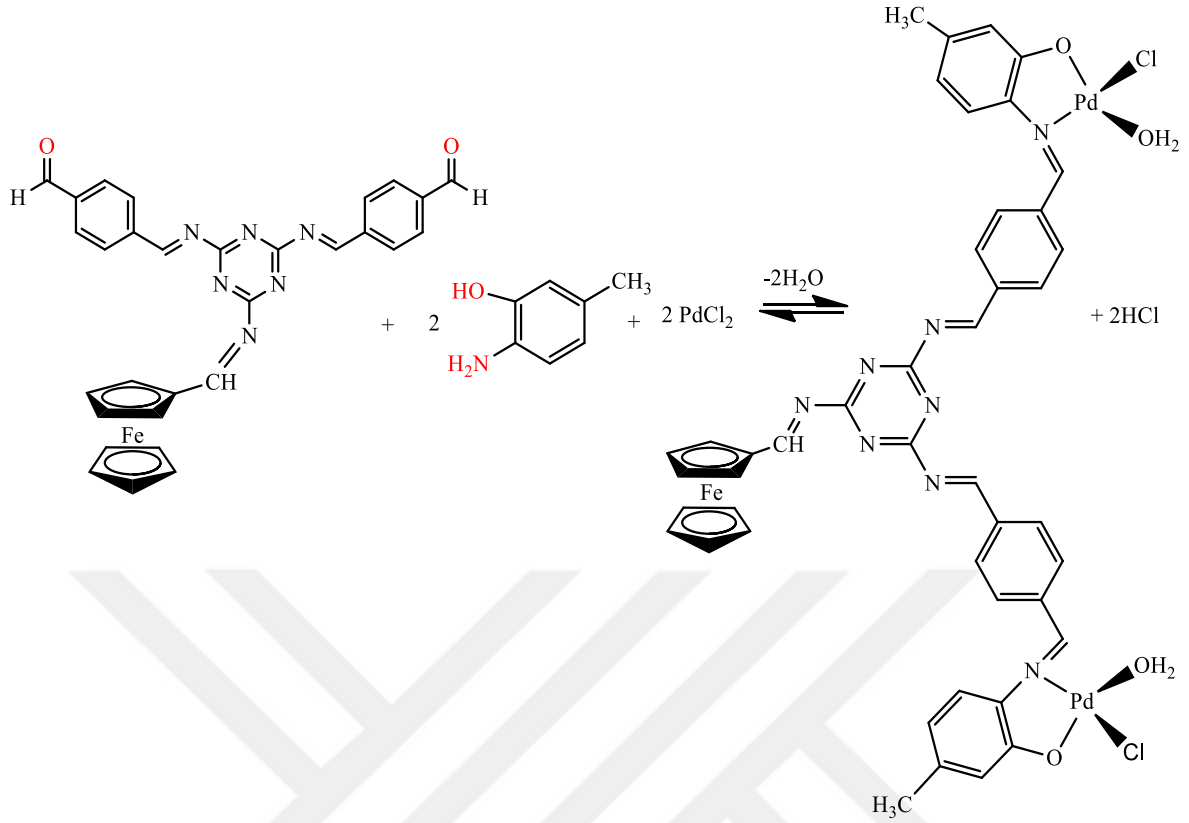
1×10^{-3} mol (0,554 g) ikinci jenerasyon (2J) dendron geri soğutucuya bağlanmış iki boyunlu cam balona alınarak 20 mL DMF:C₂H₅OH (1:5) içerisinde çözündü. 2×10^{-3} mol (0,246 g) 2-Amino-5-metilfenol'ün 5 mL DMF'de çözünmüş çözeltisi, damlatma hunisi içerisinde konularak çözelti ortamına oda sıcaklığında yavaş yavaş ilave edildi Daha sonra reaksiyon ortamına 2×10^{-3} mol (0,532 g) PtCl₂ konularak Bölüm 4.3'de belirtilen yöntemle göre sentezlendi (Verim 72%).



Şekil 4.8. 2J-CH₃Pt dendronunun sentezi için öngörülen tepkime

4.3.6. 2J-CH₃Pd dendronunun sentezi

1x10⁻³ mol (0,554 g) ikinci jenerasyon (2J) dendron geri soğutucuya bağlanmış iki boyunlu cam balona alınarak 20 mL DMF:C₂H₅OH (1:5) içerisinde çözündü. 2x10⁻³ mol (0,246 g) 2-Amino- 5-metilfenol'ün 5 mL DMF'de çözünmüş çözeltisi, damlatma hunisi içerisine konularak çözelti ortamına oda sıcaklığında yavaş yavaş ilave edildi Daha sonra reaksiyon ortamına 2x10⁻³ mol (0,355 g) PdCl₂ konularak Bölüm 4.3'de belirtilen yöntemle göre sentezlendi (Verim 70%).



Şekil 4.9. 2J-CH₃Pd dendronunun sentezi için öngörülen tepkime

4.4. Dendronların Element Analizi ve Fiziksel Özelliklerinin Belirlenmesi

Dendronların C, H, N, metal yüzdeleri, erime noktaları ve bazı fiziksel özellikleri Çizelge 4.1’de verildi. Dendronların DMSO, asetonitril gibi polar çözücülerde çözünürken, CCl₄ ve benzen gibi apolar çözücülerde çözünmediği görüldü.

Metal içermeyen dendronların erime noktaları kıyaslandığında, jenerasyon sayısının artmasıyla erime noktalarında düşüş gözlenirken çözünürlüklerinde artış gözlemlendi. Metal içeren dendronların erime noktaları kıyaslandığında ise, Pt(II) iyonu içeren dendronların erime noktalarının Pd(II) iyonu içerenlerden daha düşük olduğu, çözünürlüklerinin ise daha iyi olduğu belirlendi.

Erime noktalarını dendronların içerdiği farklı fonksiyonel gruplar bakımından incelediğimizde ise -NO₂ süstitüe grupları içeren dendronların -CH₃ süstitüe grupları içeren dendronlara kıyasla daha yüksek olduğu görüldü. Yani molekül ağırlığı arttıkça erime noktasında artış meydana geldi [137].

4.5. Dendronların Magnetik Duyarlık Ölçümleri

Pd^{+2} ve Pt^{+2} iyonları içeren dendronların magnetik duyarlılıkları Bölüm 3.1.'de anlatıldığı şekilde ölçüldü ve sonuçları Çizelge 4.1.'de verildi. Ölçümler sonunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde Pd^{+2} ve Pt^{+2} iyonu içeren tüm dendronların diyamanyetik özellikte oldukları belirlendi.



Çizelge 4.1. Sentezlenen dendronların element analiz sonuçları ve fiziksel özellikleri

Dendron	Kapalı Formül Mol kütlesi (g.mol ⁻¹)	İletkenlik Ölçüm Değerleri (μ S/cm)	E.N.	Renk μ_{eff} (BM)	Elemental Analiz Bulunan (Hesaplanan)%					
					C	H	N	Pt	Pd	Fe
1J	C ₁₄ H ₁₄ N ₆ Fe (322,06)	1,01	160	Açık kahve -	52,13 (52,16)	5,03 (4,35)	26,30 (26,08)	- -	- -	16,79 (17,23)
2J	C ₃₀ H ₂₄ N ₆ O ₂ Fe (556,39)	1,08	320*	Siyah -	62,57 (64,70)	3,93 (4,31)	14,17 (15,10)	- -	- -	9,81 (10,03)
2J-HPt	C ₄₂ H ₃₆ N ₈ O ₄ FeCl ₂ Pt ₂ (1233,71)	9,47	235*	Koyu kahve D	40,39 (40,85)	3,47 (2,92)	9,89 (9,08)	30,93 (31,63)	- -	4,54 (4,53)
2J-NO ₂ Pt	C ₄₂ H ₃₄ N ₁₀ O ₈ FeCl ₂ Pt ₂ (1323,71)	12,89	196*	Ceviz D	37,60 (38,07)	3,12 2,57	10,77 (10,58)	28,80 (29,48)	- -	4,56 (4,22)
2J-CH ₃ Pt	C ₄₄ H ₄₀ N ₈ O ₄ FeCl ₂ Pt ₂ (1261,77)	15,04	>187*	Acı kahve D	41,11 (41,85)	3,63 (3,17)	9,07 (8,88)	29,90 (30,92)	- -	4,44 (4,43)
2J-HPd	C ₄₂ H ₃₆ N ₈ O ₄ FeCl ₂ Pd ₂ (1056,38)	9,51	228*	Kızıl kahve D	47,60 (47,71)	4,00 (3,41)	11,06 (10,60)	- -	19,40 (20,15)	4,78 (5,29)
2J-NO ₂ Pd	C ₄₂ H ₃₄ N ₁₀ O ₈ FeCl ₂ Pd ₂ (1146,38)	14,14	185	Venge D	43,05 (43,96)	3,08 (2,96)	12,43 (12,21)	- -	17,90 (18,57)	4,35 (4,87)
2J-CH ₃ Pd	C ₄₄ H ₄₀ N ₈ O ₄ FeCl ₂ Pd ₂ (1084,44)	17,64	175	Koyu kahve D	49,01 (48,69)	4,09 (3,69)	10,05 (10,33)	- -	19,00 (19,63)	4,80 (5,15)

*: Bozunma sıcaklığı

D: Diyamanyetik

4.6. Dendronların İletkenlik Ölçümleri

Pd^{+2} ve Pt^{+2} iyonları içeren dendronların iletkenlik ölçümleri Bölüm 3.1.'de anlatıldığı şekilde yapılarak belirlendi ve sonuçları (9,47-17,64 $\mu\text{S/cm}$) Çizelge 4.1'de verildi. Sentezlenen dendronların önce DMSO içerisinde 1×10^{-3} M'luk çözeltileri hazırlandı ve oda sıcaklığında iletkenlikleri ölçüldü. Referans olarak DMSO içerisinde 1×10^{-3} M'luk KCl (73 $\mu\text{S/cm}$) ve 1×10^{-3} M'luk DMSO (0,54 $\mu\text{S/cm}$) çözeltilerinin oda sıcaklığında iletkenlikleri belirlendi.

1×10^{-3} M'luk DMSO ortamında ölçülen iletkenliklere göre çözeltinin elektrolit tipi aşağıdaki Çizelge 4.2.'de görülmektedir [138,139].

Ölçümler sonunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde Pd^{+2} ve Pt^{+2} iyonu içeren tüm dendronların elektrolit olmadığı sonucuna varıldı (Çizelge 4.3) [140].

Çizelge 4.2. Molar iletkenlik değerlerine göre elektrolit tipleri

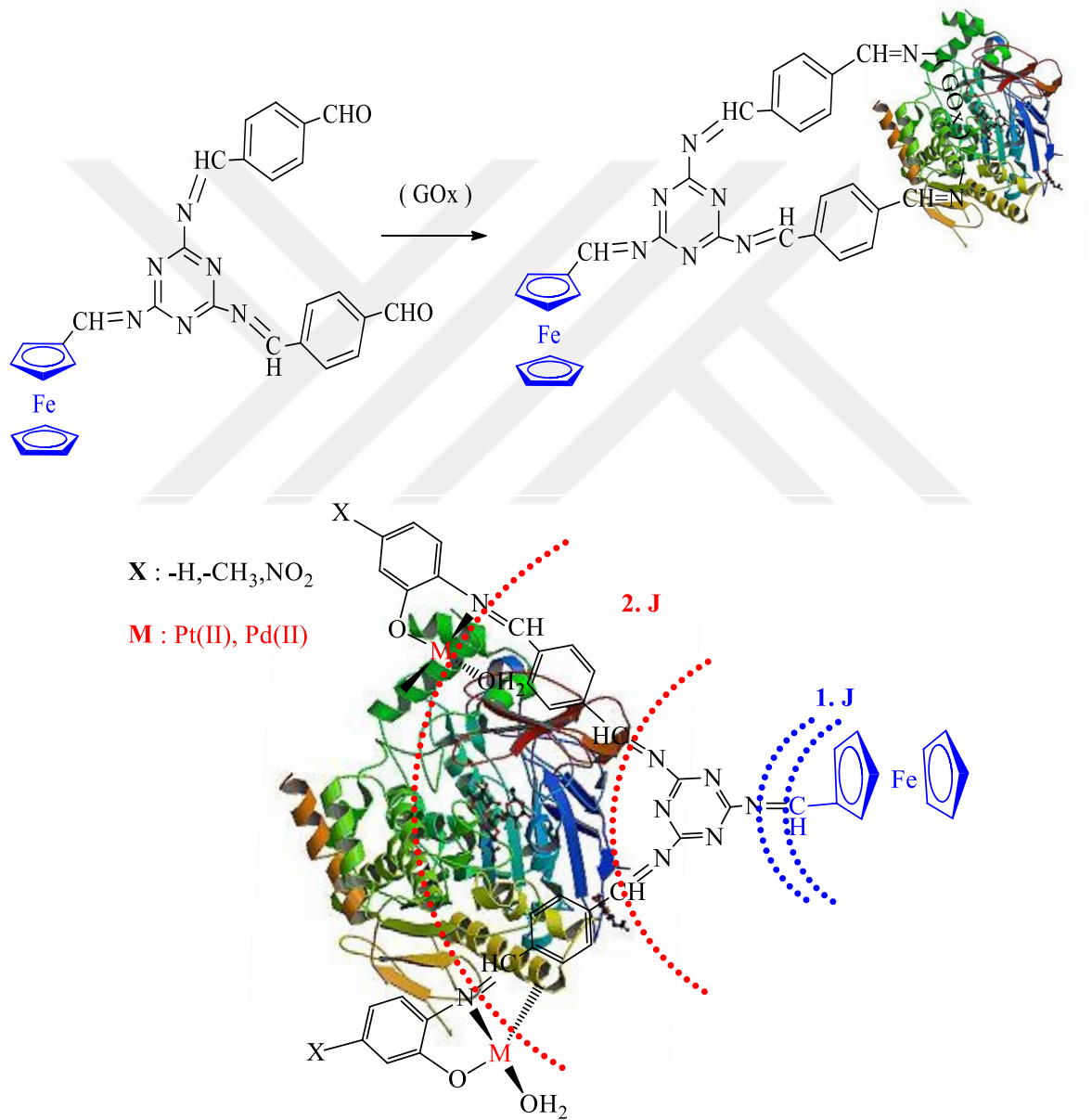
İletkenlik ($\mu\text{S/cm}$)	Elektrolit Tipi
65-90	1:1
130-170	1:2
200-240	1:3
300	1:4

Çizelge 4.3. Sentezlenen dendronların iletkenlik değerleri ve bazı referanslar için ölçülen iletkenlik değerleri

Bileşik	$\mu\text{S/cm}$	Elektrolit Tipi
KCl	73,00	1:1
CaCl_2	150,80	1:2
DMSO	0,54	-
2J-HPt	9,47	-
2J- NO_2Pt	12,89	-
2J- CH_3Pt	15,04	-
2J-HPd	9,51	-
2J- NO_2Pd	14,14	-
2J- CH_3Pd	17,64	-

4.7. β -Glukoz Oksidaz (GOx) Enziminin İmmobilizasyonu ve Optimizasyonu

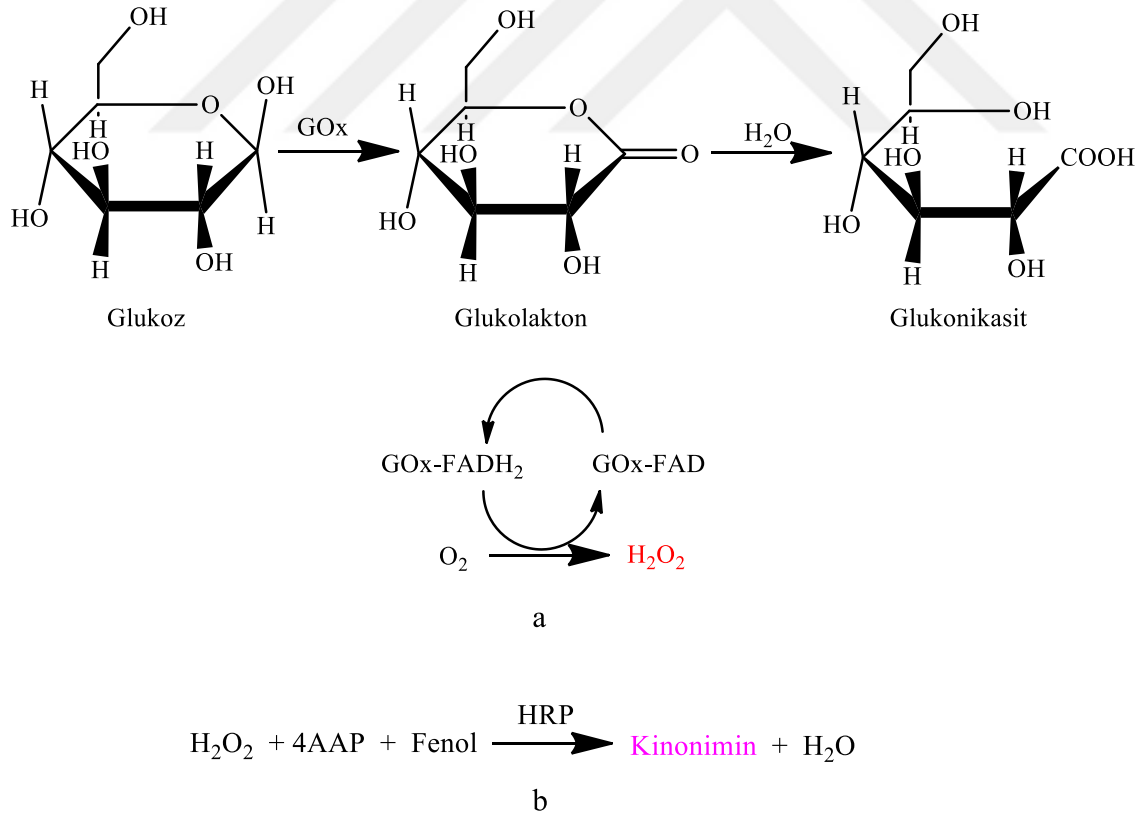
10 mg β -Glukoz oksidaz'ın (GOx) 10 mL sudaki çözeltileri hazırlandıktan sonra 0,5'er gr 2J, 2J-HPt, 2J-HPd, 2J-NO₂Pt, 2J-NO₂Pd, 2J-CH₃Pt, 2J-CH₃Pd dendronlarının üzerlerine ilave edildi. Karışım oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı üzerinde 24 saat boyunca karıştırılarak immobilizasyonun gerçekleşmesi sağlandı. Daha sonra dendronlar süzülerek alındı, +4°C'de muhafaza edildi.



Şekil 4.10. İki jenerasyonlu ve büyütülmüş iki jenerasyonlu dendronlara GOx enziminin immobilizasyonu

GOx enziminin aktivitesinin tayininde kolorimetrik Trinder yöntemi kullanılmıştır [141]. Reaksiyon mekanizmasında; GOx enzimi, β -D-glukoz ile hidrojen peroksit arasında olan ve sonucunda D-glukono- δ -lakton oluşan reaksiyonu katalizleyen bir flavoproteindir ve bu reaksiyonda elektron alıcısı olarak moleküler oksijen (O_2) kullanılır. Bu reaksiyon iki yarı reaksiyondan oluşur. İndirgeyici yarı reaksiyonda GOx, β -D-glukozun enzimatik olmayan bir şekilde glukonik aside hidroliz olan D-glukon- δ -laktone oksidasyonunu katalizlemektedir. Daha sonra GOx'ın flavin adenin dinükleotit (FAD) halkası $FADH_2$ 'ye indirgenmektedir. Oksidatif yarı reaksiyonunda önceden indirgenmiş olan GOx oksijen tarafından hidrojen peroksit üretmek üzere tekrar yükseltgenmektedir.

Kolorimetrik tayinin yapılabilmesi için tepkime ortamında oluşan H_2O_2 'in HRP enziminin varlığında renklendiricilerle (4-AAP, Fenol) oluşturduğu pembe renkli kinonimin bileşiğinden yararlanılır. Bu bileşiğin maksimum dalga boyu 507 nm'dir [142]. Enzim aktivitesi bu dalga boyundaki absorbans değişimi izlenerek belirlenmiştir.



Şekil 4.11. a) GOx'ın indirgen ve yükseltgen yarı reaksiyonları, b) renkli bileşik kinoniminin oluşması

4.7.1. İmmobilize edilen β -Glukoz oksidaz enziminin aktifliğine pH etkisi

Destek materyale tutturulmuş enzimin aktifliğine pH etkisini incelemek için, GOx (β -glukoz oksidaz) enzimi immobilize edilmiş dendronlardan 2'şer mg alınarak yedi tüp içerisine konuldu. Üzerlerine 20 mg glukoz ve pH 3,0-9,0 arasında hazırlanan tampon çözeltilerinden ilave edilip oda sıcaklığında ultrasonik su banyosunda karıştırıldı. 4-Aminoantipirin (10 mg), Fenol (20 mg) ve peroksidaz enzimi (0,5 mg) eklendikten sonra UV-GB spektrofotometresi ile 507 nm'deki absorbans değişimi izlendi. Daha sonra Excel'de bu değerler grafikleştirildi ve dendronlar için optimum pH değerleri belirlendi.

Mukayese etmek amacıyla serbest β -glukoz oksidaz enziminin (GOx) aktifliğine pH etkisi de incelendi. Bunun için, tüp içerisine Bölüm 3.3.'de belirtildiği gibi hazırlanan serbest enzim çözeltisinden 1'er mL alınıp yedi tüp içerisine konuldu ve immobilize enzim için yapılan işlemler aynen tekrarlandı UV-GB spektrofotometresi yardımıyla absorbans değerleri kaydedildi. Serbest enzim ve farklı desteklere tutturulmuş enzimin optimum pH değerlerinin kıyaslaması yapıldı.

4.7.2. İmmobilize edilen β -Glukoz oksidaz enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi

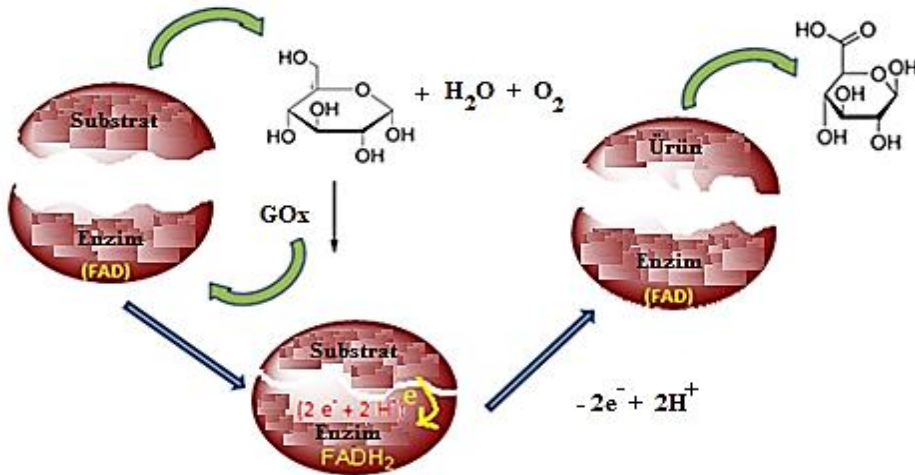
Destek materyale tutturulmuş enzimin aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek için, GOx (β -glukoz oksidaz) enzimi immobilize edilmiş dendronlardan 2'şer mg alınarak tüplere konuldu. Üzerlerine 20 mg glukoz ve optimum pH'daki tampon çözeltisinden ilave edilip 20°C-90°C sıcaklıkları arasında ısıtılmış olan ultrasonik su banyosunda 30 dk karıştırıldı. 4-AAP (10 mg), Fenol (20 mg) ve HRP (0,5 mg) eklendikten sonra UV-GB spektrofotometresi ile 507 nm'deki absorbans değişimi izlendi Daha sonra Excel'de bu değerler grafikleştirildi ve dendronlar için optimum sıcaklık değerleri belirlendi.

Mukayese etmek amacıyla serbest β -glukoz oksidaz enziminin (GOx) aktifliğine sıcaklığın etkisi de incelendi. Bunun için, tüp içerisine Bölüm 3.3.'de belirtildiği gibi hazırlanan serbest enzim çözeltisinden 1'er mL alınıp sekiz tüp içerisine konuldu ve immobilize enzim için yapılan işlemler aynen tekrarlandı UV-GB spektrofotometresi yardımıyla absorbans değerleri kaydedildi. Serbest enzim ve farklı desteklere tutturulmuş enzimin optimum sıcaklık değerlerinin kıyaslaması yapıldı.

4.7.3. İmmobilize edilen β -Glukoz oksidaz enziminin tampon çözelti ve yapay idrar ortamında tekrarlanabilirliğinin tayini

Destek materyale tutturulmuş enzimin tekrar kullanılabilirliğini incelemek için, bir tüpe GOx (β -glukoz oksidaz) enzimi immobilize edilmiş dendronlardan 2'şer mg konularak üzerlerine belirlenen optimum pH'daki tampon çözeltisinden 4 mL ve 20 mg glukoz ilave edilip 20 dk oda sıcaklığında karıştırıldı. 4-AAP (10 mg), Fenol (20 mg) ve HRP (0,5 mg) eklendikten sonra tekrar 10 dk oda sıcaklığında karıştırıldı. UV-GB spektrofotometresi yardımıyla belirlenen dalga boyunda absorbans değerleri okundu. Daha sonra tüp içerisindeki çözelti kısmı dekante edilerek uzaklaştırıldı. Geride kalan katının üzerine aynı miktarlarda tampon çözelti, substrat (katı glukoz) ve renklendiriciler ilave edilerek yukarıdaki işlemler renklenme solana dek tekrar edildi.

Yapay idrar ortamında tekrar kullanım sayısı tayini için, 2 mg immobilize dendron tartılarak deney tüpüne konuldu. Üzerine Bölüm 3.3.'de belirtildiği şekilde hazırlanan yapay idrar çözeltisinden 4 mL ilave edilerek 10 dk karıştırıldı. 1,26 mg glukoz katısı (Tip 2 Diyabet) [143] eklenerek 10 dk karıştırıldı. 4-AAP (10 mg), Fenol (20 mg) ve HRP (0,5 mg) eklendikten sonra 10 dk daha karıştırılarak UV-GB spektrofotometresi yardımıyla belirlenen dalga boyunda absorbans değerleri kaydedildi.



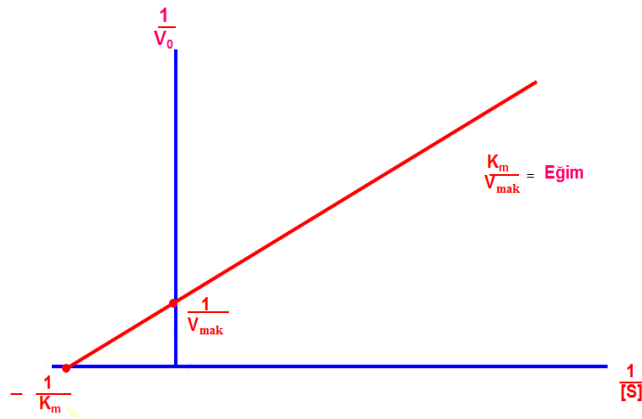
Şekil 4.12. Anahtar-kilit modeli üzerinden enzim-substrat ilişkisi gösterimi

4.7.4. İmmobilize edilen β -Glukoz oksidaz enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Destek materyale tutturulmuş enzimin aktifliğine substrat (glukoz) derişiminin etkisini incelemek için, GOx (β -Glukoz Oksidaz) enzimi immobilize edilmiş dendronlardan 2'şer mg alınarak tüplere konuldu. Üzerlerine 0,05 M'lık stok glukoz çözeltisinden değişen miktarlarda (0,5-10 mL) tüplere ilave edildi. Tüplerdeki toplam hacim 10 mL olacak şekilde optimum pH'daki tampon çözeltisinden ilave edildi. Bir sonraki adımda 4-AAP (10 mg), Fenol (20 mg) ve HRP (0,5 mg) eklendi ve optimum sıcaklığa getirilmiş ultrasonik su banyosunda 30 dk karıştırıldı. Tüpler içerisinde substrat (glukoz) yönünden değişik derişimlerdeki (45 mM - 0,5 mM) renkli çözeltilerin belirlenen dalga boyundaki absorbans derişimi UV-GB spektrofotometresi yardımıyla izlendi.

Artan substrat derişimine karşı absorbans değerleri grafiğe geçirildi. Elde edilen grafiğin ax^2+bx+c denkleminde eğim bulunarak " $v = \left(\frac{A}{t}\right) \times \left(\frac{1}{Eğim}\right)$ " formülünden her bir derişim için hız değerleri hesaplandı. Daha sonra *Lineaweaver-Burk* kalibrasyon grafiği çizilerek K_m ve V_{mak} (Michaelis-Menten Sabitleri) değerleri belirlendi. (K_m , enzimler için bir parmak izi olup enzimin substratına karşı ilgisini ifade eden bir parametre olup, V_{mak} ise enzimin aktif bölgelerinin substrat ile tam doyumluğa geçince ulaştığı yani katalizin ulaşabileceği en yüksek hız değeridir.)

Mukayese etmek amacıyla serbest β -glukoz oksidaz enziminin (GOx) aktifliğine substrat derişiminin etkisi de incelendi. Bunun için, tüp içerisine Bölüm 3.3.'de belirtildiği gibi hazırlanan serbest enzim çözeltisinden 1'er mL alınıp onbeş tüp içerisine konuldu ve immobilize enzim için yapılan işlemler sırasıyla uygulanarak aktiflik tayinleri yapıldı. UV-GB spektrofotometresi yardımıyla absorbans değerleri kaydedildi. Kinetik parametreler hesaplandı.



Şekil 4.13. Lineweaver-Burk çift-resiprok eğrisi

4.7.5. İmmobilize β -Glukoz oksidaz enziminin depolama kararlılığı

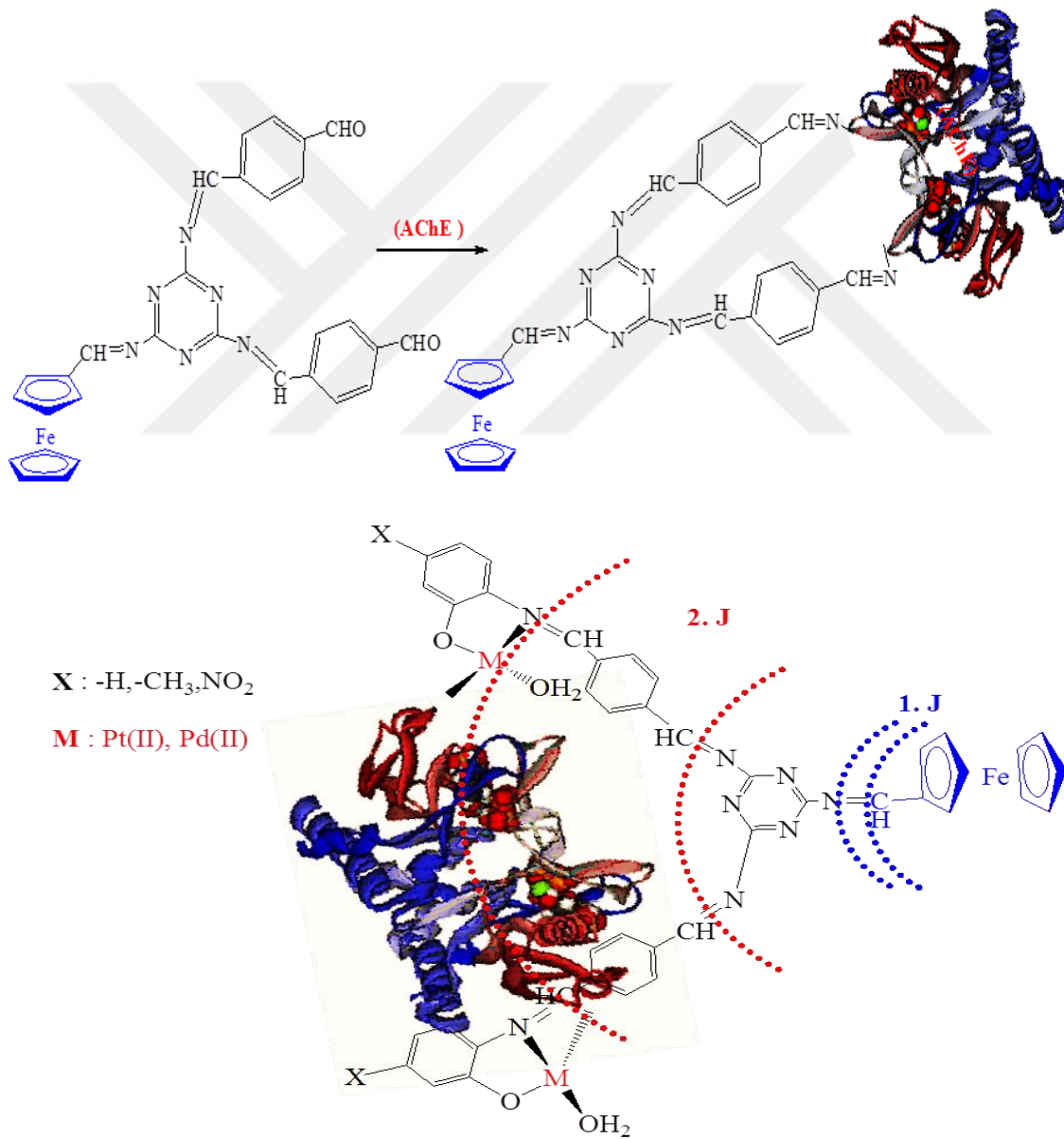
Destek materyale tutturulmuş enzimin depolama kararlılığını incelemek için, GOx (β -Glukoz Oksidaz) enzimi immobilize edilmiş dendronlardan 2'şer mg alınarak tüplere konuldu ve üzerlerine 4 mL tampon çözeltisi ve 20 mg glukoz katısı eklenerek 20 dk karıştırıldı. 4-AAP (10 mg), Fenol (20 mg) ve HRP (0,5 mg) eklendikten sonra 10 dk daha karıştırılarak UV-GB spektrofotometresi yardımıyla belirlenen dalga boyunda (507 nm) absorbans değerleri okundu ve bu işlem her ay bir defa olmak üzere oda sıcaklığında tekrarlandı. Yapılan çalışma sonunda immobilize enzimin oniki ay sonunda aktifliğini % kaç koruyabildiği hesaplandı.



Şekil 4.14. Trinder metoduna göre glukoz'un takip şeması

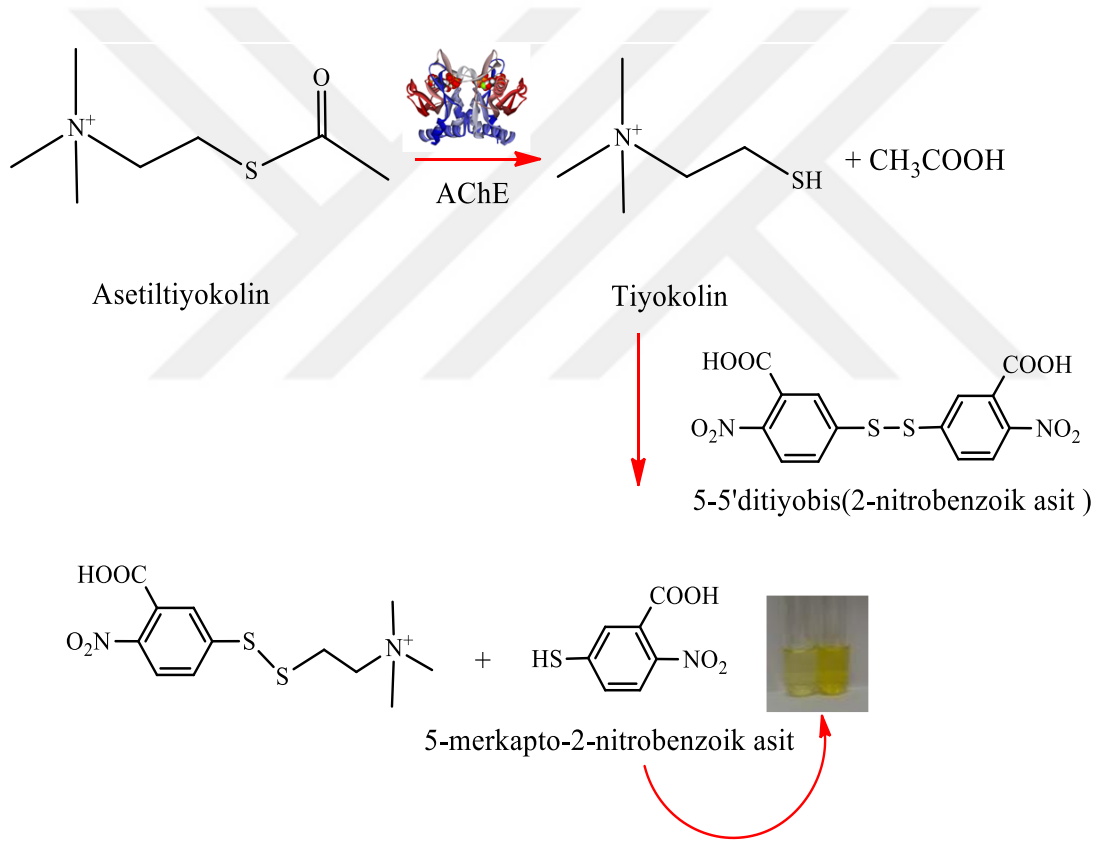
4.8. Asetilkolinesteraz (AChE) Enziminin İmmobilizasyonu ve Optimizasyonu

Bölüm 3.3.'de belirtildiği şekilde hazırlanan Asetilkolinesteraz enzim çözeltisinden 2'şer mL alınarak 0,5'er gram 2J, 2J-HPt, 2J-HPd, 2J-NO₂Pt, 2J-NO₂Pd, 2J-CH₃Pt, 2J-CH₃Pd dendronların üzerlerine ilave edildi. Karışım oda sıcaklığında, geri soğutucu altında 24 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak immobilizasyonun gerçekleşmesi sağlandı. Reaksiyon sonunda immobilize edilen dendronlar süzülerek çözelti ortamından alındı ve +4°C'de muhafaza edildi.



Şekil 4.15. İki jenerasyonlu ve büyütülmüş iki jenerasyonlu dendronlara AChE enziminin immobilizasyonu

AChE enziminin aktivitesinin tayininde Ellman'ın spektrofotometrik yöntemi kullanılmıştır [144]. Reaksiyon mekanizmasında; Glikoprotein olan Asetilkolinesteraz (AChE), asetiltiyokolini (ATCh) hidrolizleyen bir enzimdir. Bu reaksiyon iki adımdan meydana gelir. İlk basamak, AChE enziminin Asetiltiyokolini tiyokolin ve asetat moleküllerine parçalamasıdır. İkinci basamak ise, ilk basamakta oluşan ürün ile ortama katılan renklendirici 5-5'ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile reaksiyona girmesiyle 5-merkapt-2-nitrobenzoik asit'in oluşmasıdır. Spektrofotometrik yöntemde sarı renkli bileşik olan 5-merkapt-2-nitrobenzoik asitten yararlanılır. Bu bileşiğin maksimum dalga boyu 412 nm'dir. Enzim aktivitesi bu dalga boyundaki absorbans değişim izlenerek belirlenmiştir.



Şekil 4.16. Asetilkolinesteraz (AChE) enziminin biyokataliz mekanizması

4.8.1. İmmobilize edilen Asetilkolinesteraz enziminin aktifliğine pH etkisi

Destek materyale tutturulmuş enzimin aktifliğine pH etkisini incelemek için, AChE (Asetilkolinesteraz) enzimi immobilize edilmiş dendronlardan 2'şer mg alınarak yedi tüp içerisine konuldu. Daha sonra tüplerin üzerine stok substrat çözeltisinden 20 µL (asetiltiyokolin iyodür) ve pH 3,0-9,0 arasında hazırlanan tampon çözeltilerinden ilave

edilip oda sıcaklığında ultrasonik su banyosunda 15 dk karıştırıldı. 50 µL DTNB eklendikten sonra 15 dk karıştırma işlemine devam edildi ve UV-GB spektrofotometresi ile 412 nm'deki absorbans değişimi izlendi. Daha sonra Excel'de bu değerler grafikleştirildi ve dendronlar için optimum pH değerleri belirlendi.

Mukayese etmek amacıyla serbest Asetilkolinesteraz enziminin (AChE) aktifliğine pH etkisi de incelendi. Bunun için, tüp içerisine Bölüm 3.3.'de belirtildiği gibi hazırlanan serbest enzim çözeltisinden 2,88 µL alınıp yedi tüp içerisine konuldu ve immobilize enzim için yapılan işlemler aynen tekrarlandı UV-GB spektrofotometresi yardımıyla absorbans değerleri kaydedildi. Serbest enzim ve farklı desteklere tutturulmuş enzimin optimum pH değerlerinin kıyaslaması yapıldı.

4.8.2. İmmobilize edilen Asetilkolinesteraz enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi

Destek materyale tutturulmuş enzimin aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek için, AChE (Asetilkolinesteraz) enzimi immobilize edilmiş dendronlardan 2'şer mg alınarak sekiz tüp içerisine konuldu. Daha sonra tüplerin üzerine stok substrat çözeltisinden 20 µL (asetiltiyokolin iyodür) ve optimum pH'daki tampon çözeltisinden ilave edilip 20°C-90°C sıcaklıkları arasında ısıtılmış olan ultrasonik su banyosunda 15 dk karıştırıldı. 50 µL DTNB eklendikten sonra 15 dk daha karıştırma işlemine devam edildi ve UV-GB spektrofotometresi ile 412 nm'deki absorbans değişimi izlendi. Daha sonra Excel'de bu değerler grafikleştirildi ve dendronlar için optimum sıcaklık değerleri belirlendi.

Mukayese etmek amacıyla serbest Asetilkolinesteraz enziminin (AChE) aktifliğine sıcaklığın etkisi de incelendi. Bunun için, tüp içerisine Bölüm 3.3.'de belirtildiği gibi hazırlanan serbest enzim çözeltisinden 2,88 µL alınıp sekiz tüp içerisine konuldu ve immobilize enzim için yapılan işlemler aynen tekrarlandı UV-GB spektrofotometresi yardımıyla absorbans değerleri kaydedildi. Serbest enzim ve farklı desteklere tutturulmuş enzimin optimum sıcaklık değerlerinin kıyaslaması yapıldı.

4.8.3. İmmobilize edilen Asetilkolinesteraz enziminin tekrar kullanılabilirliği

Destek materyale tutturulmuş enzimin tekrar kullanılabilirliğini incelemek için, AChE (Asetilkolinesteraz) enzimi immobilize edilmiş dendronlardan 2'şer mg alınarak tüp

içerisine konuldu. Üzerlerine belirlenen optimum pH'daki tampon çözeltisinden 4 mL ve stok substrat çözeltisinden 20 µL (asetiltiyokolin iyodür) ilave edilip ultrasonik su banyosunda 15 dk oda sıcaklığında karıştırıldı. 50 µL DTNB eklendikten sonra 15 dk daha karıştırma işlemine devam edildi ve UV-GB spektrofotometresi yardımıyla belirlenen dalga boyunda absorbans değerleri okundu. Daha sonra tüp içerisindeki çözelti kısmı dekante edilerek uzaklaştırıldı. Geride kalan katının üzerine aynı miktarlarda tampon çözelti, substrat çözeltisi (asetiltiyokolin iyodür) ve DTNB ilave edilerek yukarıdaki işlemler renklenme solana dek tekrar edildi.

4.8.4. İmmobilize edilen Asetilkolinesteraz enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi

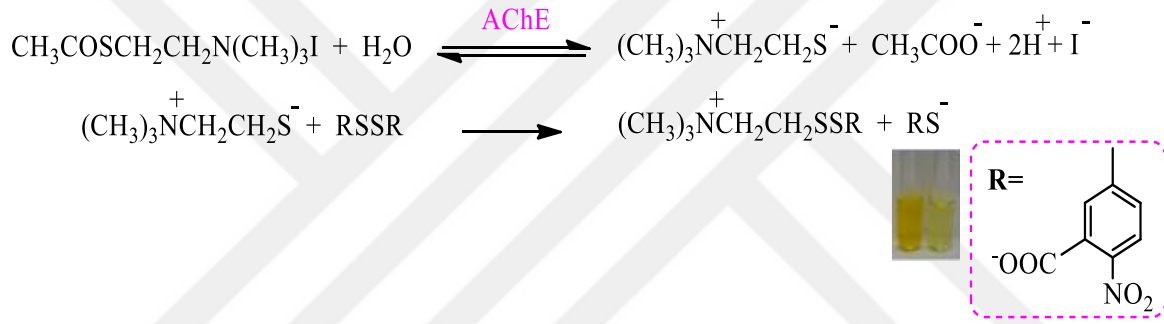
Destek materyale tutturulmuş enzimin aktifliğine substrat (asetiltiyokolin iyodür) derişiminin etkisini incelemek için, AChE (Asetilkolinesteraz) enzimi immobilize edilmiş dendronlardan 2'şer mg alınarak on tüp içerisine konuldu. Üzerlerine 0,075 M'lık stok asetiltiyokolin iyodür çözeltisinden değişen miktarlarda (10-60 µL) tüplere ilave edildi. Tüplerdeki toplam hacim 4020 µL olacak şekilde optimum pH'daki tampon çözeltisinden ilave edildi ve optimum sıcaklığa getirilmiş ultrasonik su banyosunda 15 dk karıştırıldı. Bir sonraki adımda her bir tüpe 50 µL DTNB eklendi ve 15 dk karıştırma işlemine devam edildi. Tüpler içerisinde substrat (asetiltiyokolin iyodür) yönünden değişik derişimlerdeki (1,12 mM-0,18 mM) renkli çözeltilerin, belirlenen dalga boyundaki absorbans değişimi UV-GB spektrofotometresi yardımıyla izlendi.

Artan substrat derişimine karşı absorbans değerleri grafiğe geçirildi. Elde edilen grafiğin ax^2+bx+c denkleminden eğim bulunarak " $v = \left(\frac{A}{t}\right) x\left(\frac{1}{Eğim}\right)$ " formülünden herbir derişim için hız değerleri hesaplandı. Daha sonra *Lineaweaver-Burk* kalibrasyon grafiği çizilerek K_m ve V_{mak} değerleri belirlendi.

Mukayese etmek amacıyla serbest Asetilkolinesteraz enziminin (AChE) aktifliğine substrat derişiminin etkisi de incelendi. Bunun için, tüp içerisine Bölüm 3.3.'de belirtildiği gibi hazırlanan serbest enzim çözeltisinden 2,88'er µL alınıp on tüp içerisine konuldu ve immobilize enzim için yapılan işlemler sırasıyla uygulanarak aktiflik tayinleri yapıldı UV-GB spektrofotometresi yardımıyla absorbans değerleri kaydedildi. Kinetik parametreler hesaplandı.

4.8.5. İmmobilize Asetilkolinesteraz enziminin depolama kararlılığı

Destek materyale tutturulmuş enzimin depolama kararlılığını incelemek için, AChE (Asetilkolinesteraz) enzimi immobilize edilmiş dendronlardan 2'şer mg alınarak tüplere konuldu ve üzerlerine 4 mL tampon çözelti ve 20 µL stok asetiltiyokolin iyodür (substrat) çözeltisinden eklenerek 15 dk karıştırıldı. Bir sonraki adımda her bir tüpe 50 µL DTNB eklendi ve 15 dk daha karıştırma işlemine devam edildi. UV-GB spektrofotometresi yardımıyla belirlenen dalga boyunda (412 nm) absorbans değerleri okundu ve bu işlem her ay bir defa olmak üzere oda sıcaklığında tekrarlandı. Yapılan çalışma sonunda immobilize enzimin dokuz ay sonunda aktifliğini % kaç koruyabildiği hesaplandı.



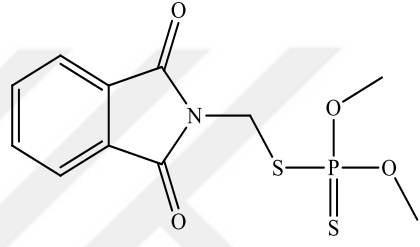
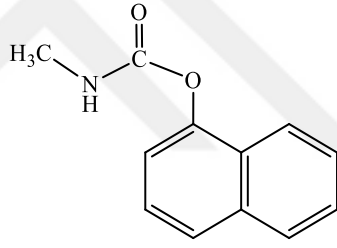
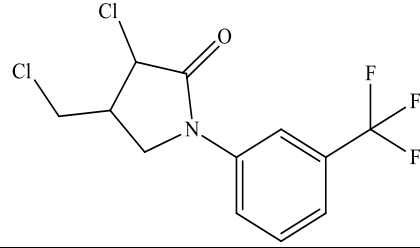
Şekil 4.17. Ellman metoduna göre Asetiltiyokolin iyodür'ün AChE varlığında verdiği tepkime

4.8.6. Enzim inhibitörü pestisitlerin immobilize AChE enzimi üzerine etkisi ve pestisit tayini

İmmobilize Asetilkolin esteraz enzimi ile pestisit tayini yapabilmek için, AChE (Asetilkolinesteraz) enzimi immobilize edilmiş dendronlardan 2'şer mg alınarak altı tüp içerisine konuldu. Üzerlerine Bölüm 3.3.'de belirtildiği gibi hazırlanan pH 8 tampon çözeltisinden tüpteki toplam hacim 4070 µL olacak şekilde (4000-3050 µL) ilave edildi ve asetiltiyokolin iyodür (substrat) çözeltisinden de 20 µL eklenerek ultrasonik su banyosunda 20 dk karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra, her bir tüpe 50 µL DTNB çözeltisinden ilave edilerek 10 dk daha karıştırma işlemine devam edildi. Daha sonra Bölüm 3.3.'de belirtildiği şekilde hazırlanan stok pestisit çözeltisinden altı ayrı tüp içerisinde sırasıyla 0, 10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL ve 50 µL olacak şekilde ilaveler yapıldı.

Pestisit ilavesinden 30 dk sonra, tüpler içerisinde pestisit yönünden değişik derişimlerdeki sarı renkli çözeltilerin, belirlenen dalga boyundaki absorbans değışimi UV-GB spektrofotometresi yardımıyla izlendi. Bu çalışma kullanılan madde miktarları ve işlem sırası değıştirilmeden insektisit olan Imidan fosmet, Karbaril ve herbisit olan Florokloridon için tekrarlandı. Fosmet, karbaril ve florokloridon'a ait açık yapıları ve adlandırılmaları Çizelge 4.4'de verildi.

Çizelge 4.4. Çalışılan pestisitlerin açık yapıları ve adlandırılmaları

Ticari İsmi	IUPAC ismi	Kimyasal Yapısı
Imidan fosmet	O,O-dimetilS-ftalimidometil fosforoditiyoat	
Karbaril	1-naftil-N-metilkarbamat	
Florokloridon	(3-kloro-4-(klorometil)-1-[3-(triflorometil)fenil]-2-pirolidinon)	

Çalışmanın devamında, immobilize AChE enziminin pestisitlerin kantitatif tayininde uygulamasını yapabilmek için, çalışılan derişim aralığında belirlenen dalga boyundaki absorbans değerlerine (y eksen) karşı pestisit miktarı (x eksen) gelecek şekilde kalibrasyon grafiğı çizildi. Oluşturulan grafiğın eğiminden yararlanarak absorbans değerin yarıya inebilmesi için (AChE enziminin aktifliğini %50'ye düşürebilecek) ortama ilave edilmesi gereken pestisit çözeltilisinin µL cinsinden miktarına geçildi.

Derişimi bilinmeyen pestisit tayininde kullanılmak üzere hazırlanan kalibrasyon grafiğının doğruluğunun saptanması için, tüp içerisine AChE enzimi immobilize edilmiş dendrondan 2 mg tartılarak konuldu. Üzerine Bölüm 3.3.'de belirtildiğı şekilde hazırlanan pH 8 tampon

çözeltilisinden 3065 μL ve asetiltiyokolin iyodür (substrat) çözeltilisinden 20 μL eklenerek ultrasonik su banyosunda 20 dk karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra, her bir tüpe 50 μL DTNB çözeltilisinden ilave edilerek 10 dk daha karıştırma işlemine devam edildi. Daha sonra derişimi bilinen pestisit çözeltilisinden 35 μL eklendi. Pestisit ilavesinden 30 dk sonra belirlenen dalga boyundaki absorbans değeri UV-GB spektrofotometresi yardımıyla kaydedildi. Deneysel olarak elde ettiğimiz absorbans değeri ile, kalibrasyon grafiğinden elde ettiğimiz absorbans değeri karşılaştırıldı ve % hata hesaplandı. Böylece derişimi bilinmeyen numunedeki pestisitinin tayin edilmesinde kullanabilecek bir kalibrasyon grafiği oluşturuldu.



5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, önce ferrosen çekirdekli birinci ve ikinci jenerasyon dendronlar sentezlendi. Sonra ikinci jenerasyon dendrona üç farklı amino fenol türevi (X: -H, -NO₂, -CH₃) katılarak “kalıp” yöntemi ile Pd(II) ve Pt(II) metalleri içeren genişletilmiş iki jenerasyonlu dendronlar sentezlendi. Sentezlenen dendronların yapıları, FT-IR, UV-Vis, ¹H-NMR, AAS, LC-MS, MALDI-TOF MS, molar iletkenlik ve magnetik süsseptibilite ölçümleriyle aydınlatıldı. Daha sonra, dendronlara Glukoz oksidaz (GOx) ve Asetilkolinesteraz (AChE) enzimi immobilize edilerek optimizasyon çalışmaları yapıldı.

Bu bölümde yapılan çalışmalar şu başlıklar altında incelenecektir.

- Sentezlenen dendronların yapıları FT-IR, UV-Vis, ¹H-NMR, AAS, LC-MS, MALDI-TOF MS, molar iletkenlik ve magnetik süsseptibilite ölçümleri ile aydınlatılması çalışmaları
- Sentezlenen dendronlara immobilize edilen Glukoz oksidaz (GOx) enziminin optimizasyon çalışmaları
- Sentezlenen dendronlara immobilize edilen asetilkolinesteraz (AChE) enziminin optimizasyon çalışmaları
- İmmobilize enzimlerin kalitatif ve kantitatif analiz uygulamaları anlatılacaktır.

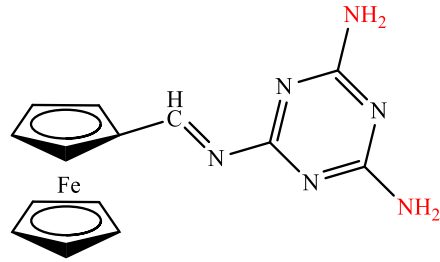
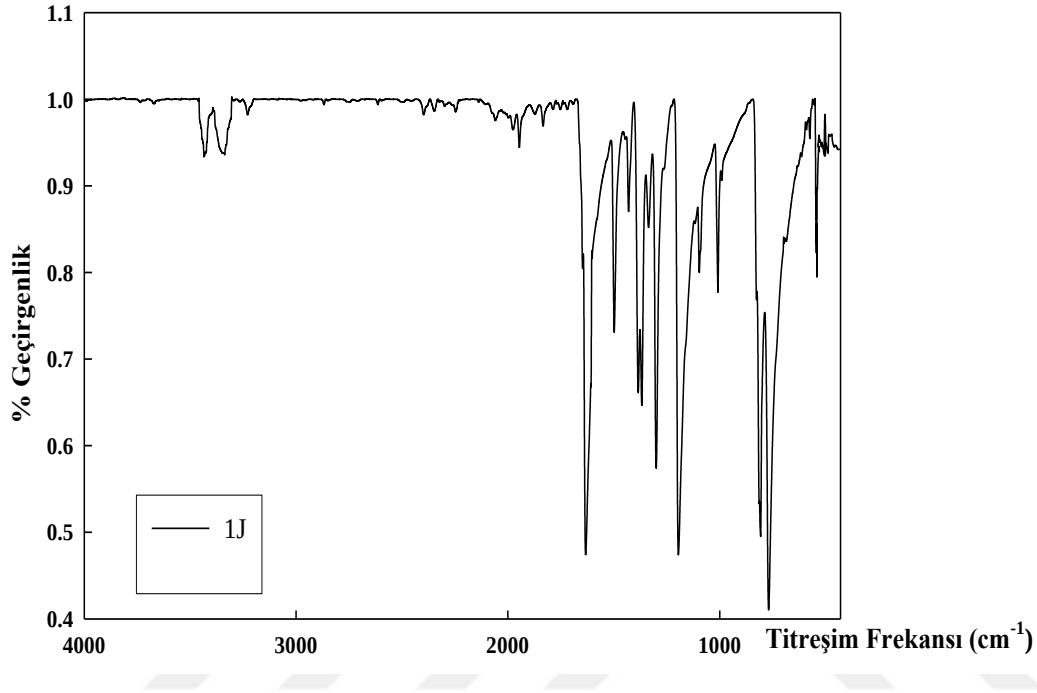
5.1. Dendronların Yapılarının Aydınlatılması

FT-IR, UV-Vis, ¹H-NMR, AAS, LC-MS, MALDI-TOF MS spektrumları ve molar iletkenlik ve magnetik süsseptibilite ölçümleri yorumlanarak sentezlenen dendronların yapıları verilecektir.

5.1.1. Birinci jenerasyon dendronun(1J) yapı analizi

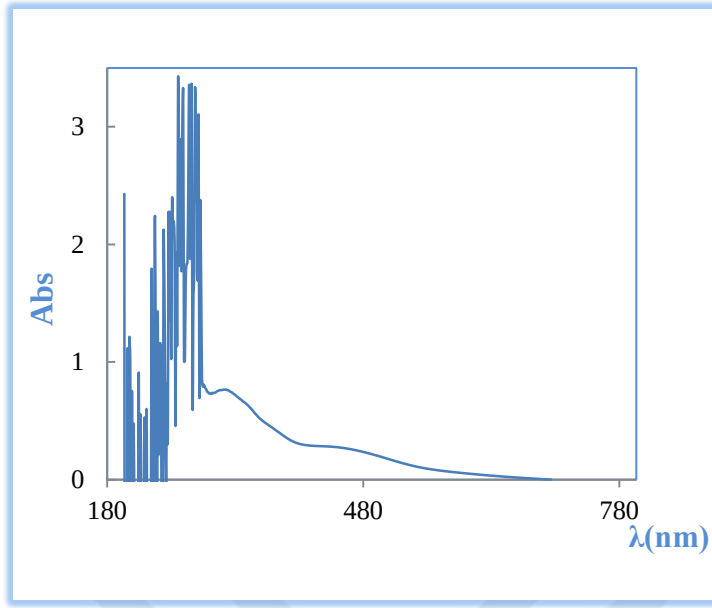
Sentezlenen birinci jenerasyon dendronun FT-IR spektrumu Şekil 5.1’de verilmektedir. Spektrumda gözlemlenen karakteristik IR titreşim bantları (Çizelge 5.3) şöyledir; -NH₂ grubuna ait asimetric gerilme titreşimi $\nu_{as(N-H)}$ 3433 cm⁻¹’de ve simetric gerilme titreşimi $\nu_{s(N-H)}$ 3336 cm⁻¹’de, ferrosen’e bağlı azometin grubuna ait $\nu_{(C=N)}$ gerilmesi 1633 cm⁻¹’de keskin pik halinde gözlenmiştir [145,146]. Ferrosen molekülüne ait halka titreşimi δ_{C-C}

(halka titreşimi) 1410 cm^{-1} 'de, düzlem içi bükülme titreşimi $\delta_{\text{C-C-H}}$ 1208 cm^{-1} 'de, ayrıca düzlem dışı $\nu_{\text{(C-H)dd}}$ titreşimi 805 cm^{-1} 'de, halka titreşimi $\nu_{\text{(Fe-Cp)halka}}$ 541 cm^{-1} 'de görülmüştür [59,147,148].



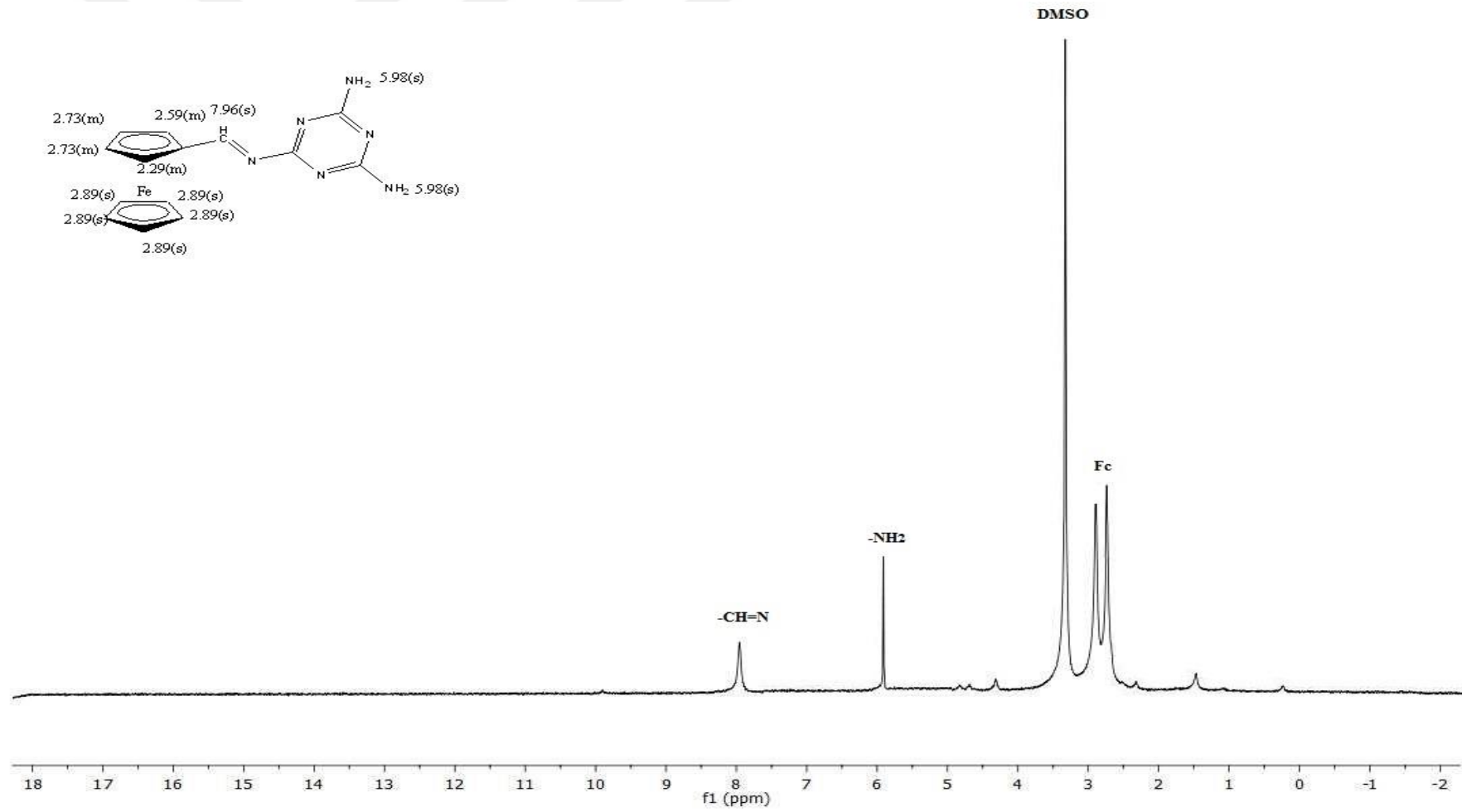
Şekil 5.1. Birinci jenerasyon dendronun IR Spektrumu

Birinci jenerasyon dendronun elektronik absorpsiyon spektrumu (UV-GB) Şekil 5.2'de verilmektedir. Bu spektrumda önemli karakteristik absorpsiyon bandlarına baktığımızda, $\sigma \rightarrow \sigma^*$ elektronik geçişine ait şiddetli bir band $201\text{--}204\text{ nm}$ aralığında, $\pi \rightarrow \pi^*$ (serbest geçiş) elektronik geçişine ait şiddetli bir band $251\text{--}254\text{ nm}$ civarında, azometin grubuna ait (C=N) karakteristik $n \rightarrow \pi^*$ geçiş bandı $288\text{--}291\text{ nm}$ aralığında ve ferrosen'e ait $d\text{--}d_{\text{(Fc)}}$ geçişi ise 446 nm 'de zayıf bir band olarak gözlenmiştir [149,150].



Şekil 5.2. Birinci jenerasyon dendronun UV spektrumu

Sentezlenen birinci jenerasyon dendronun DMSO- d_6 'da alınan ^1H -NMR spektrumu Şekil 5.3'de verilmektedir. Burada $-CH=N_{(Fe)}$ protonuna ait pik 7,96 ppm'de (s, 1H), $-NH_2$ protonuna ait pik 5,98 ppm'de (s, 4H) gözlemlendi. Ferrosen halkasına ait protonların ($-CH_{(Fe)}$) ise 2,89 (s, 5H), 2,73 (m, 2H), 2,59 (m, 1H) ve 2,29 ppm'de (m, 1H) olmak üzere ayrı ayrı yerlerde rezonansa uğradıkları görüldü. 3,33 ppm'deki pik çözücü olarak kullanılan dötoro DMSO'e, 2,09 ppm'deki pikin ise çözücünün suyundan kaynaklı pikler olduğu öngörüldü.

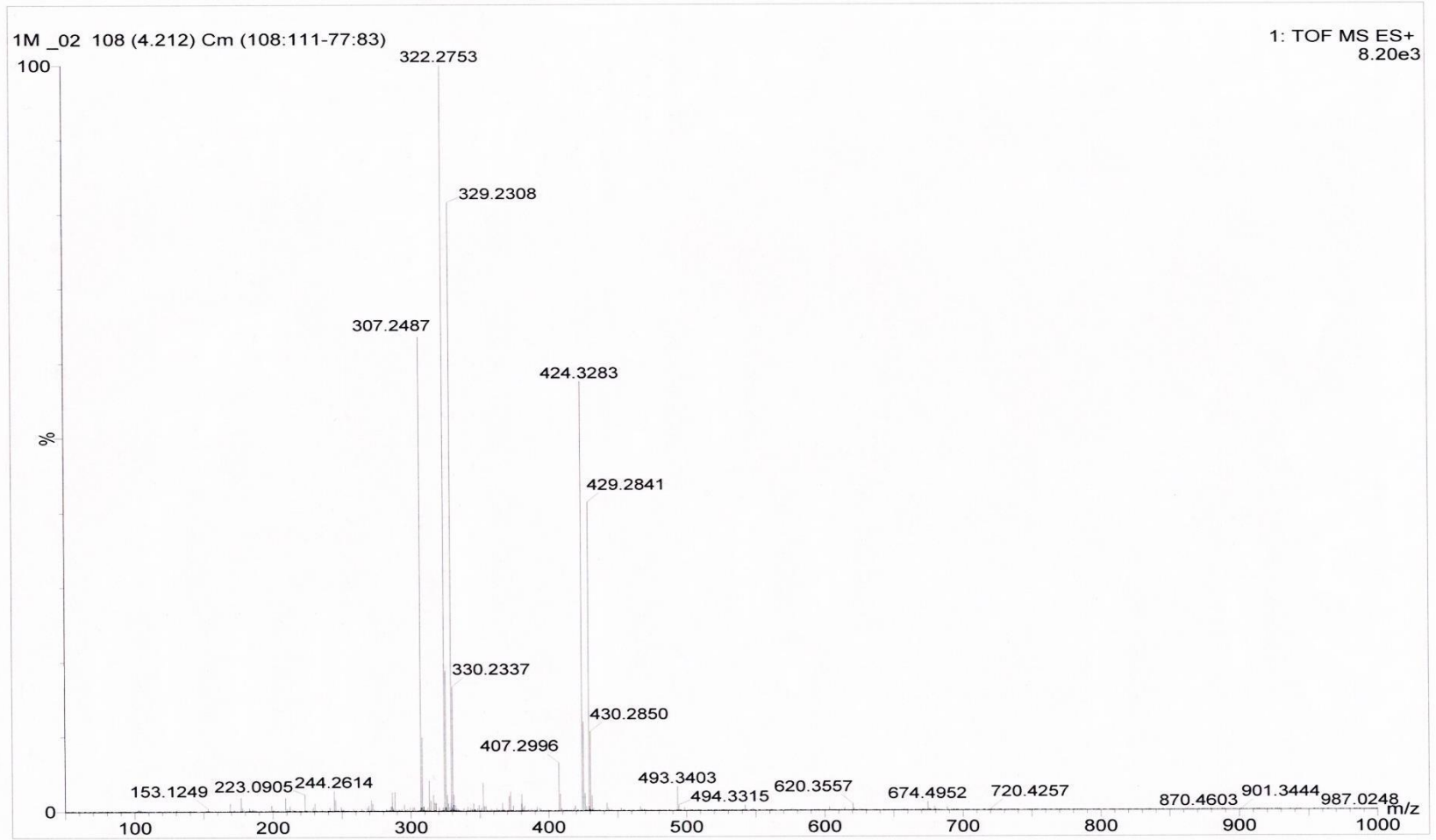


Şekil 5.3. 1J dendronunun ^1H -NMR spektrumu

Ferrosen ve melamin'in (1:1) tepkimesinden elde edilen birinci jenerasyon dendronun (1J; $C_{14}H_{14}N_6Fe$) teorik moleköl kütlesi 322,06 g/mol olarak hesaplanmış ve alınan LC-MS spektrumu incelendiğinde (Şekil 5.4) m/z (deneysel): 322,2753 [M^+] moleküler iyon piki 4,212. dakikada gözlenmiştir.

Sentezlenen birinci jenerasyon dendronun iletkenlik ölçümü Bölüm 3.1.'de anlatıldığı gibi yapıldı ve sonuç ($1,01 \mu S/cm$) Çizelge 4.3'de verildi. $1 \times 10^{-3} M$ 'lık DMSO çözeltisinde ve $26 \pm 0.1^\circ C$ 'de ölçülen iletkenlik değerine göre dendronun elektrolit olmadığı non-elektrolit olduğu görüldü [138].



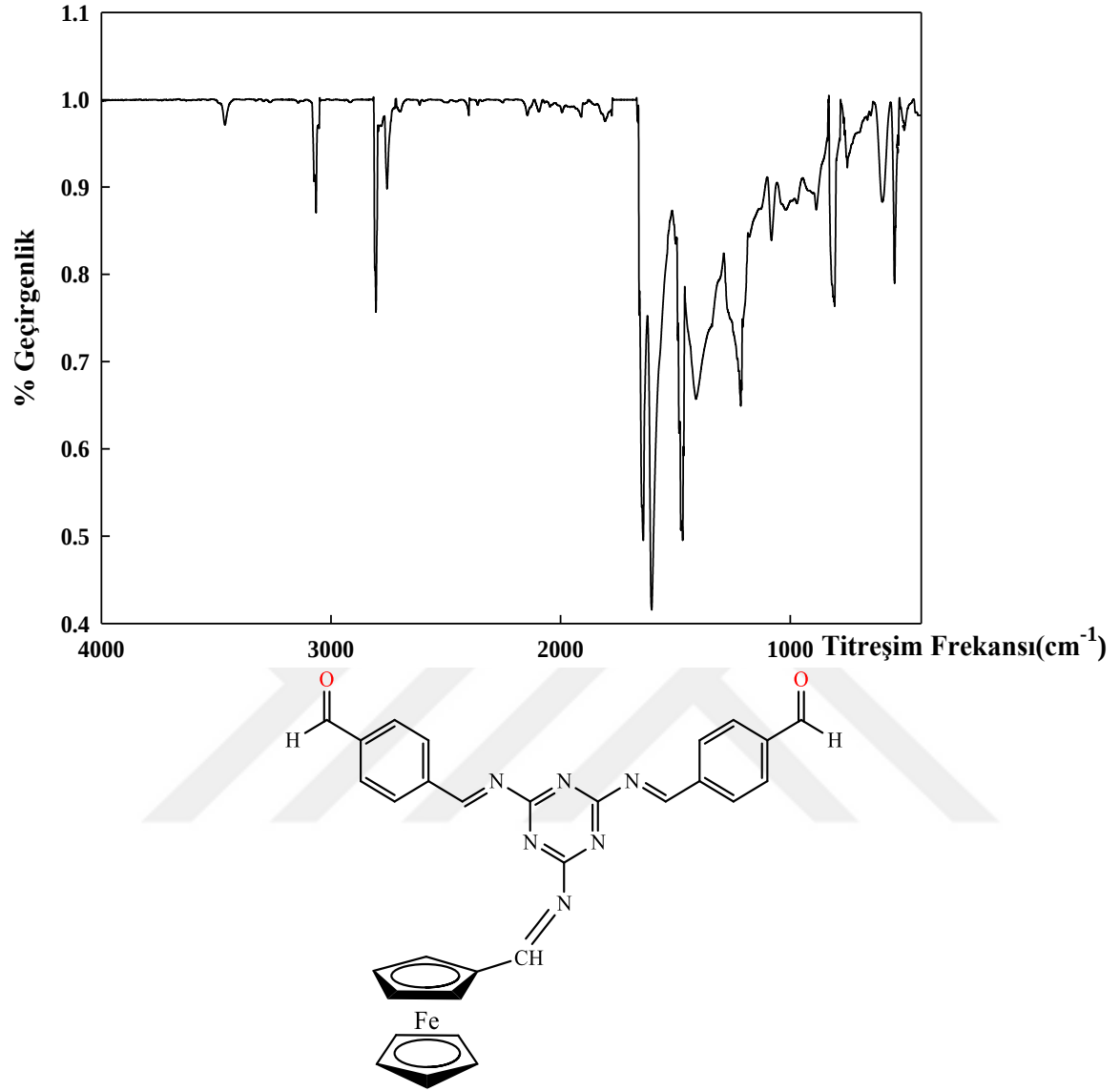


Şekil 5.4. 1J dendronunun LC-MS spektrumu

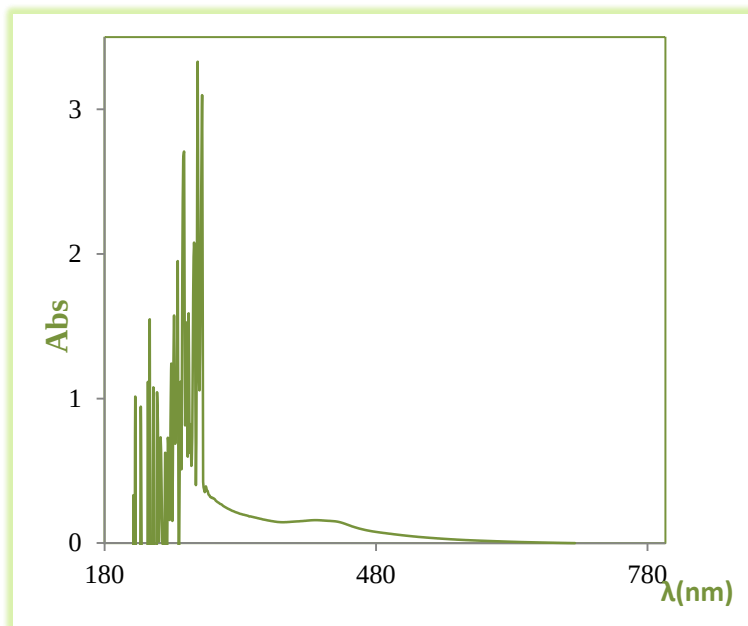
5.1.2. İkinci jenerasyon dendronun(2J) yapı analizi

Sentezlenen ikinci jenerasyon dendronun FT-IR spektrumu Şekil 5.5’de verilmektedir. Spektrum incelendiğinde; birinci jenerasyon dendronun spektrumunda gözlenen 3433 cm^{-1} , 3336 cm^{-1} ’deki serbest halde bulunan $-\text{NH}_2$ grubuna ait asimetric ve simetric gerilme titreşim bandlarının beklendiği gibi kaybolduğu gözlenmektedir. Yapıya eklenen tereftaldialdehit’in aromatik $\nu_{(\text{C-H})}$ gruplarına ait gerilme titreşimi 3054 cm^{-1} ’de yeni bir band olarak gözlemlendi. İkinci jenerasyon dendrondaki uç aldehit gruplarına ait $\nu_{(\text{C-H})}$ gerilmesi $2757, 2805\text{ cm}^{-1}$ ikili bant halinde, $\nu_{(\text{C=O})}$ gerilme titreşimi ise keskin bir bant olarak 1735 cm^{-1} ’de gözlemlendi. 1633 cm^{-1} ’de gözlenen ferrosen’e bağlı azometin grubuna ait $\nu_{(\text{C=N})}$ gerilme titreşimi yerini korurken, 1621 cm^{-1} ’de ortaya çıkan yeni band ise ikinci jenerasyon dendrondaki yeni imin grubuna ait $\nu_{(\text{C=N})}$ gerilme titreşimine atfedilmiştir [145,146]. Birinci jenerasyon dendrondaki ferrosen halkasına ait $\delta_{\text{-C-C(halka titreşimi)}}$ ikinci jenerasyon dendronda yüksek dalga sayısına kayarak 1416 cm^{-1} ’de, düzlem içi bükülme titreşimi $\delta_{\text{-C-C-H}}$ ’de 1211 cm^{-1} ’de gözlenmiştir. Bu durum ikinci jenerasyon dendronda ferrosen halkasının elektronik çevresinin değiştiğini göstermektedir. Birinci jenerasyon dendronda olduğu gibi ikinci jenerasyon dendronda da ferrosen’e ait düzlem dışı $\nu_{(\text{C-H})dd}$ titreşimi 807 cm^{-1} ’de, halka titreşimi $\nu_{(\text{Fe-Cp})halka}$ 541 cm^{-1} ’de görülmüştür [147,148].

İkinci jenerasyon dendrona ait UV-GB spektrumu Şekil 5.6’da verilmektedir. İkinci jenerasyon dendrona ait spektrum ile birinci jenerasyon dendrona ait spektrumun çok benzer olduğu görülmüştür. İkinci jenerasyon dendrona ait spektrumda önemli karakteristik absorpsiyon bandlarına baktığımızda, $\sigma \rightarrow \sigma^*$ elektronik geçişine ait band $204\text{-}207\text{ nm}$ aralığında, $\pi \rightarrow \pi^*$ (serbest geçiş) elektronik geçişine ait şiddetli bir band $253\text{-}257\text{ nm}$ civarında, azometin grubuna ait (C=N) karakteristik $n \rightarrow \pi^*$ geçiş bandı $288\text{-}291\text{ nm}$ aralığında ve ferrosen’e ait $d\text{-}d_{(\text{Fc})}$ geçişi ise 432 nm ’de zayıf bir band olarak gözlenmiştir [149].



Şekil 5.5. İkinci jenerasyon dendronun IR Spektrumu



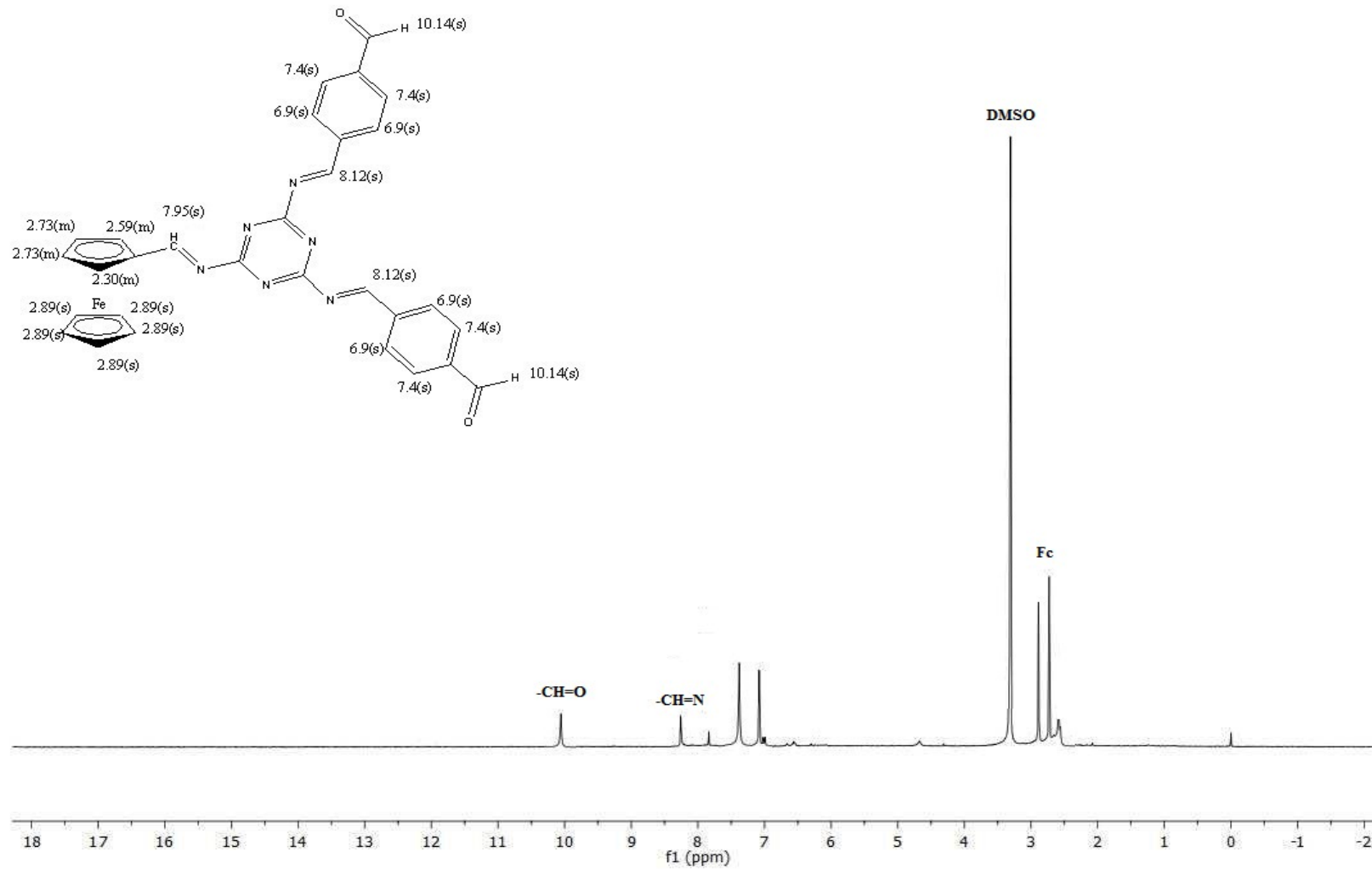
Şekil 5.6. İkinci jenerasyon dendronun UV spektrumu

Sentezlenen ikinci jenerasyon dendronun DMSO- d_6 'da alınan ^1H -NMR spektrumu Şekil 5.7'de verilmektedir. Birinci jenerasyon dendronun 5,98 ppm'de (s, 4H) görülen $-NH_2$ protonuna ait tekli pikin kaybolduğu gözlenmiştir. Bu pikin kaybolması, serbest halde bulunan aminlerin aldehitlerle reaksiyona girdiğinin bir göstergesi olarak düşünülmüştür. Birinci jenerasyon dendrona ait 7,96 ppm'de (s, 1H) gözlenen $-CH=N_{(Fc)}$ imin protonuna ait tekli pik ikinci jenerasyon dendronun spektrumunda 7,95 ppm'de (s, 1H) bir protona karşılık tekli pik olarak gözlemlendi.

Ayrıca ikinci jenerasyon dendrona ait yeni imin protonu $-CH=N_{(benzen)}$ 8,12 ppm'de iki protona eş değer tek pik (s, 2H) olarak gözlemlendi. İkinci jenerasyon dendronun uç aldehit protonları ise 10,14 ppm'de (s, 2H) iki protona karşılık tekli pik olarak gözlemlendi. Birinci jenerasyon dendronda ferrosen yapısının substitüe siklopentadienil halkasına ait protonların ($-CH_{(Fc)}$) 2,89 (s, 5H), 2,73 (m, 2H), 2,59 (m, 1H) ve 2,29 ppm'deki (m, 1H) pikleri ikinci jenerasyon dendronun spektrumunda da aynı yerlerde gözlenmiştir [149]. İkinci jenerasyon dendrona ait yeni $-CH_{(aromatik)}$ protonları 7,4 (s, 4H) ve 6,9 ppm'de (s, 4H) olarak gözlemlendi. Bu piklerin varolması birinci jenerasyon dendrona tereftaldialdehit'in katıldığına kanıt olarak yorumlandı. 3,32 ppm'deki pik çözücü olarak kullanılan dötoro DMSO'ya, 2,09 ppm'deki pik ise çözücünün suyundan kaynaklı pikler olduğu öngörüldü.

Çizelge 5.1. 1J ve 2J dendronlarının ^1H -NMR spektrum değerleri

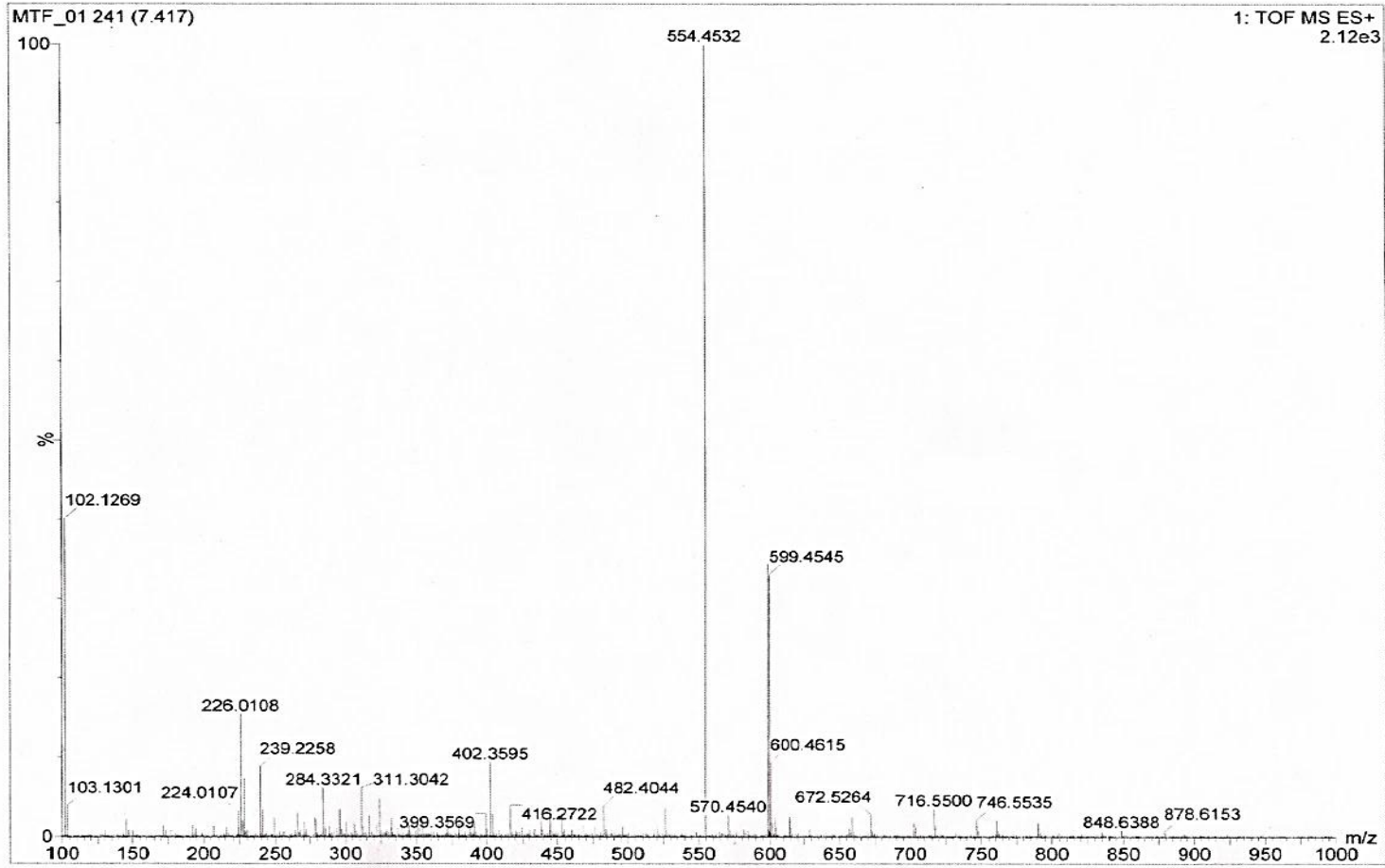
Dendron	Aldehit	$-\text{CH}=\text{N}_{(\text{Fc})}$	$-\text{CH}=\text{N}_{(\text{Benzen})}$	$-\text{NH}_2$	$-\text{CH}_{(\text{aromatik})}$	$-\text{CH}_{(\text{Fc})}$
1J	-	7,96(s,1H)	-	5,98(s,4H)	-	2,89 (s,5H) 2,73(m,2H) 2,59(m,1H) 2.29(m,1H)
2J	10,14(s,2H)	7,95(s,1H)	8,12(s,2H)	-	7,4(s,4H) 6,9(s,4H)	2,89 (s,5H) 2,73(m,2H) 2,59(m,1H) 2.30(m,1H)



Şekil 5.7. 2J dendronunun ^1H -NMR spektrumu

Birinci jenerasyon dendrona (1J; $C_{14}H_{14}N_6Fe$), iki mol tereftaldialdeht'in katılmasıyla oluşan İkinci jenerasyon dendronun (2J; $C_{30}H_{24}N_6O_2Fe$), teorik molekül kütlesi 556,39 g/mol olarak hesaplanmış ve alınan LC-MS spektrumu incelendiğinde (Şekil 5.8) m/z (deneysel): 554,4532 [M^{2+}] moleküler iyon piki 7,417. dakikada gözlenmiştir.

Sentezlenen ikinci jenerasyon dendronun iletkenlik ölçümü Bölüm 3.1.'de anlatıldığı gibi yapıldı ve sonuç ($1,01 \mu S/cm$) Çizelge 4.3'de verildi. $1 \times 10^{-3} M$ 'lık DMSO çözeltisinde ve $26 \pm 0.1^\circ C$ 'de ölçülen iletkenlik değerine göre dendronun elektrolit olmadığı non-elektrolit olduğu görüldü [138].



Şekil 5.8. 2J dendronunun LC-MS spektrumu

5.1.3. Metal ile koordine olan dendronların yapı analizi

İkinci jenerasyon dendrona üç farklı amino fenol türevi (X: -H, -NO₂, -CH₃) ve PdCl₂ ve PtCl₂ tuzları katılarak “kalıp” yöntemi ile Pd(II) ve Pt(II) iyonları içeren metalleri içeren genişletilmiş iki jenerasyonlu dendronlar sentezlendi.

Pd(II) ve Pt(II) iyonları içeren genişletilmiş ikinci jenerasyon dendronların pek çok çözücüde çözünürlüğü düşük olduğu için ¹H-NMR ve LC-MS spektrumları alınamadı. Bu nedenle yapılarının aydınlatılmasında FT-IR, UV-Vis, elemental analiz, AAS, MALDI-TOF MS, molar iletkenlik ve magnetik duyarlılık ölçümleriyle aydınlatıldı.

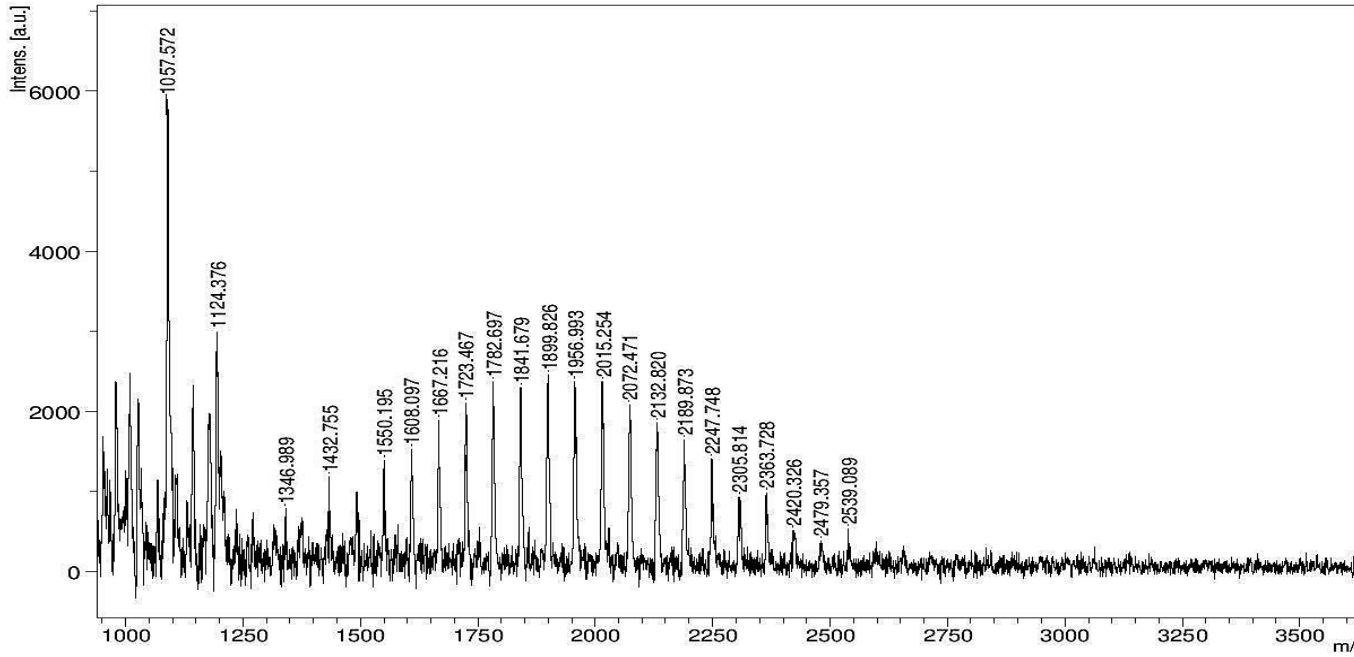
Sentezlenen Pd(II) ve Pt(II) iyonları içeren genişletilmiş ikinci jenerasyon dendronların iletkenlik ölçümleri Bölüm 3.1.’de anlatıldığı gibi yapıldı ve sonuçlar (9,47–17,64 µS/cm) Çizelge 4.3’de verildi. 1x10⁻³ M’lık DMSO çözeltisinde ve 26 ± 0.1°C’de ölçülen iletkenliklere göre tüm dendronların elektrolit olmadığı non-elektrolit olduğu görüldü [138]. Buna göre Pd(II) ve Pt(II) iyonları içeren genişletilmiş ikinci jenerasyon dendronların nötr yapıya sahip olduğu öngörüldü.

Pd(II) ve Pt(II) iyonları içeren genişletilmiş ikinci jenerasyon dendronların manyetik duyarlılık ölçümleri Bölüm 3.1.’de anlatıldığı gibi yapıldı ve sonuçlar Çizelge 4.1.’de verildi. 26 ± 0.1°C’de yapılan manyetik ölçüm değerleri (R’değerleri ”negatif”) bütün dendronların diyamanyetik olduğunu gösterdi. Buna göre Pd(II) ve Pt(II) komplekslerinde elektron konfigürasyonlarının 4d⁸, 5d⁸ ve geometrilerinin kare düzlem olduğunu öngörmek mümkündür. Bu sonuçlar dendronlar için Bölüm 4’te önerilen yapılarla uyumlu olmuştur.

Genişletilmiş ikinci jenerasyon dendronlardan 2J-NO₂Pt’nin MALDI-TOF MS spektrumu alınabilmiştir (Şekil 5.9). 2J-NO₂Pt’nin fragmentasyonlarına ait şematik gösterim Şekil 5.10’da verilmiştir. 2J-NO₂Pt için moleküler iyon piki [M⁺] m/z =1323,71’de gözlenmezken, [M⁺+Na⁺] piki m/z =1346,989’de gözlenmiştir.

Bu verilere göre Pt atomu içeren dendronlarda, dendronun”Pt₂D” molekül formülüne sahip olduğu sonucunu ortaya koymamızı sağladı ve Bölüm 4’te önerilen yapıları destekledi.

P2_TRANS



m/z	SN	Q u a l i t y F a c.	Res.	Intens.	Area
1057.572	3.6		1441	2621.86	2622
1044.551	3.3		3622	2339.02	1583
1124.376	4.4		4350	3019.00	1482
1346.989	1.1		3190	669.30	445
1432.755	1.8		4000	949.57	486
1496.686	1.5		1676	772.48	738
1550.195	2.9		1297	1419.61	2445
1608.097	3.0		6753	1380.77	577
1667.216	4.5		2490	1917.94	1954
1723.467	3.9		5302	1609.48	888
1782.697	6.2		1893	2395.04	3261
1841.679	6.1		3977	2319.64	1879
1899.826	6.8		2021	2471.49	5141
1956.993	6.8		2313	2390.69	3264
2015.254	7.3		2444	2388.24	3690
2072.471	5.1		4014	1586.81	1256
2132.820	6.1		1817	1873.45	3499
2189.873	5.7		4865	1661.51	1313
2247.748	5.1		3466	1421.93	1997
2305.814	3.5		4266	949.36	945
2363.728	3.7		2434	1002.35	1610
2420.326	1.9		4306	487.70	412
2479.357	1.5		4563	384.08	304
2539.089	2.3		3625	548.87	517

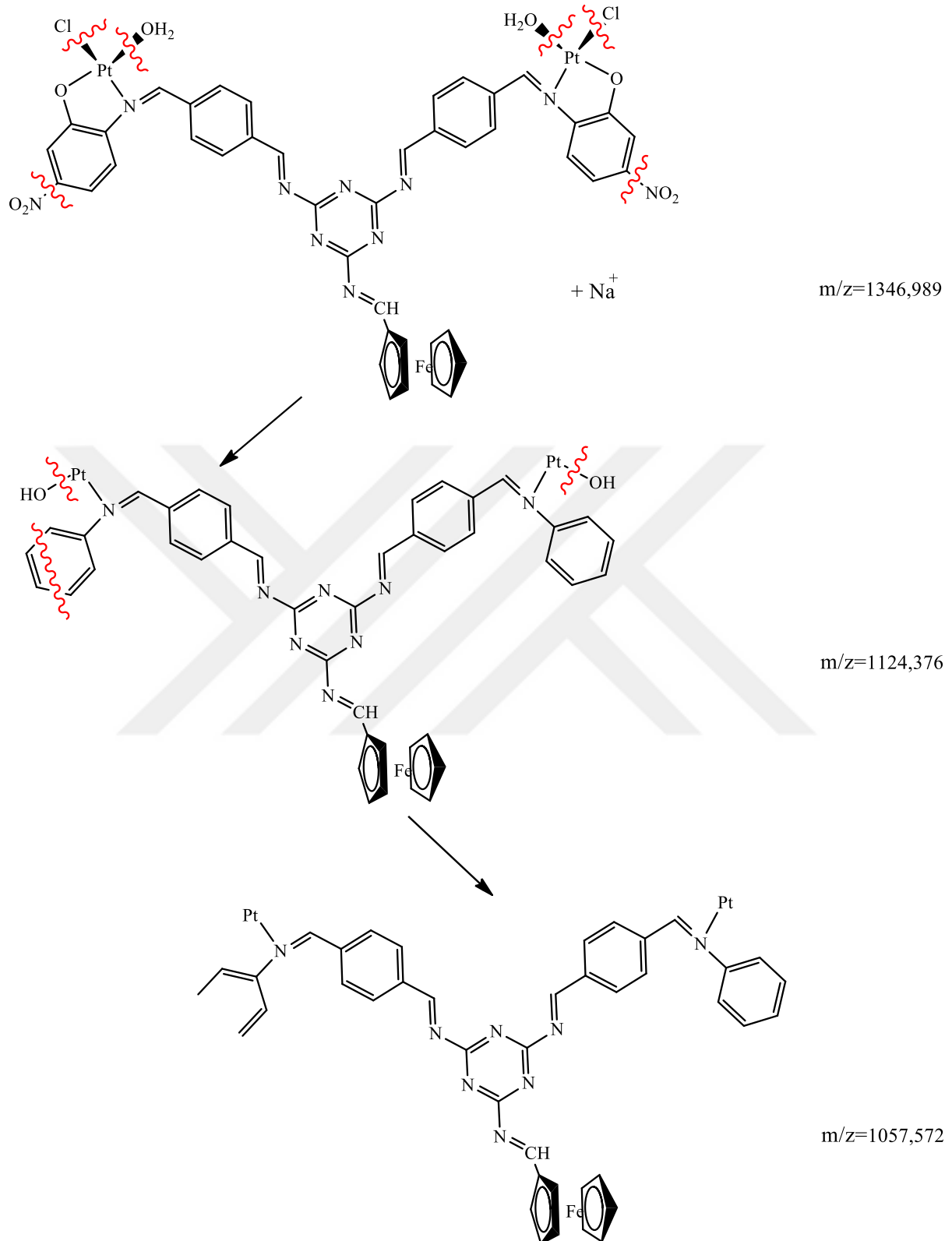
Date of Acquisition 2016-08-18T15:23:36.000

File Name D:\Data\bcosut\PT2_TRANS\0_H1 1\3

Performed by	Viewed by
Date / Sign	Date / Sign

BRUKER DALTONICS
printed:8/18/2016 3:24:32 PM

Şekil 5.9. 2J-NO₂Pt'nin MALDI-TOF MS spektrumu



Şekil 5.10. 2J-NO₂Pt dendronunun bazı fragmantları

Genişletilmiş ikinci jenerasyon dendronların TGA eğrileri incelendiğinde tüm dendronların tek kademede bozunduğu ve %90'lık bir kütle kaybının olduğu görülmektedir. Ayrıca tüm genişletilmiş ikinci jenerasyon dendronların TGA eğrilerinde 100°C'nin altında bozunma sıcaklığı ve kütle kaybı görülmemiştir. Bu durum komplekslerde kristal suyunun olmadığını düşündürmüştür. TGA eğrilerine Ekler Bölümünde (EK-8) yer verilmiştir.

2J-XPd; (X: H, NO₂, CH₃)

Pd(II) iyonları içeren genişletilmiş ikinci jenerasyon dendronların FT-IR spektrumları Ekler bölümünde verilmektedir. Spektrumlar incelendiğinde; İkinci jenerasyon dendrondaki uç aldehit gruplarına ait $\nu_{(C-H)}$ gerilmesi 2805, 2757 cm^{-1} ikili band halinde, 1735 cm^{-1} 'de $\nu_{(C=O)}$ gerilme titreşimine ait keskin bandın kompleks oluşumu ile kaybolması uç aldehitlerin 2-aminofenol ve türevleri ile tepkimeye girdiğini göstermektedir. 3339, 3329, 3287 cm^{-1} 'de gözlenen geniş bandların koordinasyon suyuna ait $\nu_{(OH)}$ gerilme titreşimlerine aittir. Literatür verilerine göre, koordinasyon suyuna ait 1600 cm^{-1} civarında gözlenmesi beklenen $\delta_{(H_2O)}$ bükülme titreşimine ait bandlar, imin gruplarına ait $\nu_{(C=N)}$ gerilmelerine ait bandların altında kaldığından gözlenememiştir [149]. İkinci jenerasyon dendronun spektrumunda 1633 cm^{-1} 'de gözlenen (Ferrosen'e bağlı azometin) $\nu_{(C=N)}$ gerilme titreşimleri 1649-1638 cm^{-1} aralığında, 1621 cm^{-1} 'de gözlenen melamin içerikli imin gruplarına ait $\nu_{(C=N)}$ gerilme titreşimleri ise 1630-1623 cm^{-1} aralığında gözlenmiştir. Pd iyonu içeren dendronlarda ayrıca 1619-1611 cm^{-1} aralığında yeni imin bandı gözlenmiştir. Bu imin bandının ortaya çıkması 2-Aminofenol ile uç aldehitlerin tepkimeye girdiğini göstermektedir. Ayrıca bu bandın düşük dalga sayısında gözlenmesi bu imindeki azot atomunun metal iyonu ile koordinasyona katıldığını göstermektedir. N atomu üzerinden metale elektronların aktarılmasıyla $-C=N$ bağı zayıflamış ve bağ kuvveti (derecesi) azalmıştır [148]. İkinci jenerasyon dendronda 1211 cm^{-1} 'de görülen düzlem içi bükülme titreşimi δ_{C-C-H} metal içeren dendronlarda bu bandlar 1245-1242 cm^{-1} aralığında görülmüştür. Metal içeren dendronların IR spektrumlarındaki titreşimlerin düşük frekans bölgesinde M-O ve M-N titreşim badlarının belirlenmesi çok kolay değildir. Literatür verilerine göre, 581-575 cm^{-1} ve 452-429 cm^{-1} gözlenen yeni bandların $\nu_{(Pd-O)}$ ve $\nu_{(Pd-N)}$ titreşimlerine ait olduğu düşünülmüştür [59,151].

Bu ilave bandlar Schiff bazının O ve N verici atomları ile Pd atomuna koordine olduğunu desteklemektedir. Ayrıca Pd atomuyla koordinasyona giren Cl atomuna ait gözlemeyi beklediğimiz $\nu_{(Pd-Cl)}$ titreşim bandlarını Far-IR bölgesine düştüğünden dolayı görmemiz mümkün olmamıştır. İkinci jenerasyon dendronda 1416 cm^{-1} 'de gözlenen ferrosen halkasına ait $\delta_{C-C(\text{halka titreşimi})}$ metal içeren dendronlarda yüksek dalga sayısına kayarak $1445\text{-}1440\text{ cm}^{-1}$ arasında gözlenmiştir. Bu durum genişletilmiş ikinci jenerasyon dendronlarda ferrosen halkasının elektronik çevresinin değiştiğinin göstergesidir.

Tüm dendronlarda aromatik $\nu_{(C-H)}$ gerilme titreşimleri $3059\text{-}3055\text{ cm}^{-1}$ aralığında, aromatik $\nu_{(C-C)}$ titreşimleri ise $1600\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ aralığında gözlenmiştir. İkinci jenerasyon dendron ile metal içeren dendronlar kıyaslandığında aromatik $\nu_{(C-H)}$ gerilme titreşimlerinde çok büyük bir kayma meydana gelmemiştir. Ayrıca 2J-NO₂Pd dendronuna ait spektrumda 1530 ve 1340 cm^{-1} 'de gözlenen yeni ikili band nitro grubuna ait $\nu_{as(NO_2)}$ ve $\nu_s(NO_2)$ titreşimlerinden kaynaklanmıştır [149]. Ferrosen'e ait düzlem dışı $\nu_{(C-H)_{dd}}$ titreşimleri $822\text{-}815\text{ cm}^{-1}$ aralığında, halka titreşimleri ise $\nu_{(Fe-Cp)_{halka}}$ $552\text{-}540\text{ cm}^{-1}$ aralığında gözlenmiştir.

2J-XPt; (X: H, NO₂, CH₃)

Pt(II) iyonları içeren genişletilmiş ikinci jenerasyon dendronların FT-IR spektrumları Ekler bölümünde verilmektedir. Spektrumlar incelendiğinde; İkinci jenerasyon dendrondaki uç aldehit gruplarına ait $\nu_{(C-H)}$ gerilmesi $2805, 2757\text{ cm}^{-1}$ ikili band halinde, 1735 cm^{-1} 'de $\nu_{(C=O)}$ gerilme titreşimine ait keskin bandın kompleks oluşumu ile kaybolması uç aldehitlerin 2-aminofenol ve türevleri ile tepkimeye girdiğini göstermektedir. $3330, 3320, 3275\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen geniş bandların koordinasyon suyuna ait $\nu_{(OH)}$ gerilme titreşimlerine aittir. Literatür verilerine göre, koordinasyon suyuna ait 1600 cm^{-1} civarında gözlenmesi beklenen $\delta_{(H_2O)}$ bükülme titreşimine ait bandlar, imin gruplarına ait $\nu_{(C=N)}$ gerilmelerine ait bandların altında kaldığından gözlenememiştir [149]. İkinci jenerasyon dendronun spektrumunda 1633 cm^{-1} 'de gözlenen (Ferrosen'e bağlı azometin) $\nu_{(C=N)}$ gerilme titreşimleri $1645\text{-}1635\text{ cm}^{-1}$ aralığında, 1621 cm^{-1} 'de gözlenen melamin içerikli imin gruplarına ait $\nu_{(C=N)}$ gerilme titreşimleri ise $1632\text{-}1611\text{ cm}^{-1}$ aralığında gözlenmiştir. Pt iyonu içeren dendronlarda ayrıca $1612\text{-}1605\text{ cm}^{-1}$ aralığında yeni imin bandı gözlenmiştir.

Bu imin bandının ortaya çıkması 2-Aminofenol ile uç aldehitlerin tepkimeye girdiğini göstermektedir. Ayrıca bu bandın düşük dalga sayısında gözlenmesi bu imindeki azot atomunun metal iyonu ile koordinasyona katıldığını göstermektedir. N atomu üzerinden metale elektronların aktarılmasıyla $-C=N$ bağı zayıflamış ve bağ kuvveti (derecesi) azalmıştır. [148]. İkinci jenerasyon dendronda 1211 cm^{-1} 'de görülen düzlem içi bükülme titreşimi δ_{C-C-H} metal içeren dendronlarda bu bandlar $1242-1240\text{ cm}^{-1}$ aralığında görülmüştür. Platin içeren dendronların IR spektrumlarındaki titreşimlerin düşük frekans bölgesinde M-O ve M-N titreşim bandlarının belirlenmesi çok kolay değildir. Literatür verilerine göre, $577-565\text{ cm}^{-1}$ ve $439-425\text{ cm}^{-1}$ gözlenen yeni bantların $\nu_{(Pt-O)}$ ve $\nu_{(Pt-N)}$ titreşimlerine ait olduğu düşünülmüştür [59,151]. Bu ilave bandlar Schiff bazının O ve N verici atomları ile Pt atomuna koordine olduğunu desteklemektedir. Ayrıca Pt atomuyla koordinasyona giren Cl atomuna ait gözlemeyi beklediğimiz $\nu_{(Pt-Cl)}$ titreşim bandlarını Uzak-IR bölgesine düştüğünden dolayı görmemiz mümkün olmamıştır. İkinci jenerasyon dendronda 1416 cm^{-1} 'de gözlenen ferrosen halkasına ait $\delta_{C-C(\text{halka})}$ titreşimi platin metali içeren dendronlarda yüksek dalga sayısına kayarak $1454-1451\text{ cm}^{-1}$ arasında gözlenmiştir. Bu durum genişletilmiş ikinci jenerasyon dendronlarda ferrosen halkasının elektronik çevresinin değiştiğinin göstergesidir.

Tüm dendronlarda aromatik $\nu_{(C-H)}$ gerilme titreşimleri $3065-3059\text{ cm}^{-1}$ aralığında, aromatik $\nu_{(C-C)}$ titreşimleri ise $1600-1450\text{ cm}^{-1}$ aralığında gözlenmiştir. İkinci jenerasyon dendron ile metal içeren dendronlar kıyaslandığında aromatik $\nu_{(C-H)}$ gerilme titreşimlerinde çok büyük bir kayma meydana gelmemiştir. Ayrıca $2J\text{-NO}_2\text{Pt}$ dendronuna ait spektrumda 1525 ve 1337 cm^{-1} 'de gözlenen yeni ikili band nitro grubuna ait $\nu_{as(NO_2)}$ ve $\nu_s(NO_2)$ titreşimlerinden kaynaklanmıştır [149]. Ferrosen'e ait düzlem dışı $\nu_{(C-H)_{dd}}$ titreşimleri $825-805\text{ cm}^{-1}$ aralığında, halka titreşimleri ise $\nu_{(Fe-Cp)_{halka}}$ $545-539\text{ cm}^{-1}$ aralığında gözlenmiştir.

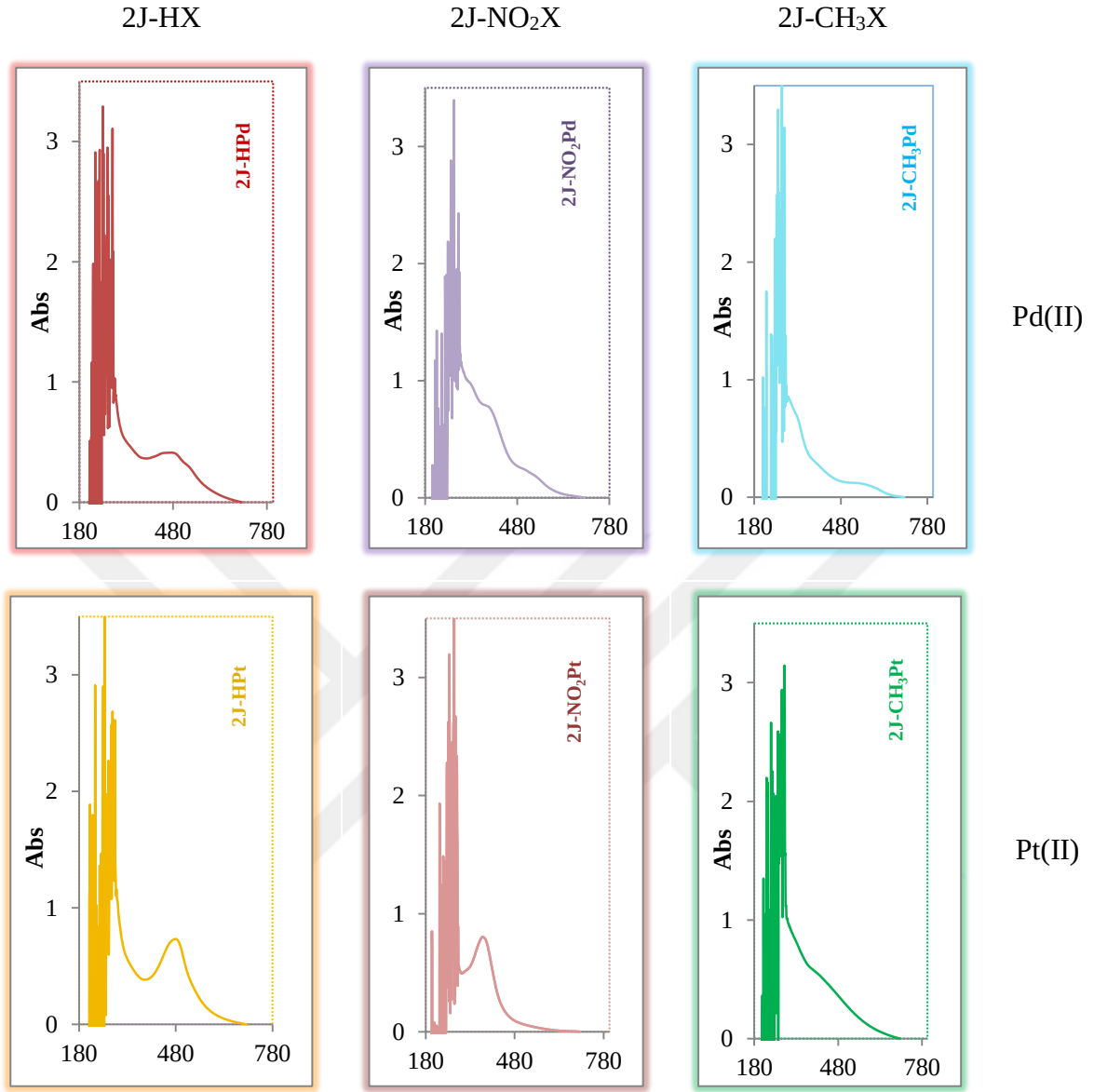
Pd(II) ve Pt(II) iyonu içeren genişletilmiş dendronlara ait UV-GB spektrumları Şekil 5.11'de verilmektedir. UV spektrumundaki bandların işaretlenmesinde benzer literatür verileri temel alınmıştır [138,145,152,153]. Palladyum içeren genişletilmiş ikinci jenerasyon dendronlara ait spektrumlar ile Platin içeren genişletilmiş ikinci jenerasyon dendronlara ait spektrumların benzer olduğu görülmüştür. Genişletilmiş ikinci jenerasyon dendronlara ait spektrumlarda önemli karakteristik absorpsiyon bandlarına baktığımızda,

$\sigma \rightarrow \sigma^*$ elektronik geçişine ait band 202-208 nm aralığında gözlenmiştir. Benzen halkasındaki $\pi \rightarrow \pi^*$ elektronik geçişlerine ait bandlar 252-260 nm arasında, imin grubuna ait $\pi \rightarrow \pi^*$ elektronik geçişine (serbest geçiş) ait şiddetli bandlar 282-291 nm arasında gözlenmiştir. Ligandlardaki (1J ve 2J) bandlar ile kıyaslandığında yapılara 2-aminofenol türevleri gibi oksokrom grupların takılmasından ve kompleks oluşumundan ötürü özellikle imin grubuna ait $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişlerinin dalga boylarının metal içeren genişletilmiş dendronlarda daha yüksek dalga boyuna (kırmızıya kayma) kaydığı görülmüştür. Ligandlardaki azometin gruplarına ait (C=N) karakteristik $n \rightarrow \pi^*$ geçişleri omuz şeklinde 288-291 nm aralığında gözlenmiş benzer şekilde kompleks oluşumu ile bu bandlarda yüksek dalga boyuna kayarak 291-300 nm aralığında gözlenmiştir. Bu kayma Schiff bazı ligandının metale imin azotu üzerinden bağlandığının bir göstergesidir. UV-GB spektrumları ile komplekslerin geometrilerinin açıklanmasında yararlı ip uçları veren d-d geçişlerine ait bandların, absorpsiyon şiddetlerinin düşük olduğundan ve metal iyonuna ait d-d geçiş bandlarının birinci ve ikinci jenerasyonlu dendronlara ait bandlarla çakıştığından gözlenmeleri zorlaşmıştır [150]. Genişletilmiş dendronların UV-GB spektrumları incelendiğinde, ferrosene ait d-d_(Fc) geçişleri 374-475 nm aralığında zayıf bir band olarak gözlenmiştir [149]. Kompleks oluşumu ile bandlar kısmen düşük dalga boyuna kaymış ve en çok kayma nitro grubu taşıyan Pd(II) ve Pt(II) iyonu içeren dendronlarda gözlenmiştir. Ayrıca genişletilmiş dendronlarda 521-579 nm arasında görülen bandların yük-transfer veya metal iyonuna ait d-d geçişlerine ait olduğu ön görülmüştür [154-156].

Çizelge 5.2. Sentezlenen dendronların UV-GB spektrum değerleri (nm)

Dendron	$\lambda_{\max}(10^{-4}\text{M DMSO})$					
	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	$\pi \rightarrow \pi^*_{(\text{bnz})}$	$\pi \rightarrow \pi^*_{(\text{C=N})}$	$n \rightarrow \pi^*_{(\text{C=N})}$	$d \rightarrow d^*_{(\text{Fc})}$	$d \rightarrow d_{(\text{M})}$
1J	201, 204	233	251, 254	288, 291	446	-
2J	204, 207	237	253, 257	288, 291	-,432	-
2J-HPt	203, 206	237	257, 261	295, 300	350, 468	
2J-NO ₂ Pt	203, 206	238	252, 255	290, 297	306, 370	532
2J-CH ₃ Pt	205, 208	235	252, 258	292, 295	311, 451	579
2J-HPd	205, 207	238	254, 258	294, 296	341, 475	525
2J-NO ₂ Pd	204, 207	234	253,259	291, 298	316, 374	521
2J-CH ₃ Pd	202, 208	236	256, 260	291, 297	311, 402	544

*: d $\rightarrow$ d (Serbest Fc): 441 (0.69)



Şekil 5.11. Metal ile koordine olan dendronların UV spektrumları

Çizelge 5.3. Sentezlenen dendronların belirgin IR frekansları (cm⁻¹)

Sentezlenen dendronlar	V _{-NH₂(as)/(s)} V _{O-H}	V _{-CH=N /} (Fc)	V _{-CH=N /} (melamin)	V _{-CH=N} (5-An)	V _{-CH (aldehit)} V _{C=O} V _{-CH(arom)/(alf)}	Ferrosen titreşim bantları		V _{-M-O} V _{-M-N}	ρ _r (OH) / ρ _w (H ₂ O)
						V _{Fe-Cp(Halka)} V _{-CH (dd)}	δ _{-C-C-H(bt)} δ _{-C-C(ht)}		
1J	3433-3336 -		1633/-/-		- - -/-	541 805	1208 1410	-	-
2J	- -		1633/1621/-		2757-2805 1735 3054/-	541 807	1211 1416	-	-
2J-HPt	- 3320		1643/1630/1608		- - 3061/-	541 825	1240 1454	571/431	842/-
2J-NO ₂ Pt	- 3330		1645/1632/1612		- - 3059/-	545 825	1242 1454	577/439	850/762
2J-CH ₃ Pt	- 3275		1635/1611/1605		- - 3065/-	539 805	1240 1451	565/425	835/-
2J-HPd	- 3329		1638/1623/1607		- - 3055/-	548 822	1242 1442	579/439	838/-
2J-NO ₂ Pd	- 3339		1649/1630/1619		- - 3059/-	552 831	1245 1445	581/452	856/-
2J-CH ₃ Pd	- 3287		1642/1625/1611		- - 3057/-	540 815	1242 1440	575/429	837/767

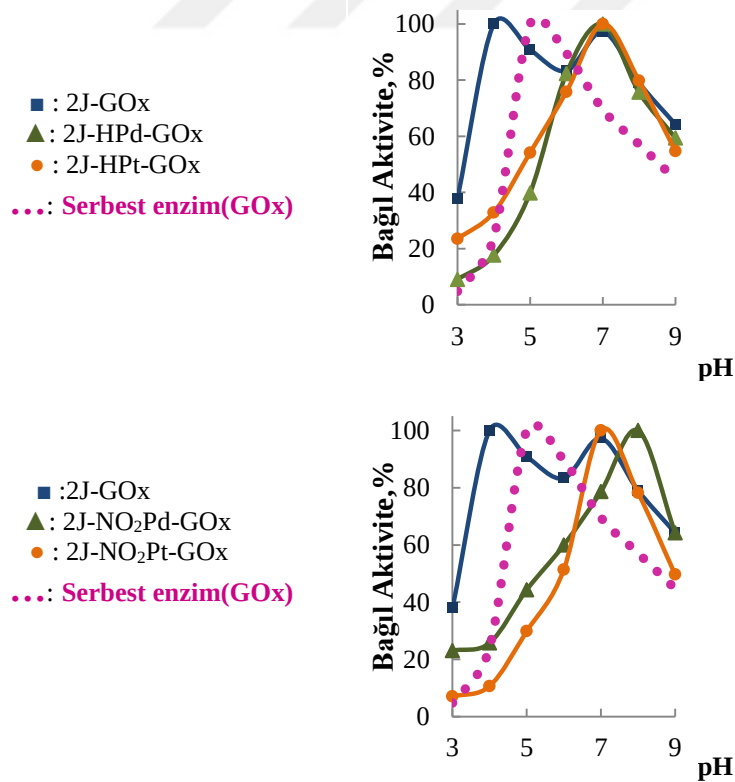
bt: Bağ titreşimi ht: halka titreşimi Fc: Ferrosen dd: düzlem dışı

5.2. β - Glukoz Oksidaz Enziminin (GOx) Optimizasyon Çalışmaları

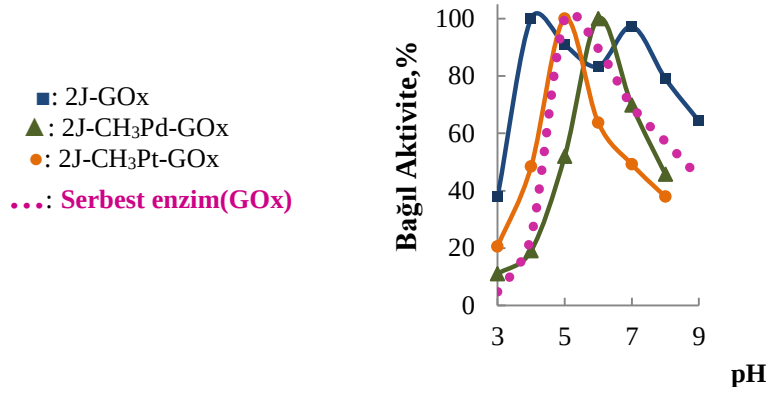
β - Glukoz oksidaz enziminin (GOx) immobilizasyonu Bölüm 4.7’de ayrıntılı bir şekilde verilmektedir. Bu bölümde serbest ve immobilize enzimlerin optimizasyon değerleri (pH, sıcaklık), substrat derişimi yönünden yapılan çalışmalar sonunda elde edilen kinetik parametreler verilecektir.

5.2.1. Serbest ve immobilize edilen GOx enziminin aktifliğine pH etkisi

Serbest ve destek materyale tutturulmuş GOx (β -glukoz oksidaz) enziminin aktifliğine pH etkisinin incelenmesi çalışmaları Bölüm 4.7.1’de ayrıntılı bir şekilde verildi. X ekseninde pH, y ekseninde ise bağıl aktivite değerlerine yer verilerek grafikler oluşturuldu. Her bir grafikte referans olarak serbest enzimin(pembe tireli çizgi) optimum pH değerlerine yer verildi ve sentezlenen yeni destek dendronların optimum pH değerleri ile karşılaştırma yapıldı. Deney sonucunda elde edilen veriler ile çizilen grafikler Şekil 5.12’de yer almaktadır.



Şekil 5.12. Enzim (GOx) aktivitesi üzerine pH etkisi



Şekil 5.12 (devam). Enzim (GOx) aktivitesi üzerine pH etkisi

Şekilde görüldüğü gibi serbest enzimin bağıl aktivitesinin en yüksek olduğu pH değeri 5 civarında iken, 2J-GOx iki jenerasyonlu dendronda ise bağıl aktivite iki farklı pH'da (pH 4 ve pH 7) maksimum göstermiştir. Genişletilmiş iki jenerasyonlu 2J-HPd-GOx, 2J-HPt-GOx, 2J-NO₂Pt-GOx dendronları için pH 7, 2J-CH₃Pt-GOx dendronu için pH 5, 2J-CH₃Pd-GOx dendronu için pH 6, 2J-NO₂Pd-GOx dendronu için pH 8 olduğu belirlendi.

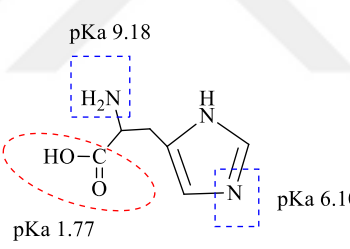
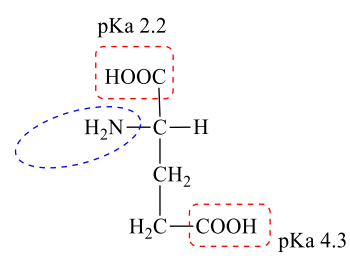
Optimum pH değerleri üzerine metal etkisini incelemek için genişletilmiş ikinci jenerasyon dendronların bağıl aktivite grafiklerine baktığımızda genelde farklı olduğu görüldü. Kompleks oluşumu ve metalin farklılaştırılması (Pd(II), Pt(II)) ile optimum pH değerinin değiştiği gözlemlendi. Genelde bu değişim Pd(II) metali içeren genişletilmiş dendronlarda Pt(II) metali içerenlere kıyasla daha bazik optimum pH değerleri gösterdi.

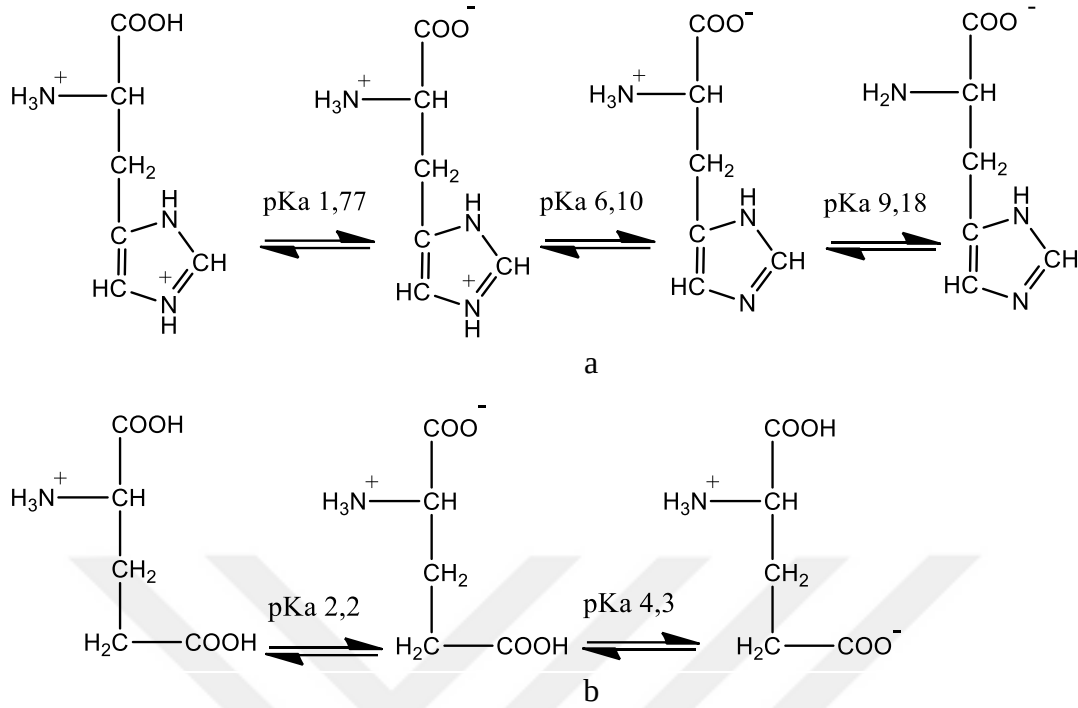
Optimum pH değerleri üzerine süstitüent etkisini incelemek için genişletilmiş ikinci jenerasyon dendronların bağıl aktivite grafiklerine baktığımızda yine optimum değerlerde farklılıklar görüldü. 2J-HPd-GOx, 2J-NO₂Pd-GOx ve 2J-CH₃Pd-GOx genişletilmiş ikinci jenerasyon dendronların optimum pH değerleri sırasıyla 7, 8, 6 olarak belirlenirken, 2J-HPt-GOx, 2J-NO₂Pt-GOx ve 2J-CH₃Pt-GOx genişletilmiş ikinci jenerasyon dendronların optimum pH değerlerinin sırasıyla 7, 7, 5 olduğu görüldü. -CH₃ ve -NO₂ grubu içeren dendronların bağıl aktivite grafiklerinde ve optimum pH değerlerinde değişime neden olduğu görüldü. -CH₃ grubu içeren dendronlarda optimum pH değerlerinin asidik bölgeye kaydığı görüldü.

Kaynak araştırmasına göre GOx enzimi asidik ortamda tepkime veriyorsa enzimin Glu412 bölgesi, nötral ortamda enzimin His516 bölgesi, bazik ortamda ise His559 bölgesi ile

tepkimeye girdiği *Leskovaca* ve diğerleri tarafından rapor edilmiştir [157]. Bu bilgiler ışığında hazırlanan yeni desteklere immobilize olan β -Glukoz oksidazın kataliz reaksiyonlarında üç önemli amino asit yan zincirinin rol oynadığı, pH değerlerindeki değişimlerin bu amino asit yan zincirlerinden aktif rol alana göre değiştiği öngörüsünde bulunulmuştur. 2J-GOx kodlu olan dendronuna immobilizasyonu yapılan GOx enziminin pH4 ve pH7’de aktif olması enzimin Glu412 ve His516 bölgelerinin, 2J-HPd-GOx, 2J-HPt-GOx, 2J-NO₂Pt-GOx kodlu dendronların immobilizasyonunda pH7’de aktif olması enzimin His516 bölgesinin, 2J-CH₃Pd-GOx, 2J-CH₃Pt-GOx kodlu dendronlarda pH6 ve pH5’de aktif olması Glu412 bölgesinin, 2J-NO₂Pd-GOx kodlu dendronda da pH8’de aktif olması His559 bölgesinin enzime bağlanmada aktif rol oynadığını göstermiştir.

Çizelge 5.4. İmmobilize dendronların optimum pH’ları ve enzimin aktif yan zincirleri

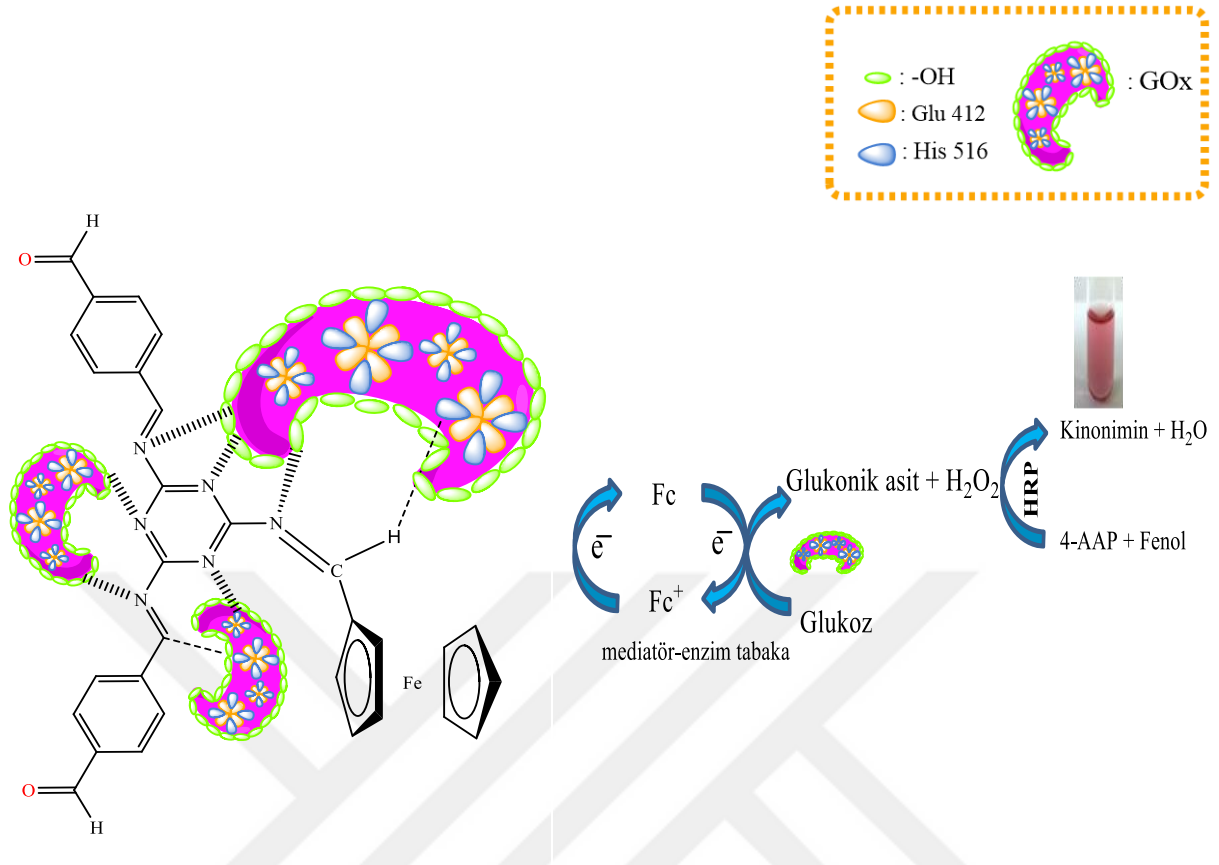
Dendron	Optimum pH	Sıcaklık	Enzimin aktif kısımları	
2J-GOx	4, 7	40, 60	 His (yan zincir)	His516
2J-HPd-GOx	7	50 ve 80		His559
2J-HPt-GOx	7	40 ve 70		
2J-NO ₂ Pd-GOx	8	50		
2J-NO ₂ Pt-GOx	7	40	 Glu (yan zincir)	Glu412
2J-CH ₃ Pd-GOx	6	60 ve 80		
2J-CH ₃ Pt-GOx	5	60		



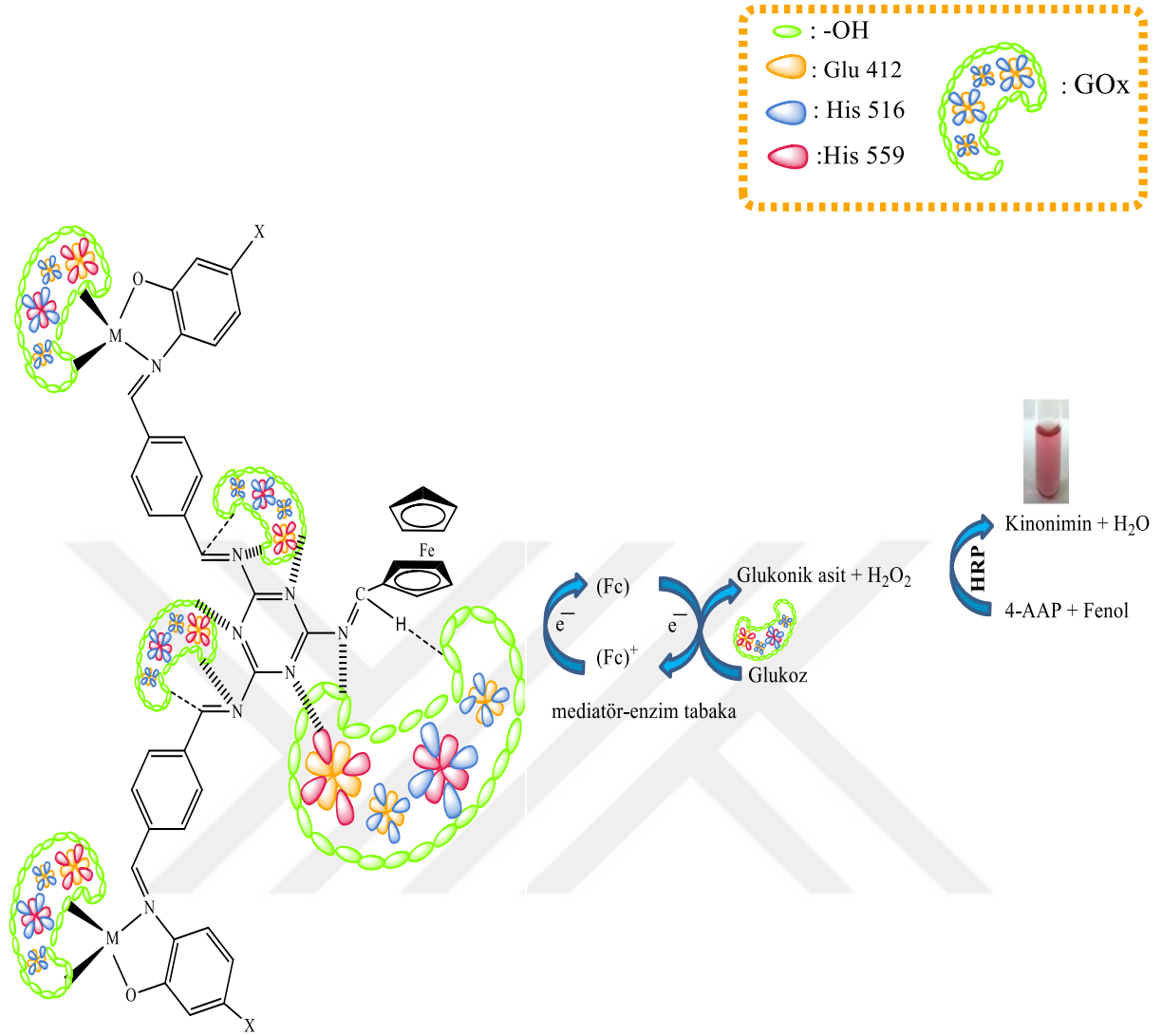
Şekil 5.13. a) His ve b) Glu aminoasitlerinin pH değişimine göre aktif olan grupları

Bu çalışmada enzimin immobilizasyonun, β -Glukoz oksidazın dış kabuğundaki karbohidratın -OH grubu ile aktif olan amino asit yan zincirlerinin yapısındaki -NH_2 veya -COOH gruplarının, dendronların yapısında bulunan -CH=N- (imin) azot atomu arasında hidrojen bağı oluşturarak yapıldığı sonucuna varıldı.

Enzim ve dendronlar arasındaki etkileşimin Şekil 5.14 ve Şekil 5.15'deki gibi olduğu ön görüldü. Modifiye edilen dendronların yapısında bulunan ferrosenin katkısı ile, oluşan elektron alışverişi sayesinde glukozun, glukonik asite yükseltgenme olayı gerçekleşmiş oldu.



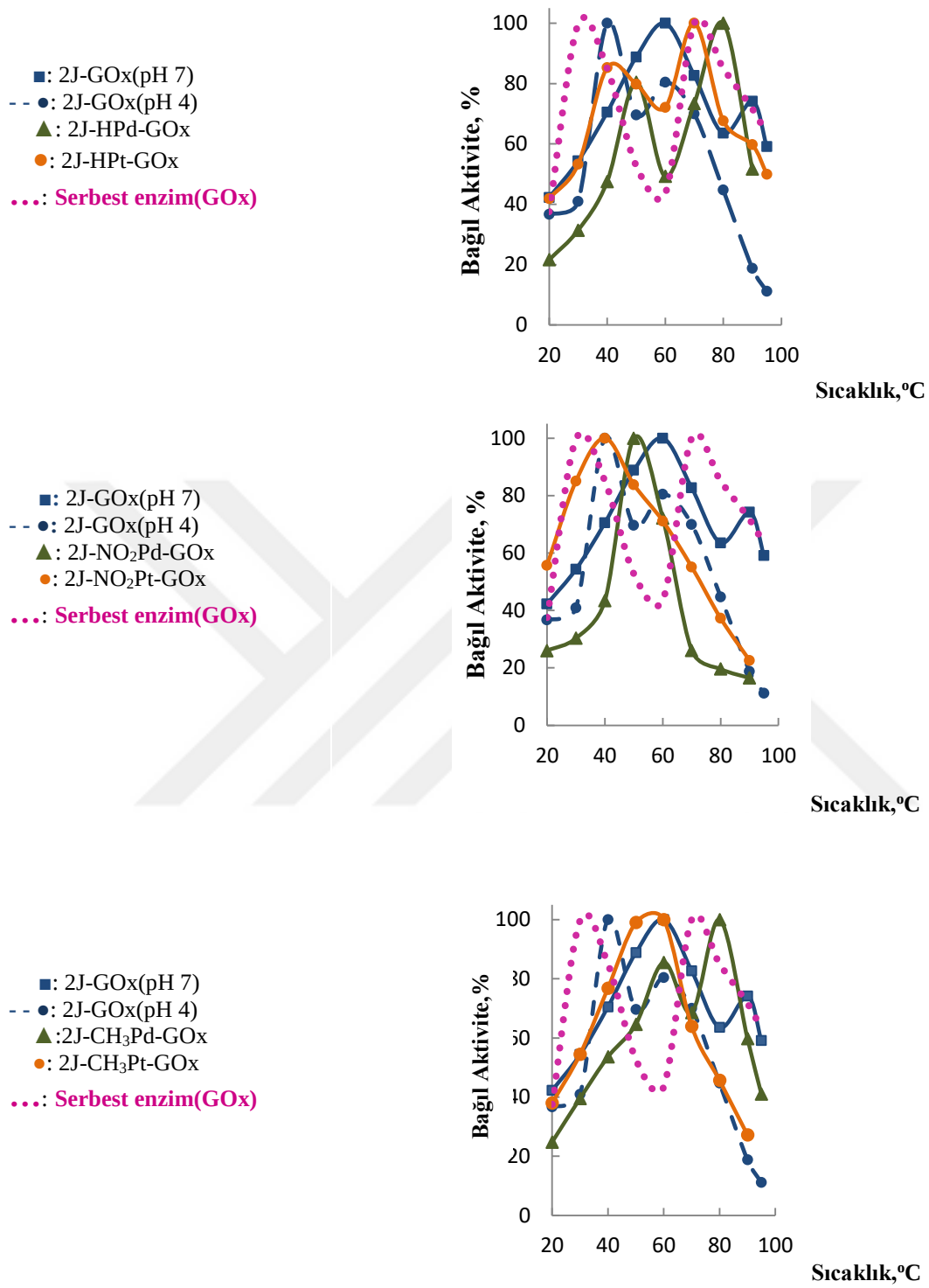
Şekil 5.14. İmmobilize olmuş 2J-GOx ile yapılan deneylerde ortamda gerçekleştiği düşünülen reaksiyonlar



Şekil 5.15. İmmobilize olmuş 2J-XM-GOx ile yapılan deneylerde ortamda gerçekleştiği düşünülen reaksiyonlar

5.2.2. Serbest ve immobilize edilen GOx enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi

Serbest ve destek materyale tutturulmuş GOx (β -glukoz oksidaz) enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi çalışmaları Bölüm 4.7.2’de belirtildiği gibi yapıldı. X ekseninde sıcaklık, y ekseninde ise bağıl aktivite değerlerine yer verilerek grafikler oluşturuldu. Her bir grafikte referans olarak serbest enzimin(pembe tireli çizgi) optimum sıcaklık değerlerine yer verildi ve sentezlenen yeni destek dendronların optimum sıcaklık değerleri ile karşılaştırma yapıldı. Deney sonucunda elde edilen veriler ile çizilen grafiklere Şekil 5.16.’da yer verilmiştir.



Şekil 5.16. Enzim (GOx) aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Şekilde görüldüğü gibi serbest enzimin pH 5'deki bağıl aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklık değerleri 30 ve 70 °C olarak belirlenirken, 2J-GOx iki jenerasyonlu dendronda ise bağıl aktivite pH 4'de 40 °C, pH7 60 °C'de maksimum göstermiştir. Genişletilmiş iki jenerasyonlu 2J-HPt dendronu için pH7'de 40 ve 70 °C, 2J-NO₂Pt dendronu için pH7'de 40 °C, 2J-CH₃Pt dendronu için pH5'de 60 °C, 2J-HPd dendronu için pH7'de 50 ve 80 °C,

2J-NO₂Pd dendronu için pH8'de 50 °C, 2J-CH₃Pd dendronu için pH6'da 60 ve 80 °C olarak belirlendi.

Optimum sıcaklık değerleri üzerine metal etkisini incelemek için genişletilmiş ikinci jenerasyon dendronların bağıl aktivite grafiklerine baktığımızda genelde farklı oldukları görüldü. Kompleks oluşumu ve metalin farklılaştırılması (Pd(II), Pt(II)) ile optimum sıcaklık değerlerinin değiştiği gözlemlendi. Genelde bu değişim Pd(II) metali içeren genişletilmiş dendronlarda Pt(II) metali içerenlere kıyasla daha yüksek sıcaklık değerleri gösterdi. Böylece GOx enziminin palladyum içeren desteklere immobilizasyonu sonucunda enzim bozulmadan daha yüksek sıcaklıklarda da aktivitesini korumayı başardı. Yüksek sıcaklıklardaki enzim uygulamalarında (Örnek: konserve yiyeceklerde ve içeceklerde oksijenin uzaklaştırılmasıyla renk ve tadın sabitlenmesi) Pd(II) metali içeren dendron desteklerin daha iyi sonuç vereceği kanaati getirildi. Ancak uygulama kolorimetrik diagnostik kitler (Kanda, serumda ve plazmada glukoz tayini) gibi düşük sıcaklıklarda yapılacaksa ikinci jenerasyon dendron yada Pt(II) metali içeren dendron desteklerin kullanılmasının daha avantajlı olacağı sonucuna varıldı.

Optimum sıcaklık değerleri üzerine süstitüent etkisini incelemek için genişletilmiş ikinci jenerasyon dendronların bağıl aktivite grafiklerine baktığımızda yine optimum değerlerde farklılıklar görüldü. -NO₂ grubu içeren dendronların bağıl aktivite grafiklerinde optimum sıcaklık değerlerinin en düşük olduğu görülürken, -CH₃ ve -H grubu içeren genişletilmiş ikinci jenerasyon dendronların optimum değerlerinin daha yüksek ve birbirine çok benzer olduğu görüldü. Dendronların optimum değerleri Çizelge 5.5'de topluca verildi.

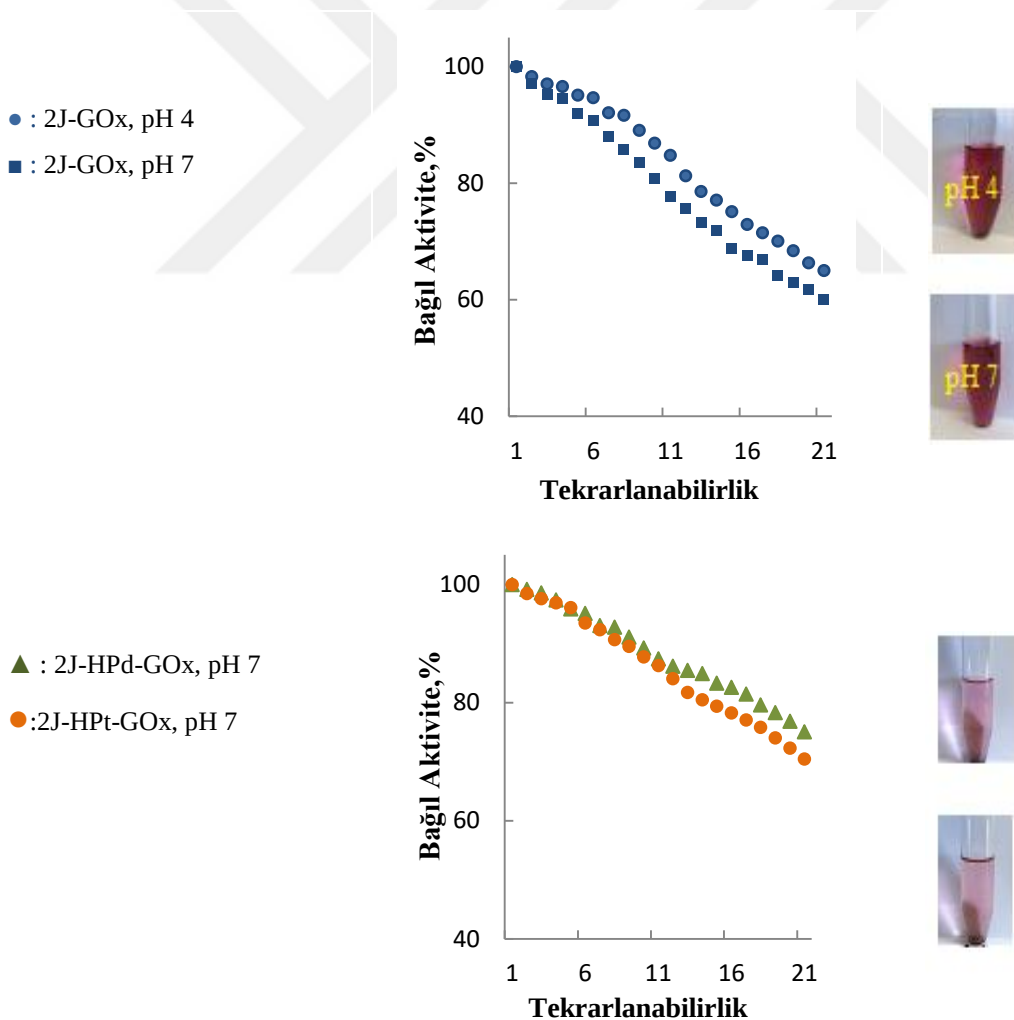
Çizelge 5.5. İmmobilize dendronlar için optimum pH, sıcaklık değerleri

İmmobilize Dendronlar	Optimum	
	pH	t (°C)
2J-GOx	4 7	40 60
2J-HPt-GOx	7	40 ve 70
2J-NO ₂ Pt-GOx	7	40
2J-CH ₃ Pt-GOx	5	60
2J-HPd-GOx	7	50 ve 80
2J-NO ₂ Pd-GOx	8	50
2J-CH ₃ Pd-GOx	6	60 ve 80
Serbest Enzim (GOx)	5	30 ve 70

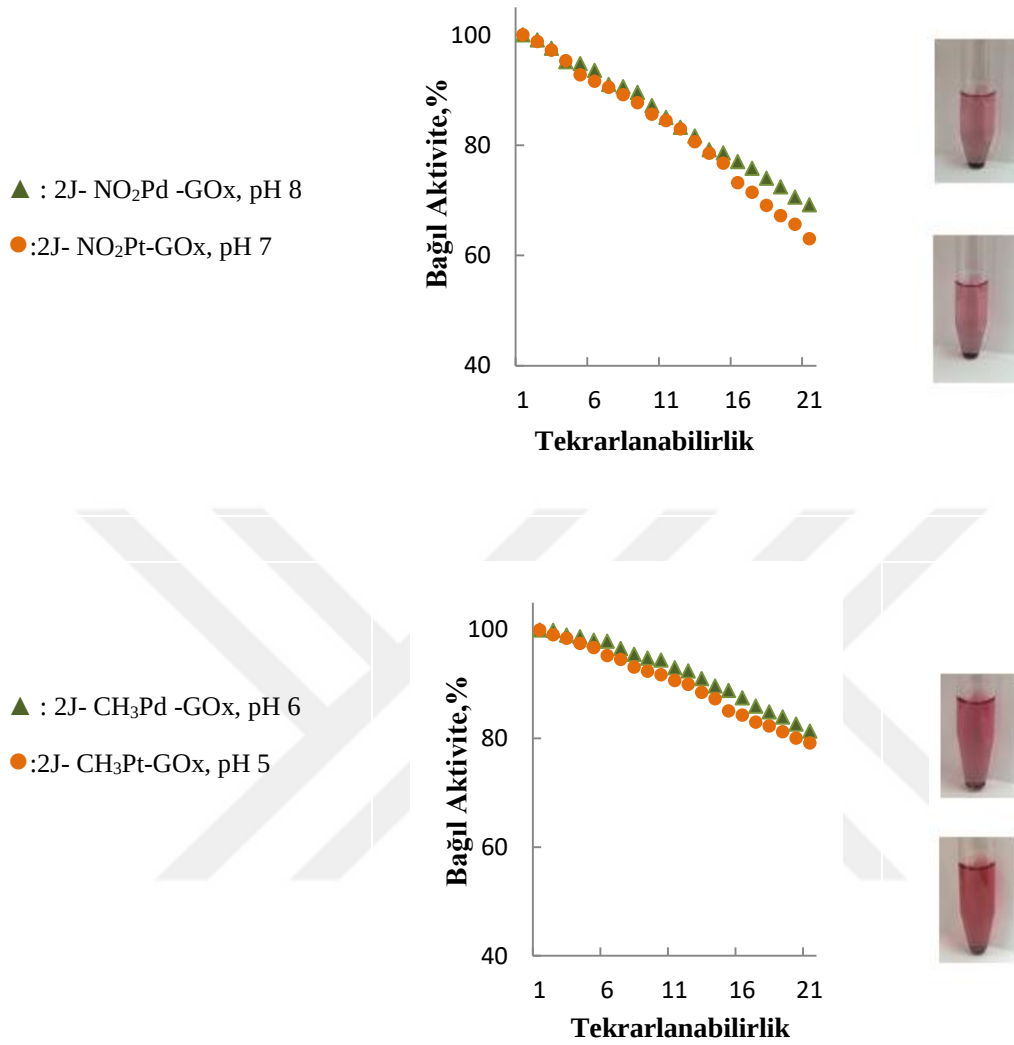
5.2.3. İmmobilize edilen β -Glukoz oksidaz enziminin tampon çözelti ve yapay idrar ortamında tekrarlanabilirliğinin tayini

Dendronlara immobilize edilen GOx (β -glukoz oksidaz) enziminin tekrar kullanılabilirliği çalışmaları Bölüm 4.7.3’de anlatıldığı şekilde yapıldı. X ekseninde tekrar kullanım sayısı, y ekseninde ise bağl aktivite değerlerine yer verilerek grafikler (Şekil 5.17) oluşturuldu.

Deney sonunda elde edilen verilere Çizelge 5.6’da yer verildi. Yirmi (20) tekrar sonunda immobilize 2J-GOx dendronu aktifliğinin pH4’de %64,97’sini korurken, pH7’de %60,09’unu koruyabilmiştir. Palladyum iyonu içeren immobilize dendronlar aktifliklerini yirmi tekrar sonunda yaklaşık %75, platin iyonu içeren immobilize dendronlar aktifliklerini %70 civarında koruyabilmişlerdir.



Şekil 5.17. Tampon çözelti ortamında immobilize (GOx) dendronlar için tekrarlanabilirlik grafikleri



Şekil 5.17. (devam) Tampon çözelti ortamında immobilize (GOx) dendronlar için tekrarlanabilirlik grafikleri

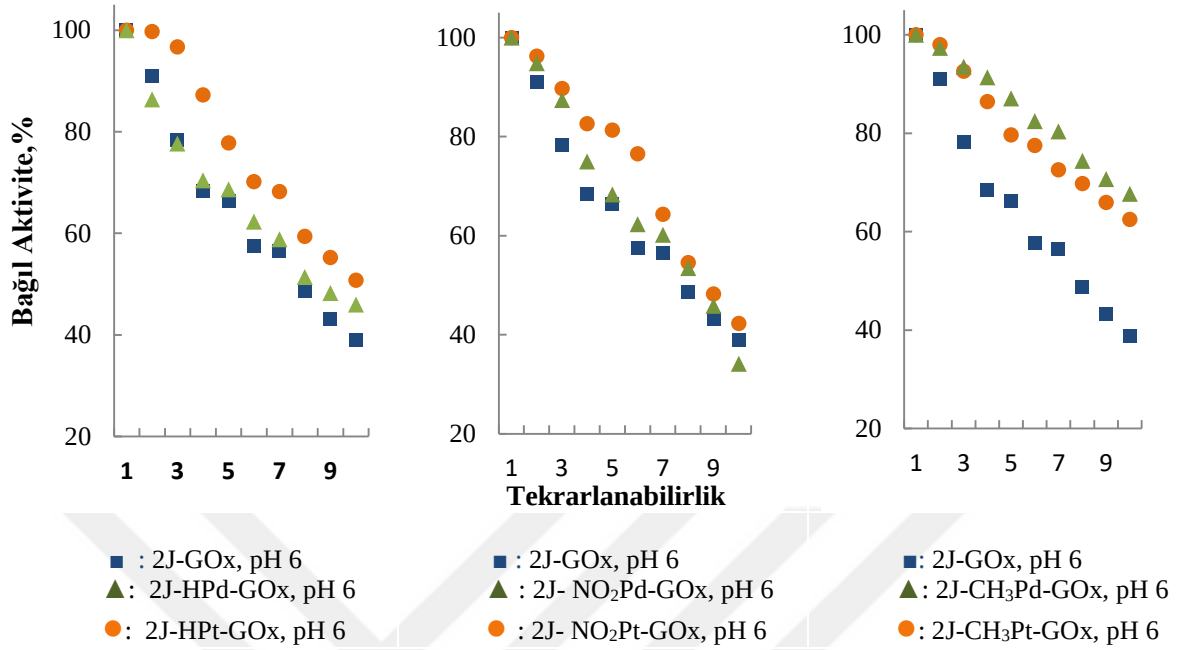
Yirmi ölçüm sonunda kalan % aktiflik değerleri üzerine sübstitüent ve metal etkisini incelemek için dendronların bağl aktivite grafiklerine bakıldığında genelde farklı olmadıkları görüldü. Kompleks oluşumu ve metalin farklılaştırılması (Pd(II), Pt(II)) ile geriye kalan % aktiflik değerleri kıyaslandığında, Pd(II) metali içeren genişletilmiş dendronların değerlerinin az da olsa daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Çizelge 5.6. İmmobilize dendronların tampon çözelti ortamında tekrarlanabilirlik %aktivite değerleri

Dendron	Optimum pH	Kullanım Sayısı		
		5.	9.	20.
2J-GOx	4	94,64	89,07	64,97
2J-GOx	7	90,73	83,56	60,09
2J-HPt-GOx	7	93,48	89,49	70,45
2J-NO ₂ Pt-GOx	7	91,60	87,73	63,03
2J-CH ₃ Pt-GOx	5	95,25	92,36	79,17
2J-HPd-GOx	7	95,12	91,08	75,07
2J-NO ₂ Pd-GOx	8	93,55	89,58	69,17
2J-CH ₃ Pd-GOx	6	96,51	94,77	81,35

Tekrar kullanılabilirlik değerinin farklı bir ortamda değişip değişmediğini belirlemek için yapay idrar çözeltisi kullanılmıştır. Çünkü β -glukoz oksidaz enzimi idrardaki şeker (glukoz) tayininde kullanılan bir enzimdir. Bu nedenle yapay idrar çözeltisi içerisinde 30 dk aryla on (10) tekrar yapılmıştır.

Dendronlara immobilize edilen GOx (β -glukoz oksidaz) enziminin yapay idrar çözeltisinde tekrar kullanım sayısının belirlenmesi çalışmaları Bölüm 4.7.3'de anlatıldığı şekilde yapıldı. X ekseninde tekrar kullanım sayısı, y ekseninde ise bağıl aktivite değerlerine yer verilerek grafikler (Şekil 5.18) oluşturuldu. Deney sonucunda elde edilen verilere Çizelge 5.7'de yer verildi.



Şekil 5.18. Yapay idrar ortamında immobilize (GOx) dendronlar için tekrarlanabilirlik grafikleri

On (10) tekrar sonunda immobilize 2J-GOx dendronu aktifliğinin %38,9'unu korurken, palladyum iyonu içeren immobilize dendronlar aktifliklerini %34,16- 67,7 civarında, platin iyonu içeren immobilize dendronlar ise aktifliklerini %42,29-62,49 aralığında korudukları görülmüştür.

On (10) tekrar sonunda kalan %aktiflik değerleri üzerine sübstitüent ve metal etkisini incelemek için dendronların bağlı aktivite grafiklerine baktığımızda aktifliğinde en çok koruyabilen dendronların yapılarında -CH₃ grubu bulunanlar oldukları görüldü. Kompleks oluşumu ile geriye kalan % aktiflik değerlerindeki düşüşün yavaşladığı gözlenmiştir. Bu da enzim ile metal içerikli dendronların etkileşiminin daha kuvvetli ve daha fazla noktadan yapıldığının bir kanıtı olmuştur.

Çizelge 5.7. İmmobilize dendronların yapay idrar ortamında tekrarlanabilirlik % aktiflik değerleri

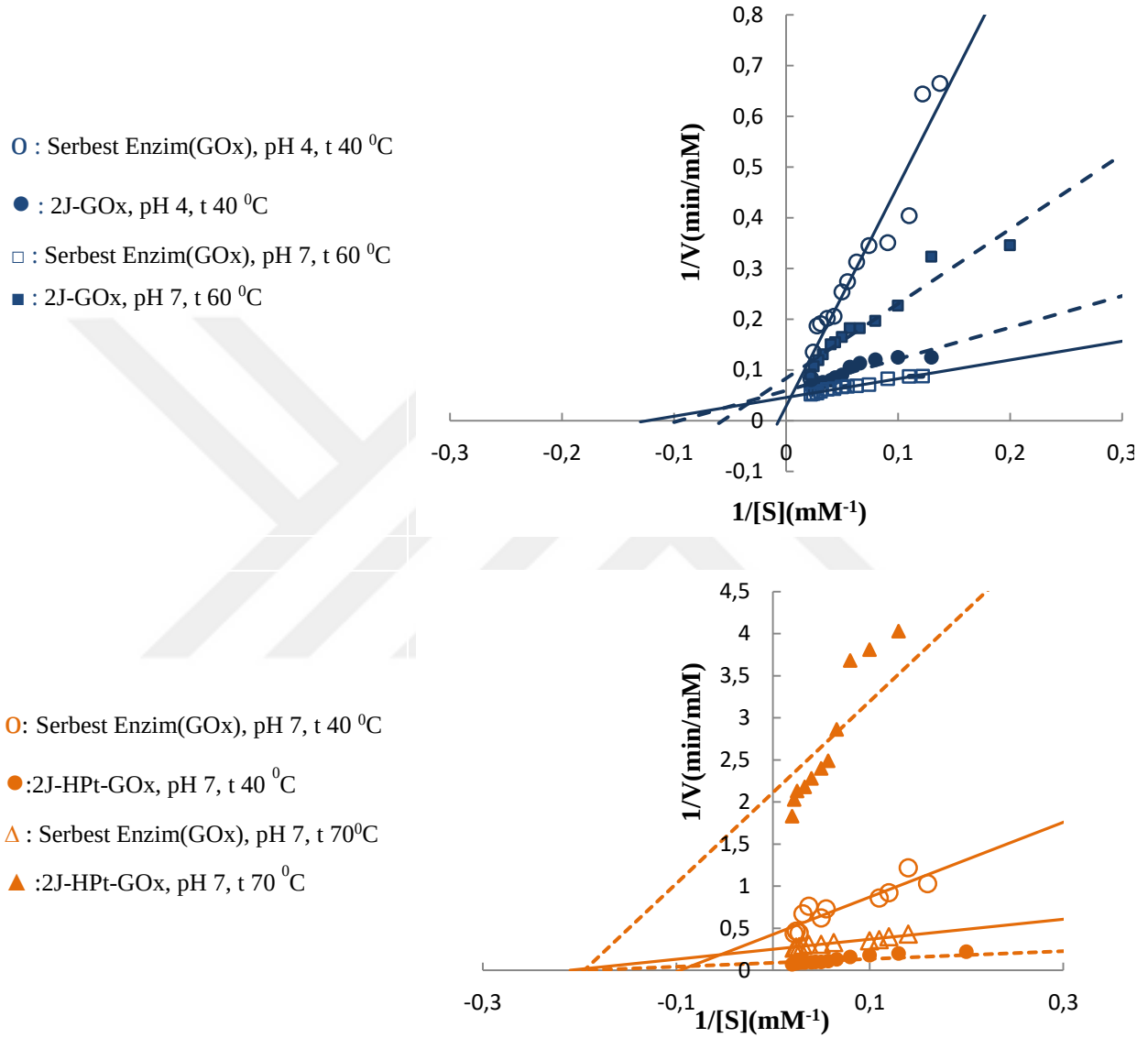
Dendron	Optimum pH	Kullanım Sayısı	
		5.	9.
2J-GOx	6	57,58	38,9
2J-HPt-GOx	6	70,15	50,76
2J-NO ₂ Pt-GOx	6	76,52	42,29
2J-CH ₃ Pt-GOx	6	77,49	62,49
2J-HPd-GOx	6	62,28	46,00
2J-NO ₂ Pd-GOx	6	62,34	34,16
2J-CH ₃ Pd-GOx	6	82,43	67,70

Çalışılan her iki ortamda da tekrarlanabilirlik sonuçlarını kıyasladığımızda; sulu ortamda on (10) tekrar sonunda immobilize dendronların %bağıl aktiviteleri ortalama %85'i gösterirken, yapay idrar çözeltisi ortamında bu değer ortalama %55'lere kadar düşmüştür. Tekrarlanabilirlik üzerine yapılan bu çalışmada çözücü ortamı değiştirildiğinde kullanım sayılarında azalmalar olsa da, desteklerimizin farklı ortamlarda da kullanılabilir olduğunu görmüş olduk.

5.2.4. Serbest ve immobilize edilen GOx enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Serbest ve destek materyale tutturulmuş GOx (β -glukoz oksidaz) enziminin aktifliğine derişimin etkisini incelemek için; her destek materyal için belirlenen optimum şartlarda, farklı derişimlerde hazırlanan substrat çözeltilerinde absorbans değerleri belirlendi. Bölüm 4.7.4'de belirtilen işlemler uygulanarak bağıl aktiflik tayinleri yapıldı. X ekseninde $1/S$, y ekseninde ise $1/V$ değerlerine yer verilerek *Lineaweaver-Burk* kalibrasyon grafikleri (Şekil 5.19) oluşturuldu. Her bir grafikte referans olarak serbest enzimin (tam çizgi) değerlerine

yer verildi ve sentezlenen yeni destek dendronların değerleri ile karşılaştırma yapıldı. Lineaweaver-Burk kalibrasyon grafiklerinden yararlanarak K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı ve Çizelge 5.8’de verildi.



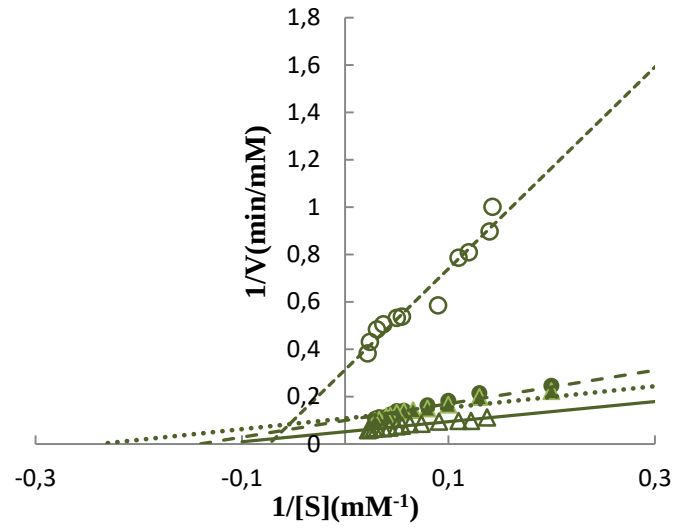
Şekil 5.19. İmmobilize (GOx) dendronlar için *Lineaweaver-Burk* kalibrasyon grafikleri

O: Serbest Enzim(GOx), pH 7, t 50 °C

●:2J-HPd-GOx, pH 7, t 50 °C

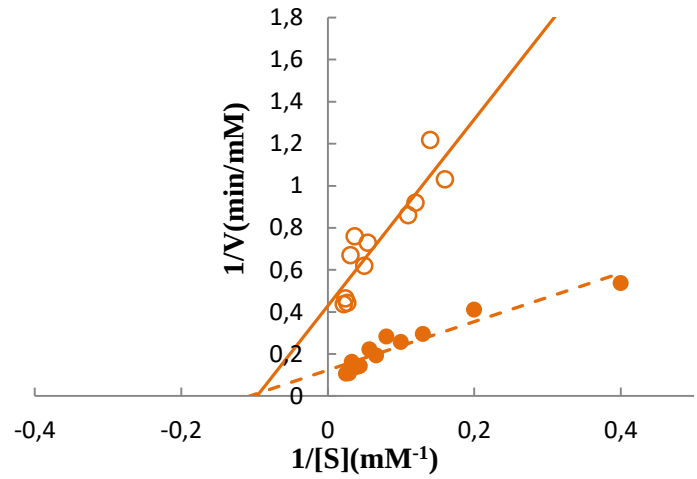
△ : Serbest Enzim(GOx), pH 7, t 80°C

▲:2J-HPd-GOx, pH 7, t 80 °C



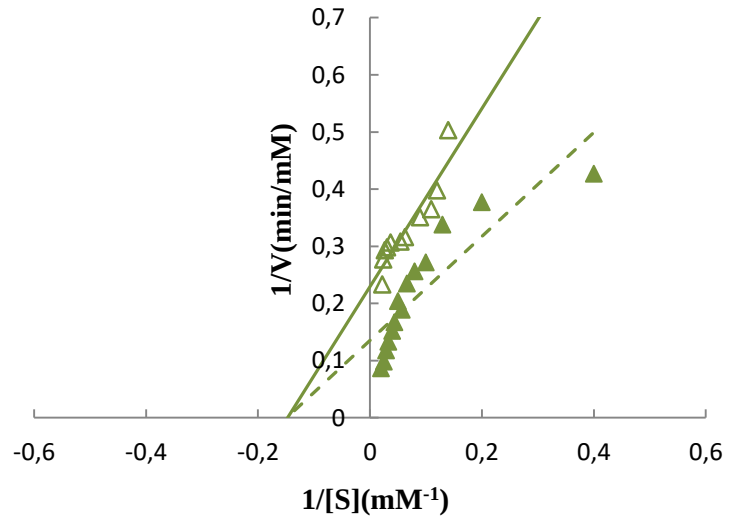
○: Serbest Enzim(GOx), pH 7, t 40 °C

●:2J-NO₂Pt-GOx, pH 7, t 40 °C



△ : Serbest Enzim(GOx), pH 8, t 50°C

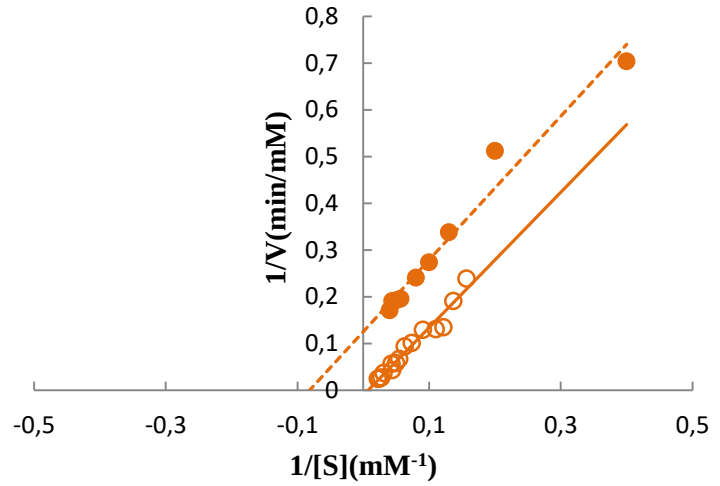
▲ :2J- NO₂Pd -GOx, pH 8, t 50 °C



Şekil 5.19. (devam) İmmobilize (GOx) dendronlar için *Lineaweaver-Burk* kalibrasyon grafikleri

O: Serbest Enzim(GOx), pH 5, t 60 °C

●:2J-CH₃Pt-GOx, pH 5, t 60 °C

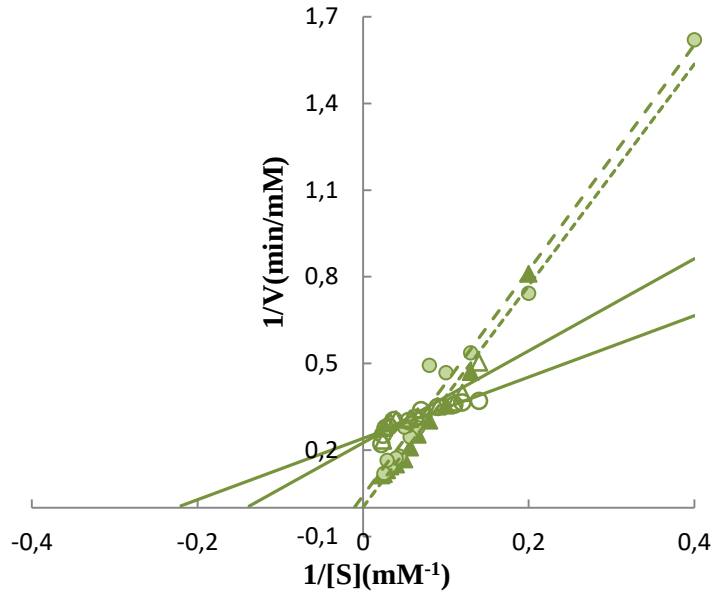


O: Serbest Enzim(GOx), pH 6, t 60 °C

●:2J- CH₃Pd-GOx, pH 6, t 60 °C

△ : Serbest Enzim(GOx), pH 6, t 80 °C

▲:2J- CH₃Pd-GOx, pH 6, t 80 °C



Şekil 5.19. (devam) İmmobilize (GOx) dendronlar için *Lineaweaver-Burk* kalibrasyon grafikleri

K_m , enzimler için bir parmak izi olup enzimin substratına karşı ilgisini ifade eden bir parametredir. Bu parametre değerinin küçük olması enzimin substrata karşı ilgisinin yüksek olduğu anlamını taşır. V_{mak} ise enzimin aktif bölgelerinin substrat ile tam doygunluğa geçince ulaştığı yani katalizin ulaşabileceği en yüksek hız değeridir.

Lineaweaver-Burk kalibrasyon grafiklerinden elde edilen kinetik parametre değerlerine baktığımızda, immobilizasyonla bu değerlerin değiştiği gözlenmiştir. 2J-GOx dendronunun pH4, 40°C'deki değerlerini ($K_m=10,49$, $V_{mak}=16,86$) serbest GOx değerleri ($K_m=157,81$, $V_{mak}=36,23$) ile kıyasladığımızda K_m değerinin immobilize dendronda daha küçük

olduğu yani substrata olan ilginin serbest enzimden daha fazla olduğu gözlenmiştir. Ancak hız açısından serbest enzimin gerisinde kalmıştır.

2J-GOx dendronunun pH7, 60°C'deki değerlerini ($K_m=28,79$, $V_{mak}=15,53$) serbest GOx değerleri ($K_m=8,08$, $V_{mak}=21,83$) ile kıyasladığımızda K_m değerinin immobilize dendronda daha büyük olduğu yani substrata olan ilginin serbest enzimden daha az olduğu gözlenmiştir. Hız açısından pH7, 60°C'de de serbest enzimin gerisinde kaldığı görülmüştür.

2J-HPt-GOx dendronunun pH7, 40°C'deki değerlerini ($K_m=5,14$, $V_{mak}=11,5$) serbest GOx değerleri ($K_m=10,42$, $V_{mak}=2,33$) ile kıyasladığımızda K_m değerinin immobilize dendronda daha küçük olduğu yani substrata olan ilginin serbest enzimden daha fazla olduğu ayrıca hız açısından da serbest enzime üstünlük sağlamıştır.

2J-HPt-GOx dendronunun pH7, 70°C'deki değerlerini ($K_m=5,12$, $V_{mak}=0,47$) serbest GOx değerleri ($K_m=4,75$, $V_{mak}=4,00$) ile kıyasladığımızda K_m değerinin immobilize dendronda daha büyük olduğu yani substrata olan ilginin serbest enzimden daha az olduğu, hız olarak ise serbest enzime göre yavaş olduğu görülmüştür.

2J-NO₂Pt-GOx dendronunun pH7, 40°C'deki değerlerini ($K_m=9,60$, $V_{mak}=8,27$) serbest GOx değerleri ($K_m=10,42$, $V_{mak}=2,33$) ile kıyasladığımızda K_m değerlerinin birbirlerine çok yakın olduğu görülürken, hız açısından serbest enzime üstünlük sağlamıştır.

2J-CH₃Pt-GOx dendronunun pH5, 60°C'deki değerlerini ($K_m=122,62$, $V_{mak}=79,80$) serbest GOx değerleri ($K_m=138,06$, $V_{mak}=111,11$) ile kıyasladığımızda K_m değerlerinin birbirlerine yakın olduğu görülürken, hız açısından serbest enzimin gerisinde kaldığı görülmüştür.

2J-HPd-GOx dendronunun pH7, 50°C'deki değerlerini ($K_m=7,14$, $V_{mak}=10,10$) serbest GOx değerleri ($K_m=13,60$, $V_{mak}=3,19$) ile kıyasladığımızda K_m değerinin immobilize dendronda daha küçük olduğu yani substrata olan ilginin serbest enzimden daha fazla olduğu ayrıca hız açısından da serbest enzimden daha iyi olduğu görülmüştür.

2J-HPd-GOx dendronunun pH7, 80°C'deki değerlerini ($K_m=4,22$, $V_{mak}=9,30$) serbest GOx değerleri ($K_m=8,21$, $V_{mak}=19,34$) ile kıyasladığımızda K_m değerinin immobilize

dendronunda daha küçük olduğu yani substrata olan ilginin serbest enzimden daha fazla olduğu ancak hız açısından serbest enzimin gerisinde kaldığı görülmüştür.

2J-NO₂Pd-GOx dendronunun pH8, 50°C'deki değerlerini ($K_m=6,73$, $V_{mak}=7,40$) serbest GOx değerleri ($K_m=6,78$, $V_{mak}=4,35$) ile kıyasladığımızda K_m değerlerinin birbirlerine çok yakın olduğu görülürken, hız açısından serbest enzimden daha hızlı olduğu görülmüştür.

2J-CH₃Pd-GOx dendronunun gerek pH6, 60°C'deki değerlerini ($K_m=92,19$, $V_{mak}=23,64$) serbest GOx değerleri ($K_m=4,40$, $V_{mak}=4,15$) ile kıyasladığımızda K_m değerinin immobilize dendronunda çok büyük olduğu yani substrata olan ilginin serbest enzimden çok az olduğu görülürken, bu desteğin hız açısından bir iyileşme yaptığı görülmüştür. Aynı desteğin pH6, 80°C'deki değerlerini ($K_m=60,33$, $V_{mak}=11,29$) serbest GOx değerleri ($K_m=7,07$, $V_{mak}=4,44$) ile kıyasladığımızda yine substrata olan ilgi serbest enzimde fazla iken hız immobilize destekte daha fazla olmuştur.

K_m ve V_{mak} değerleri üzerine metal (Pd(II), Pt(II)) etkisini incelediğimizde, palladyum içeren desteklerin platin içerenlere oranla K_m değerlerinin daha düşük yani enzime olan ilgilerinin yüksek olduğu görülmüştür. Hız değerleri kıyaslandığında ise metal farklılaştırılmasının dikkate değer bir iyileşme yapmadığı görülmüştür.

K_m ve V_{mak} değerleri üzerine süstitüe grupların etkisini incelediğimizde ise elektron sağlayan -CH₃ grubu içeren dendronların substrata olan ilgilerinin en az olmalarına rağmen hız açısından en iyi iyileşmeyi yaptıkları görülmüştür.

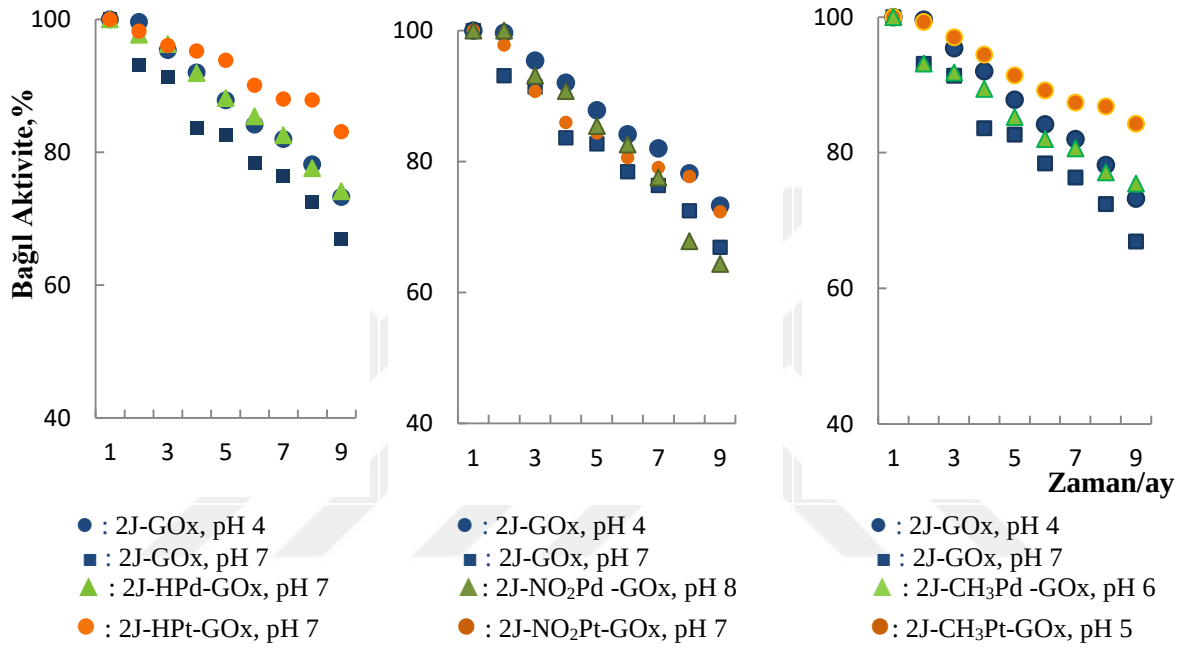
-H ve -NO₂ gruplarının ise K_m ve V_{mak} değerlerinde benzerlik görülmüş ve substrata olan ilgilerinin yüksek, hızlarının ise düşük oldukları görülmüştür. Bu desteklerdeki -H ve -NO₂ gruplarının K_m değerlerinde iyileşme yaptığı değerleri düşürdüğü görülmüştür. -NO₂ grubunun enzim ile hidrojen bağı ile bağlanması bu düşüşe yani ilginin artmasına neden olmuştur.

Çizelge 5.8. Dendronlar için kinetik parametre değerleri

Dendronlar	Optimum pH	Optimum Sıcaklık	K _m (mM)	V _{mak} mM.dk ⁻¹
2J-GOx	4	40°C	10,49	16,86
<i>Serbest Enzim</i>			157,81	36,23
2J-GOx	7	60°C	28,79	15,53
<i>Serbest Enzim</i>			8,08	21,83
2J-HPt-GOx	7	40°C	5,14	11,5
<i>Serbest Enzim</i>			10,42	2,33
2J-HPt-GOx	7	70°C	5,12	0,47
<i>Serbest Enzim</i>			4,75	4,00
2J-NO ₂ Pt-GOx	7	40°C	9,60	8,27
<i>Serbest Enzim</i>			10,42	2,33
2J-CH ₃ Pt-GOx	5	60°C	122,62	79,80
<i>Serbest Enzim</i>			138,06	111,11
2J-HPd-GOx	7	50°C	7,14	10,10
<i>Serbest Enzim</i>			13,60	3,19
2J-HPd-GOx	7	80°C	4,22	9,30
<i>Serbest Enzim</i>			8,21	19,34
2J-NO ₂ Pd-GOx	8	50°C	6,73	7,40
<i>Serbest Enzim</i>			6,78	4,35
2J-CH ₃ Pd-GOx	6	60°C	92,19	23,64
<i>Serbest Enzim</i>			4,40	4,15
2J-CH ₃ Pd-GOx	6	80°C	60,33	11,29
<i>Serbest Enzim</i>			7,07	4,44

5.2.5. İmmobilize edilen GOx enziminin depolama kararlılığı

Dendronlara immobilize edilen GOx (β -glukoz oksidaz) enziminin depolama kararlılığı çalışmaları Bölüm 4.7.5’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. İmmobilize dendronların depolama kararlılığına ait grafikler Şekil 5.20’de verildi.



Şekil 5.20. GOx immobilize edilmiş dendronlar için depolama kararlılığı grafikleri

Depolama kararlılığı enzimin saklama koşullarına bağlı bir parametredir. GOx immobilize edilmiş dendronlar için depolama kararlılığı grafikleri incelendiğinde depolama kararlılık aktivitelerinin ilk dokuz ay yüksek olduğu, dokuzuncu aydan sonra bağıl aktivitelerinde belirgin düşüşün (Çizelge 5.9) olduğu görüldü. Tüm veriler kıyaslandığında genellikle Pt²⁺ iyonu içeren dendronların aktifliklerini uzun süre koruyabildikleri belirlendi. Bunun nedeni enzimlerin Pt²⁺ iyonu içeren desteklerle daha kuvvetli etkileşim içinde bulunmasından kaynaklanabilir. Ayrıca immobilize enzimin konformasyonel kararlılığının daha iyi olduğu söylenebilir.

Çizelge 5.9. İmmobilize (GOx) dendronların 12 aylık depolama değerleri

Zaman(ay) Dendron	2.ay	4.ay	6.ay	8.ay	10.ay	12.ay
2J-GOx pH4	99,62	92,00	84,16	78,19	73,25	60,02
2J-GOx pH7	93,11	83,59	78,41	72,43	66,89	52,33
2J-HPd-GOx pH7	97,70	91,92	85,44	77,61	74,15	55,25
2J-HPt-GOx pH7	98,24	95,23	90,11	87,86	83,09	62,18
2J-CH ₃ Pd-GOx pH6	93,16	89,42	82,00	77,10	75,46	52,49
2J-CH ₃ Pt-GOx pH5	99,30	94,46	89,16	86,82	76,40	57,02
2J-NO ₂ Pd-GOx pH8	99,96	90,74	82,59	67,81	64,36	44,21
2J-NO ₂ Pt-GOx pH7	97,79	85,93	80,57	77,69	72,33	48,30

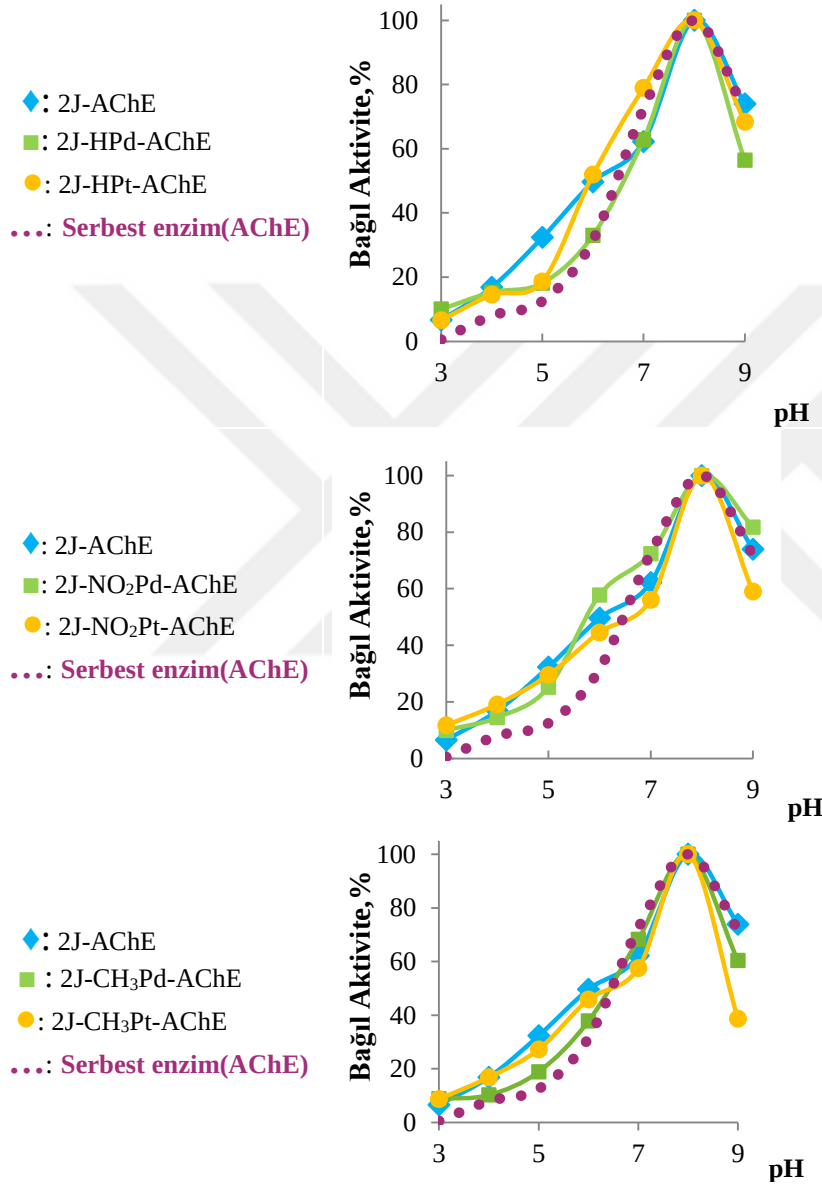
5.3. Asetilkolin Esteraz Enziminin (AChE) Optimizasyon Çalışmaları

Asetilkolin esteraz enziminin (AChE) immobilizasyonu Bölüm 4.8’de ayrıntılı bir şekilde verilmektedir. Bu bölümde serbest ve immobilize enzimlerin optimizasyon değerleri (pH, sıcaklık), substrat derişimi yönünden yapılan çalışmalar sonunda elde edilen kinetik parametreler verilecektir.

5.3.1. Serbest ve immobilize edilen AChE enziminin aktifliğine pH etkisi

Serbest ve destek materyale tutturulmuş AChE (Asetilkolin esteraz) enziminin aktifliğine pH etkisinin incelenmesi çalışmaları Bölüm 4.8.1’de ayrıntılı bir şekilde verildi. X ekseninde pH, y ekseninde ise bağıl aktivite değerlerine yer verilerek grafikler oluşturuldu. Her bir grafikte referans olarak serbest enzimin (mor tireli çizgi) optimum değerlerine yer

verildi ve sentezlenen yeni destek dendronların optimum pH değerleri ile karşılaştırma yapıldı. Deney sonucunda elde edilen veriler ile çizilen grafikler Şekil 5.21’de yer almaktadır.



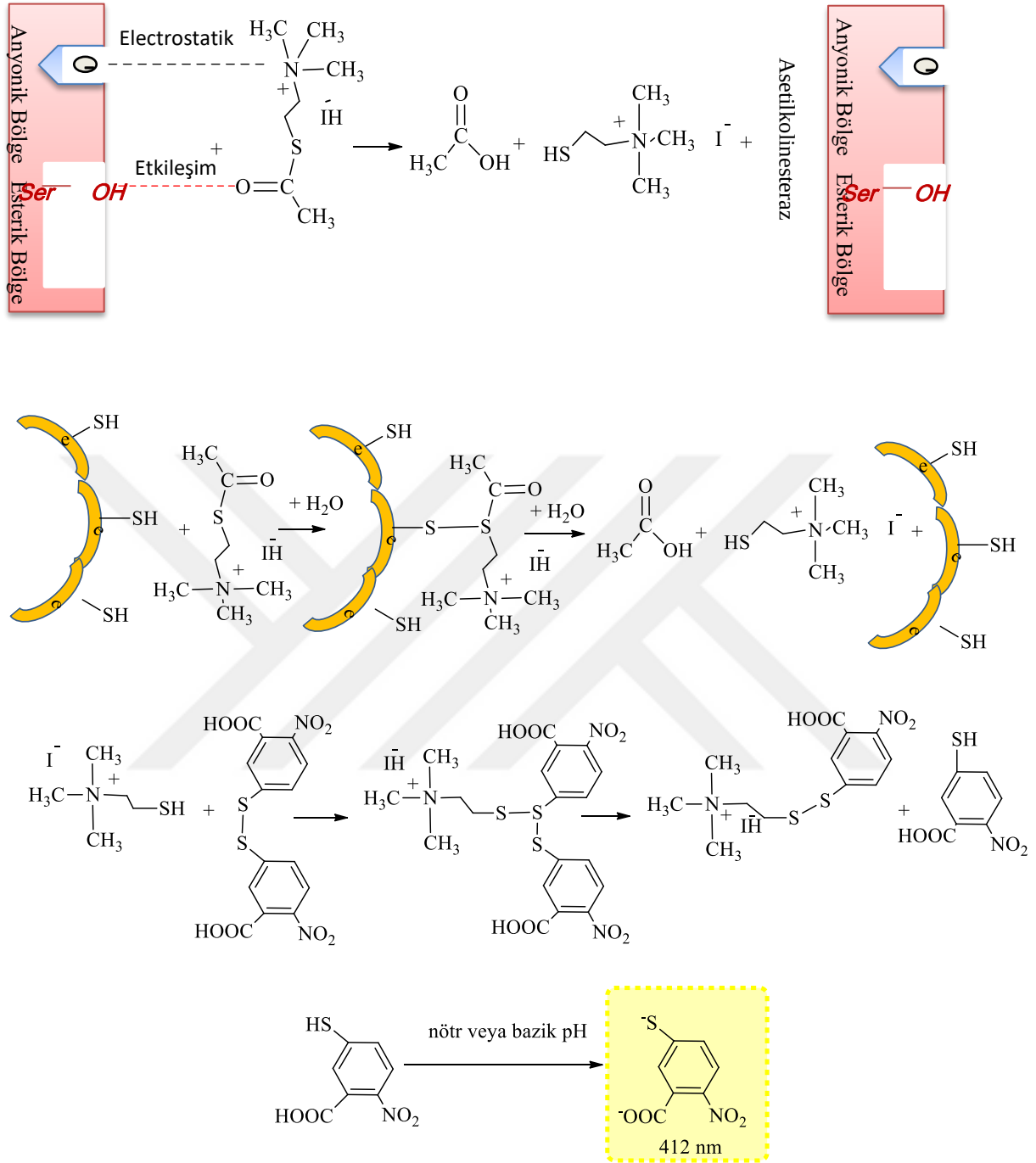
Şekil 5.21. Enzim (AChE) aktivitesi üzerine pH etkisi

Şekilde görüldüğü gibi hem serbest enzimin hem de immobilize desteklerin bağlı aktivitesinin en yüksek olduğu pH değeri 8’dir. Bunun anlamı hem dendronların hemde (Pd(II), Pt(II)) metali içeren dendronların optimum pH değerleri üzerinde değişiklik oluşturmadığı gibi yapıdaki farklı sübstitüentlerin (-H, -CH₃ ve -NO₂) varlığı da değişikliği oluşturmamıştır.

Kaynak araştırmasına göre AChE enziminin aktif bölge oyuğunda beş alt bölge vardır [158,159]. Bunlar; 1. Periferik Anyonik Bölge: Aktif Bölge oyuğunun ağzında olup Tyr70, Trp121, ve Trp279'dan meydana gelir. Ligandlar ilk bu bölgeye bağlanırlar, sonrasında aktif merkeze yönlendirilirler [160,161]. 2. Kolin Bağlama Bölgesi: Bu bölgede bulunan Trp 84 ve Phe 330 kalıntılarının elektronca zengin aromatik halkaları, substrat ve inhibitörlerin katyonik ucu ile katyon- Π etkileşimi oluştururlar. 3. Oksi-Anyon Deliği: Gly 118, Gly 119 ve Ala 201 kalıntılarını içerir. Bu bölgede geçiş durumları stabilize edilir ve aktivasyon enerji bariyeri azaltılır. Substrat dikey pozisyonundan yatay pozisyona döndürülerek katalitik Ser200'ün etkisine girmesi sağlanır[162]. 4. Açıl Bağlama Cebi: Substrat yatay olarak döndürüldüğünde substratın açıl kısmı açıl bağlama cebine bağlanır. Burada Phe 288 ve Phe 290'nin fenil halkaları, bağlı substratın hareketini kısıtlar ve ACh gibi kısa açıl grubu içeren substratların katalizini hızlandırır [161,163]. 5. Katalitik Triad (Esterik Bölge): OAD ve açıl bağlama cebiyle yaptığı etkileşimler sonucu kararlı hale gelen substrat aktif merkezin esterik bölgesinde yer alan ve katalitik üçlünün (Ser-200, His-440 ve Glu-327) etkisine girer. Burası bir yük dağıtım sistemi olup, ilk aşamada Ser200'ün $-OH$ grubundan His 440-Glu327 ikilisi yönünde proton aktarımı sonucunda Ser200 nükleofilik özellik kazanır. Ser200 oksijeninin substrat asetilkoline atağı sonucunda açıl-enzim ara yapısı oluşur. Devamında elektron dağılımının ters dönmesi ile bu ara yapıdan alkolün uzaklaştırılması gerçekleştirilir. Yan ürün olan karboksilik asidin açığa çıkması ve son olarak Ser200'ün His 440'den bir proton alarak serbest kalması sonucunda atık enzim başlangıç durumuna döner [162,164].

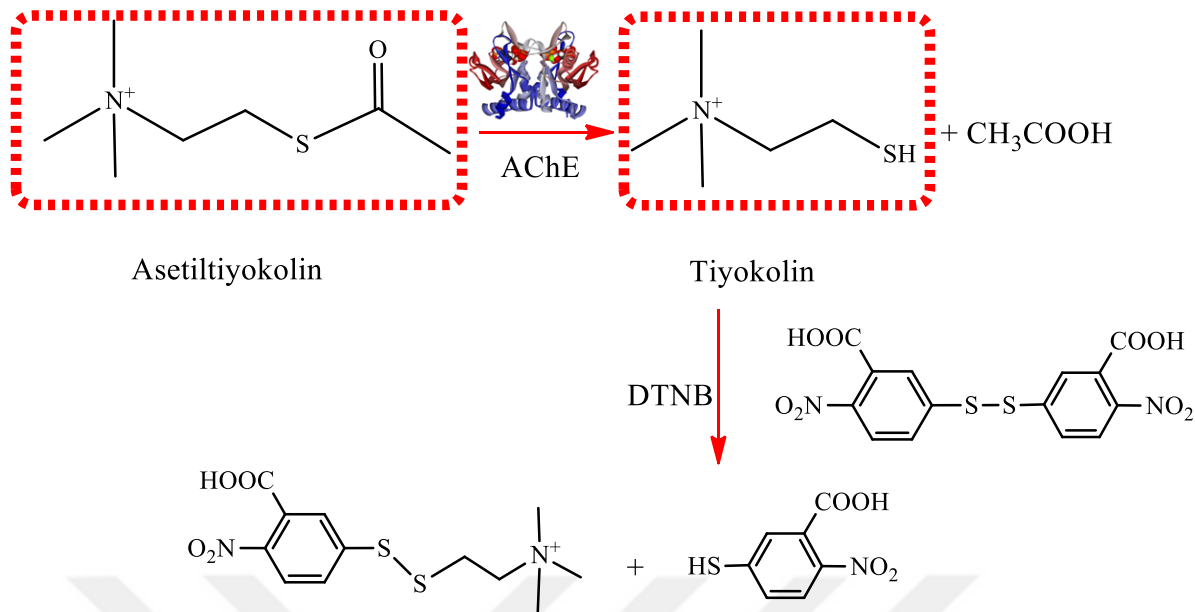
Bu bilgiler ışığında hazırlanan yeni dendronlara immobilize olan Asetilkolinesterazın kataliz reaksiyonlarında önemli amino asit yan zincirinin rol oynadığı ve her birinin ayrı görevlerde aktif rol aldığı ancak hangi aktif grubun dendronlarla nasıl etkileştiğini birebir söyleyebilmek için MOE yazılımı aracılığıyla enzimin aktif oyuğunda gerçekleşen reaksiyonlar incelenerek söylenebilir.

Bu çalışmada enzimin immobilizasyonun, Asetilkolin esterazın (AChE) esterik bölgesinde bulunan aktif olan amino asit yan zincirlerinin yapısındaki $-NH_2$ veya $-COOH$ gruplarının, dendronların yapısında bulunan $-CH=N-$ (imin) azot atomu arasında hidrojen bağı oluşturarak yapıldığı sonucuna varıldı.



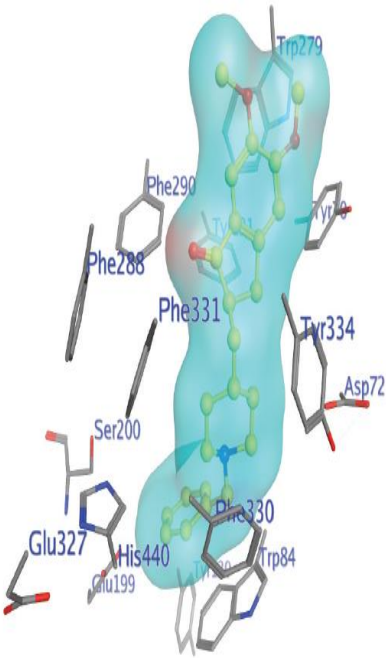
Şekil 5.22. AChE enziminin katalitik aktivitesinin belirlenme mekanizması

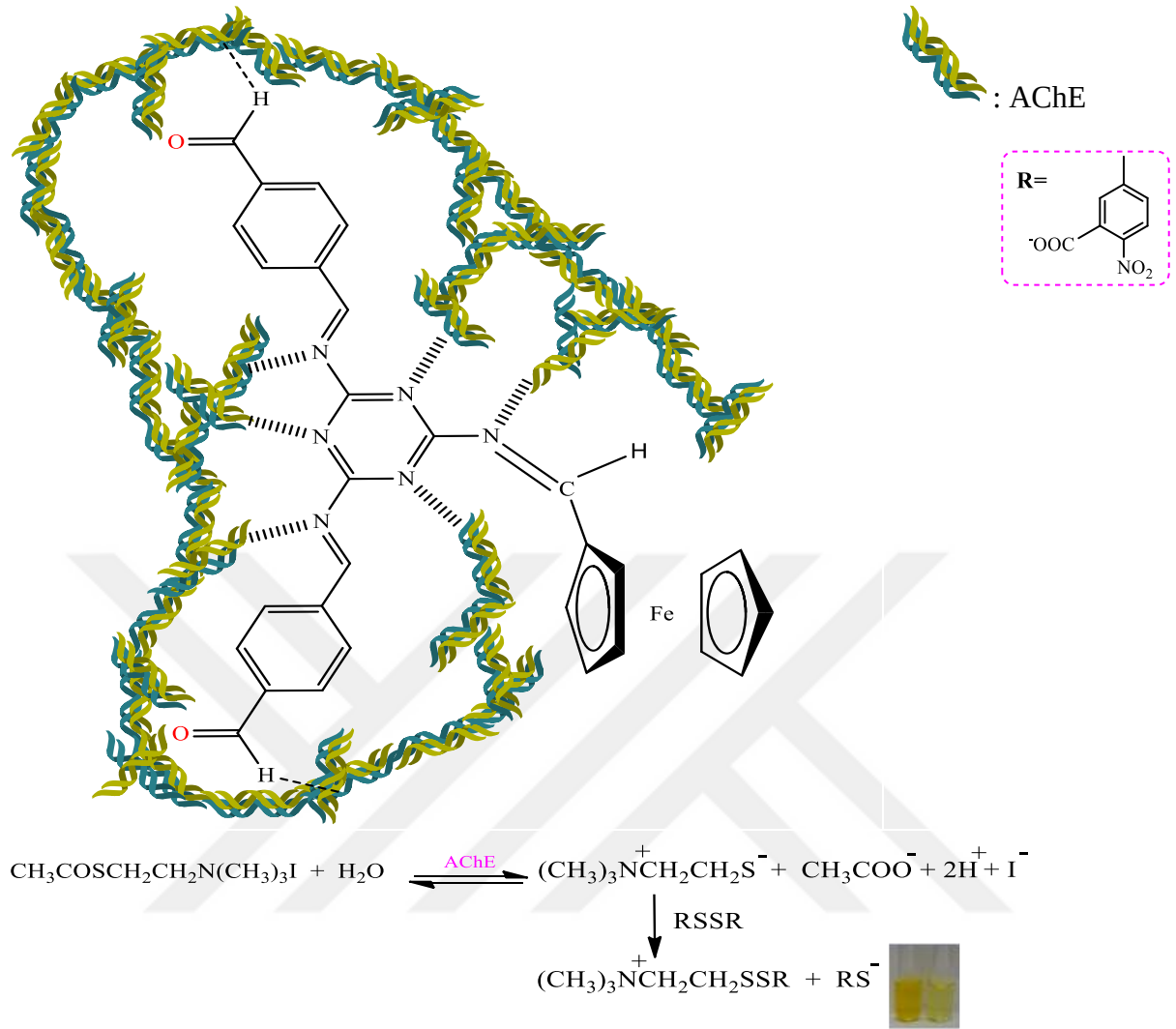
Enzim ve dendronlar arasındaki etkileşimin Şekil 5.24 ve 5.25'deki gibi olduğu ön görüldü. Modifiye edilen dendronların yapısında bulunan ferrosenin katkısı ile oluşan elektron alışverişi sayesinde asetiltiyokolinin (substrat), tiyokoline yükseltgenme olayı gerçekleşmiş oldu.



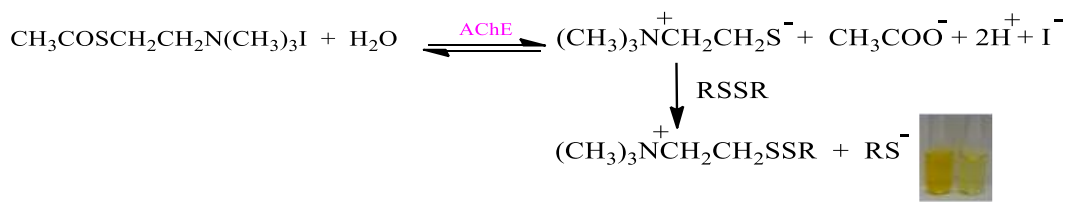
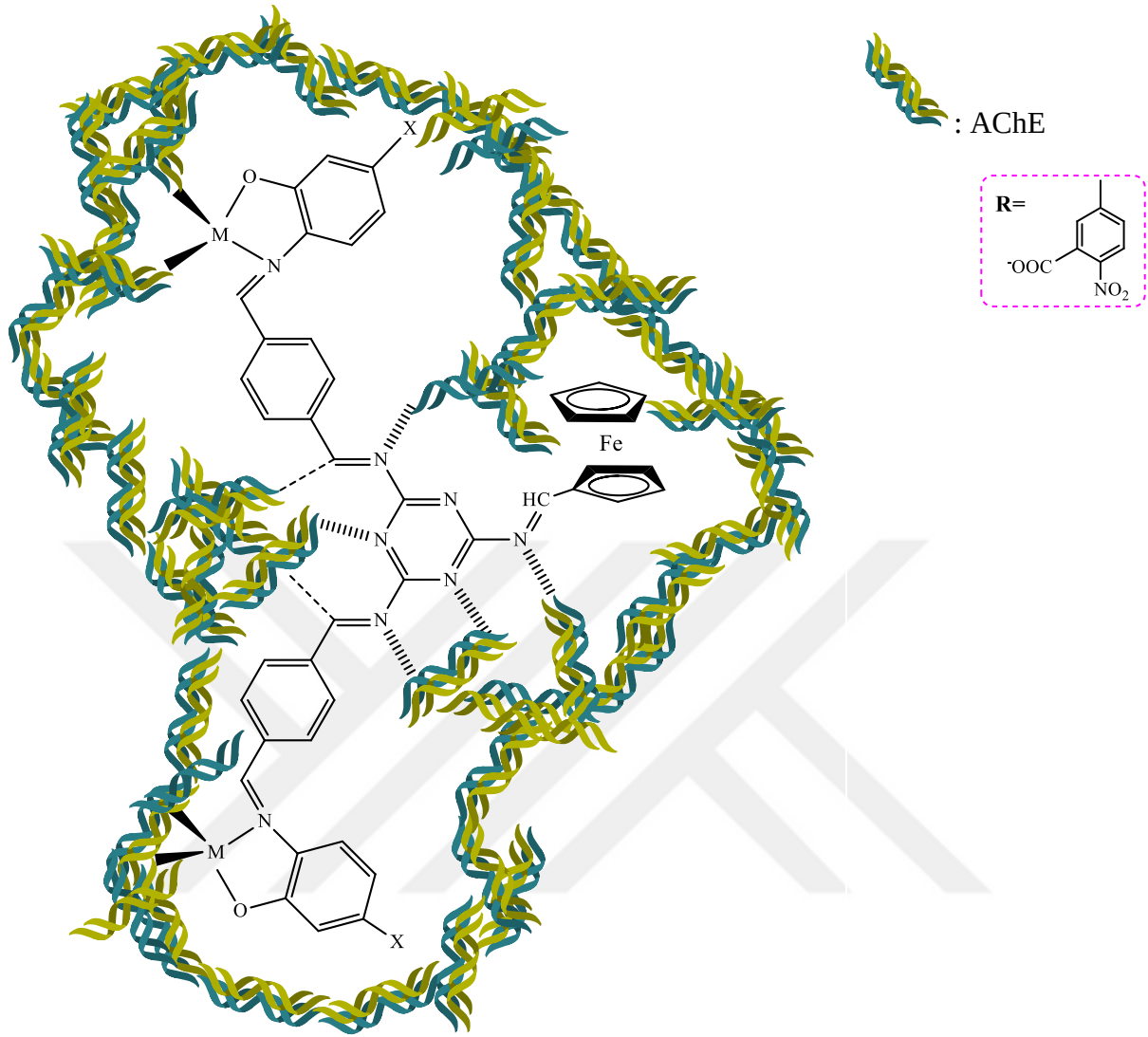
Şekil 5.23. AChE varlığında Asetiltiyokolinin tiyokoline yükseltgenmesi

Çizelge 5.10. AChE immobilize dendronların optimum pH'ları ve enzimin yapısında bulunan katalitik üçlü

Dendron	Optimum		Enzimin aktif kısımları
2J-AChE	8	70	 Tyr-70, Trp-121, Trp-279, Trp-84 Phe-330 Gly-118, Gly-119 Ala-201, Phe-288 Phe 290' Ser-200, His-440 Glu-327
2J-HPt-AChE	8	60	
2J-NO ₂ Pt-AChE	8	60	
2J-CH ₃ Pt-AChE	8	50	
2J-HPd-AChE	8	60	
2J-NO ₂ Pd-AChE	8	70	
2J-CH ₃ Pd-AChE	8	60	



Şekil 5.24. İmmobilize 2J-AChE ile yapılan deneylerde ortamda gerçekleştiği düşünülen reaksiyonlar

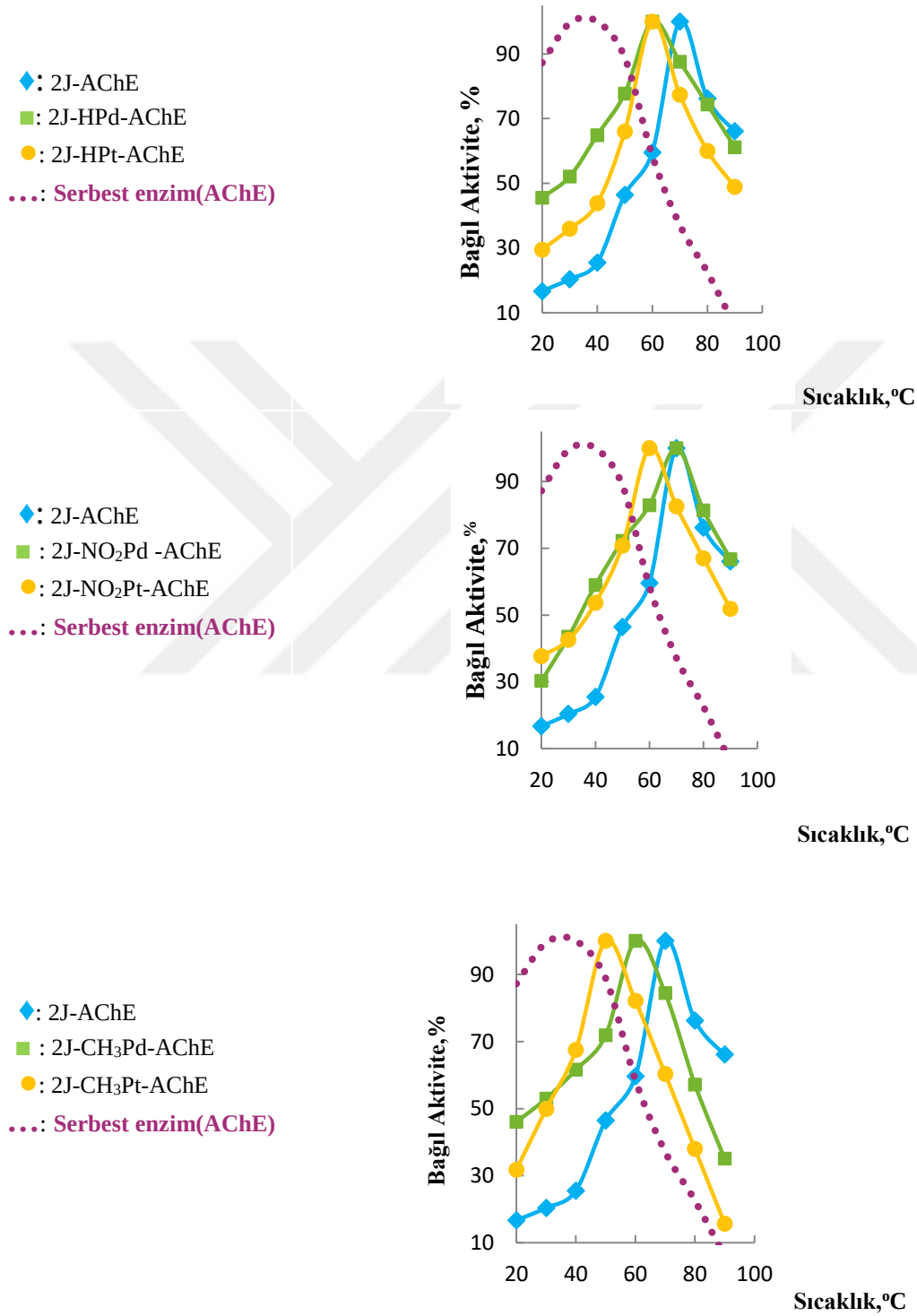


Şekil 5.25. İmmobilize 2J-XM-AChE ile yapılan deneylerde ortamda gerçekleştiği düşünülen reaksiyonlar

5.3.2. Serbest ve immobilize edilen AChE enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi

Serbest ve destek materyale tutturulmuş AChE (Asetilkolin esterase) enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi çalışmaları Bölüm 4.8.2’de belirtildiği gibi yapıldı. X ekseninde sıcaklık, y ekseninde ise bağıl aktivite değerlerine yer verilerek grafikler oluşturuldu. Her bir grafikte referans olarak serbest enzimin (mor tireli çizgi) optimum sıcaklık değerlerine yer verildi

ve sentezlenen yeni destek dendronların optimum sıcaklık değerleri ile karşılaştırma yapıldı. Deney sonunda elde edilen veriler ile çizilen grafiklere Şekil 5.26'da yer verilmiştir.



Şekil 5.26. Enzim (AChE) aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Şekilde görüldüğü gibi serbest enzimin pH 8'deki bağıl aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklık 40°C olarak belirlenirken, immobilize dendronlarda daha yüksek optimum sıcaklıklarda gözlemlendi. 2J-GOx ikinci jenerasyonlu dendronda bağıl aktivite 70°C'de, genişletilmiş iki jenerasyonlu 2J-HPt, 2J-NO₂Pt, 2J-HPd, 2J-CH₃Pd dendronları için 60°C'de, 2J-CH₃Pt dendronu için 50°C'de, 2J-NO₂Pd dendronu için 70°C'de maksimum bağıl aktivite göstermişlerdir.

Optimum sıcaklık değerleri üzerine metal etkisini incelemek için genişletilmiş ikinci jenerasyon dendronların bağıl aktivite grafiklerine baktığımızda kısmen farklı oldukları görüldü. Kompleks oluşumu ile optimum sıcaklık değerlerinde düşüş meydana gelirken, bu düşüş metalin farklılığı olarak incelendiğinde Pt(II) metali içeren dendronlarda daha belirgin bir şekilde gözlemlendi. Genel olarak Pd(II) metali içeren genişletilmiş dendronlarda, Pt(II) metali içerenlere kıyasla daha yüksek sıcaklık değerleri (+10°C) gözlemlendi. Böylece GOx enziminin palladyum içeren desteklere immobilizasyonu sonucunda enzim bozulmadan daha yüksek sıcaklıklarda da aktivitesini korumayı başardı.

Yüksek sıcaklıklardaki enzim uygulamalarında ikinci jenerasyon dendronunun daha iyi sonuç vereceği kanaati getirildi. Ancak uygulama gibi düşük sıcaklıklarda yapılacaksa Pd(II) yada Pt(II) metali içeren dendron desteklerin kullanılmasının daha avantajlı olacağı sonucuna varıldı. Optimum sıcaklık değerleri üzerine süstitüent etkisini incelemek için genişletilmiş ikinci jenerasyon dendronların bağıl aktivite grafiklerine baktığımızda optimum sıcaklık değerlerinin birbirine çok yakın olduğu görülmüştür. Dendronların optimum değerleri Çizelge 5.11.'de topluca verildi.

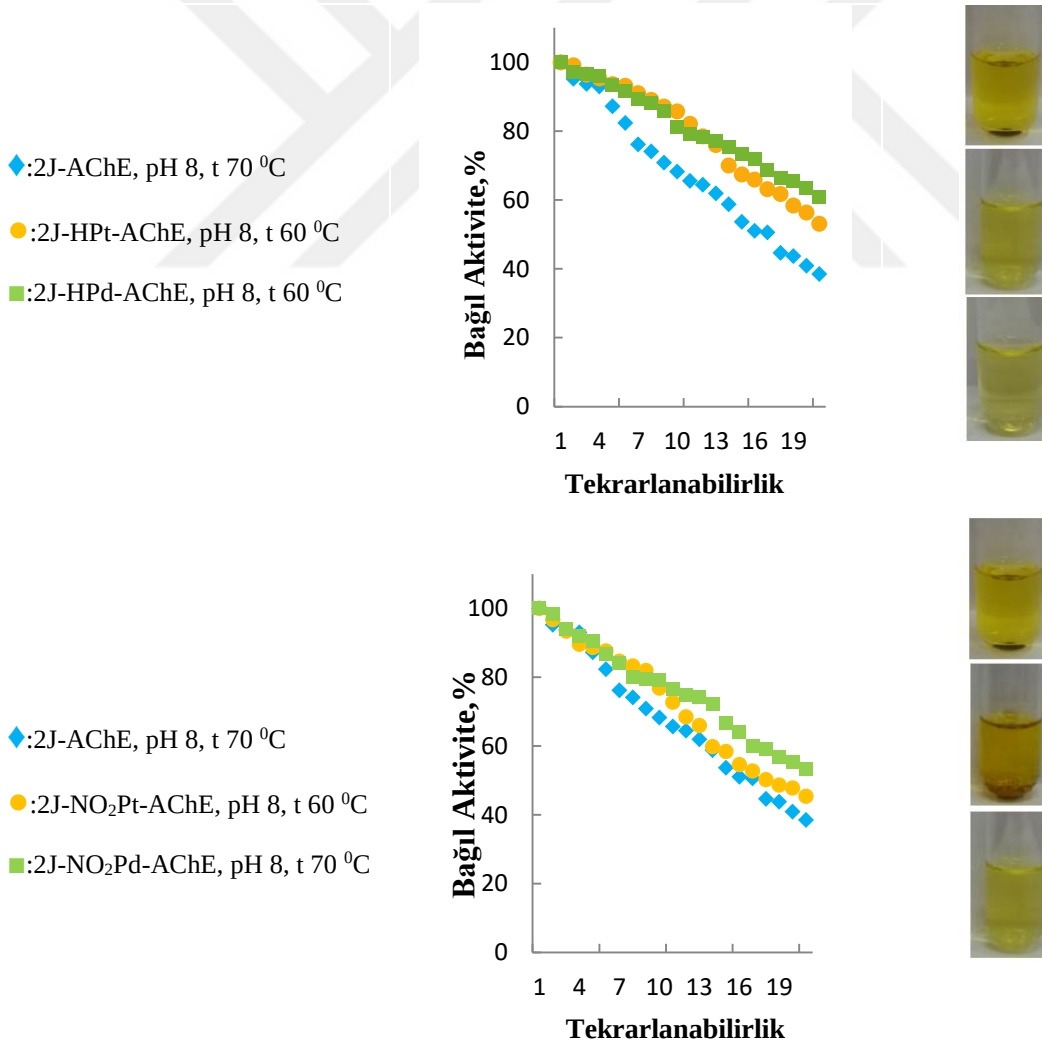
Çizelge 5.11. İmmobilize (AChE) dendronlar için optimum pH, sıcaklık değerleri

Dendron Sembolleri	Optimum	
	pH	t (°C)
2J-AChE	8	70
2J-HPt-AChE	8	60
2J-NO ₂ Pt-AChE	8	60
2J-CH ₃ Pt-AChE	8	50
2J-HPd-AChE	8	60
2J-NO ₂ Pd-AChE	8	70
2J-CH ₃ Pd-AChE	8	60
Serbest Enzim (AChE)	8	40

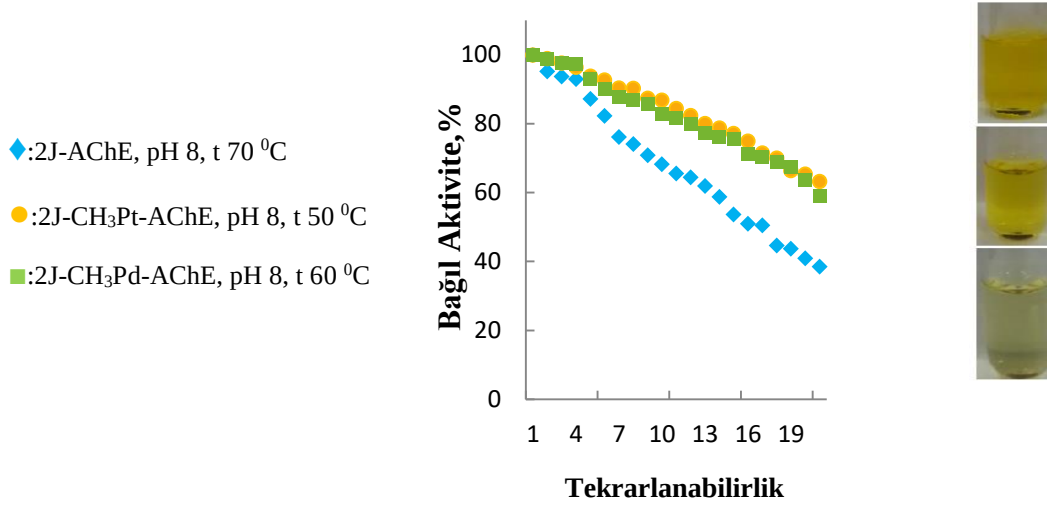
5.3.3. İmmobilize edilen AChE enziminin tekrar kullanılabilirliği

Dendronlara immobilize edilen AChE (Asetilkolinesteraz) enziminin tekrar kullanılabilirliği çalışmaları Bölüm 4.8.3’de anlatıldığı şekilde yapıldı. X ekseninde tekrar kullanım sayısı, y ekseninde ise bağıl aktivite değerlerine yer verilerek grafikler (Şekil 5.27) oluşturuldu.

Deney sonunda elde edilen verilere Çizelge 5.12’de yer verildi. Yirmi (20) tekrar sonunda immobilize 2J-AChE dendronu aktifliğinin %38,51’ini korurken, palladyum iyonu içeren immobilize dendronlar aktifliklerini yirmi tekrar sonunda ortalama %60, platin iyonu içeren immobilize dendronlar aktifliklerini ortalama %53 civarında koruyabilmişlerdir.



Şekil 5.27. Tampon çözelti ortamında immobilize (AChE) dendronlar için tekrarlanabilirlik grafikleri



Şekil 5.27. (devam) Tampon çözelti ortamında immobilize(AChE) dendronlar için tekrarlanabilirlik grafikleri

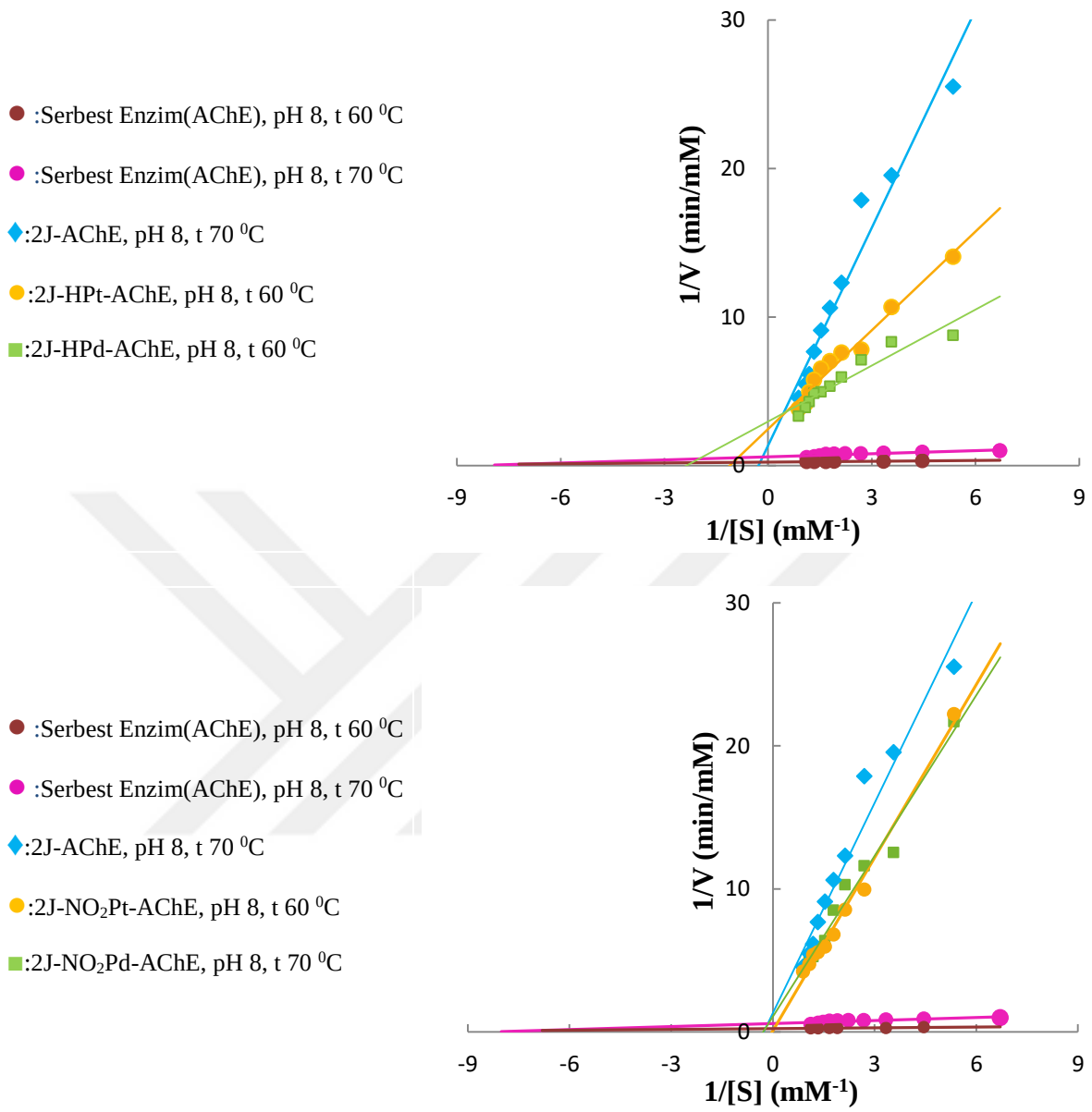
Yirmi ölçüm sonunda kalan % aktiflik değerleri üzerine sübstitüent ve metal etkisini incelemek için dendronların bağıl aktivite grafiklerine baktığımızda farklı oldukları görüldü. Kompleks oluşumu ve metalin farklılaştırılması (Pd(II), Pt(II)) ile geriye kalan % aktiflik değerleri kıyaslandığında, kompleks oluşumu ile geriye kalan % aktiflik değerlerindeki düşüşün yavaşladığı görüldü. Bu da enzim ile metal içerikli dendronlar arasındaki etkileşiminin daha kuvvetli olabileceğinin bir kanıtı olarak düşünüldü. Tüm veriler değerlendirildiğinde (Çizelge 5.12) genelde yapısında Pd(II) metali içeren dendron ile -CH₃ grubu içeren dendronların aktifliklerindeki kaybın en az olduğu görüldü.

Çizelge 5.12. İmmobilize (AChE) dendronların tampon çözelti ortamında tekrarlanabilirlik % aktiflik değerleri

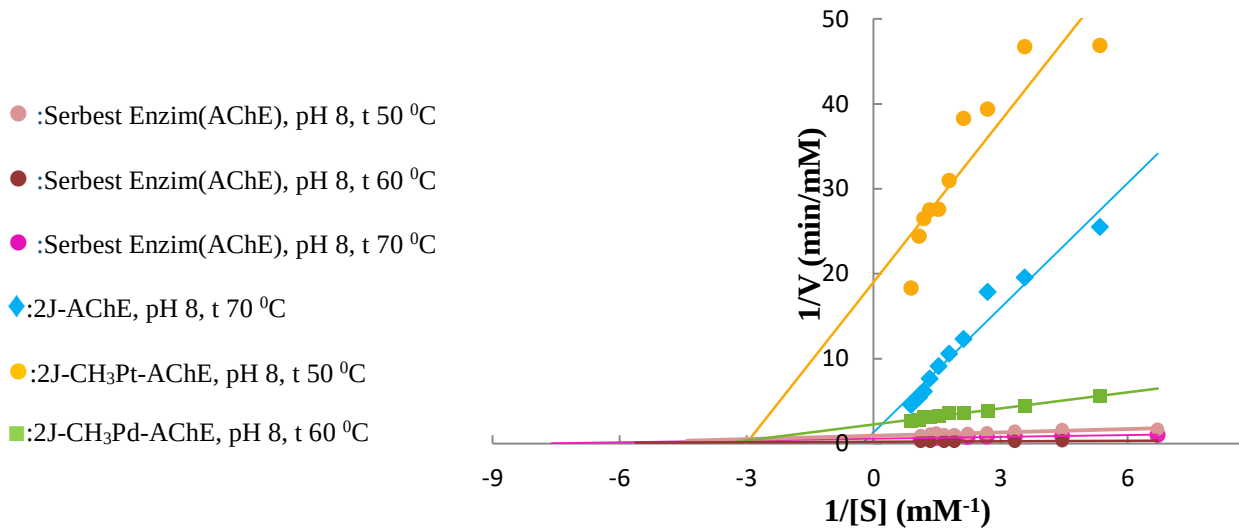
Dendron	Optimum pH	<i>Kullanım Sayısı</i>		
		5.	10.	20.
2J-AChE	8	82,37	65,54	38,51
2J-HPt-AChE	8	93,17	82,15	53,13
2J-NO ₂ Pt-AChE	8	87,62	72,80	45,35
2J-CH ₃ Pt-AChE	8	92,70	84,45	63,27
2J-HPd-AChE	8	91,67	79,22	61,06
2J-NO ₂ Pd-AChE	8	86,84	76,60	53,22
2J-CH ₃ Pd-AChE	8	90,22	81,82	59,11

5.3.4. Serbest ve immobilize edilen AChE enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Serbest ve destek materyale tutturulmuş AChE (Asetilkolin esterase) enziminin aktifliğine derişimin etkisini incelemek için; her destek materyal için belirlenen optimum şartlarda, farklı derişimlerde hazırlanan substrat çözeltilerinde absorbans değerleri belirlendi. Bölüm 4.8.4’de belirtilen işlemler uygulanarak bağıl aktiflik tayinleri yapıldı. X ekseninde 1/S, y ekseninde ise 1/V değerlerine yer verilerek *Lineaweaver-Burk* kalibrasyon grafikleri (Şekil 5.28) oluşturuldu. Her bir grafikte referans olarak serbest enzimin değerlerine yer verildi ve sentezlenen yeni destek dendronların değerleri ile karşılaştırma yapıldı. *Lineaweaver-Burk* kalibrasyon grafiklerinden yararlanarak K_m ve V_{mak} değerleri hesaplandı [165] ve Çizelge 5.13’de verildi.



Şekil 5.28. İmmobilize(AChE) dendronlar için *Lineaweaver-Burk* kalibrasyon grafikleri



Şekil 5.28 (devam). İmmobilize(AChE) dendronlar için *Lineaweaver-Burk* kalibrasyon grafikleri

K_m , enzimler için bir parmak izi olup enzimin substratına karşı ilgisini ifade eden bir parametredir. Bu parametre değerinin küçük olması enzimin substrata karşı ilgisinin yüksek olduğu anlamını taşır. V_{mak} ise enzimin aktif bölgelerinin substrat ile tam doygunluğa geçince ulaştığı yani katalizin ulaşabileceği en yüksek hız değeridir.

Lineaweaver-Burk kalibrasyon grafiklerinden elde edilen kinetik parametre değerlerine bakıldığında, immobilizasyonla bu değerlerin değiştiği gözlenmiştir. 2J-AChE dendronunun 70°C'deki değerlerini ($K_m=3,65$, $V_{mak}=0,75$) serbest AChE enziminin değerleri ($K_m=0,12$, $V_{mak}=1,68$) ile kıyaslandığında K_m değerinin immobilize dendronda daha büyük olduğu yani substrata olan ilginin serbest enzime göre daha az olduğu ve hız açısından da serbest enzime göre daha yavaş ilerlediği görülmüştür.

2J-HPt-AChE dendronunun 60°C'deki değerlerini ($K_m=0,89$, $V_{mak}=0,41$) serbest AChE değerleri ($K_m=0,07$, $V_{mak}=4,32$) ile kıyaslandığında K_m değerinin immobilize dendronda daha büyük olduğu yani substrata olan ilginin serbest enzimden daha az olduğu ve hız açısından da serbest enzime göre yavaş olduğu görülmüştür.

2J-NO₂Pt-AChE dendronunun 60°C'deki değerlerini ($K_m=44,25$, $V_{mak}=10,98$) serbest AChE değerleri ($K_m=0,07$, $V_{mak}=4,32$) ile kıyaslandığında K_m değerinin immobilize dendronda daha büyük olduğu yani substrata olan ilginin serbest enzimden daha az olduğu görülürken, hız açısından serbest enzime üstünlük sağlamıştır.

2J-CH₃Pt-AChE dendronunun 50°C'deki değerlerini ($K_m=0,33$, $V_{mak}=0,05$) serbest AChE değerleri ($K_m=0,15$, $V_{mak}=1,09$) ile kıyaslandığında K_m değerlerinin birbirlerine yakın olduğu görülürken, hız açısından da serbest enzime göre yavaş olduğu görülmüştür.

2J-HPd-AChE dendronunun 60°C'deki değerlerini ($K_m=0,42$, $V_{mak}=0,34$) serbest AChE değerleri ($K_m=0,07$, $V_{mak}=4,32$) ile kıyaslandığında K_m değerinin immobilize dendronda daha büyük olduğu yani substrata olan ilginin serbest enzimden daha az olduğu ve hız açısından da serbest enzime göre daha yavaş olduğu görülmüştür.

2J-NO₂Pd-AChE dendronunun 70°C'deki değerlerini ($K_m=3,46$, $V_{mak}=0,92$) serbest AChE değerleri ($K_m=0,12$, $V_{mak}=1,68$) ile kıyaslandığında K_m değerinin immobilize dendronda daha büyük olduğu yani substrata olan ilginin serbest enzimden daha az olduğu ve hız açısından da serbest enzimin gerisinde kaldığı görülmüştür.

2J-CH₃Pd-AChE dendronunun 60°C'deki değerlerini ($K_m=0,28$, $V_{mak}=0,44$) serbest AChE değerleri ($K_m=0,07$, $V_{mak}=4,32$) ile kıyaslandığında K_m değerinin immobilize dendronda daha büyük olduğu yani substrata olan ilginin serbest enzimden daha az olduğu ve hız açısından da serbest enzime göre daha yavaş olduğu görülmüştür.

K_m ve V_{mak} değerleri üzerine metal (Pd(II), Pt(II)) etkisi incelendiğinde, palladyum içeren dendronların platin içeren dendronlara göre K_m değerlerinin daha düşük yani enzime olan ilgilerinin yüksek olduğu görülmüştür. Hız değerleri kıyaslandığında ise metal farklılaştırılmasının dikkate değer bir iyileşme yapmadığı görülmüştür (2J-NO₂Pt-AChE hariç).

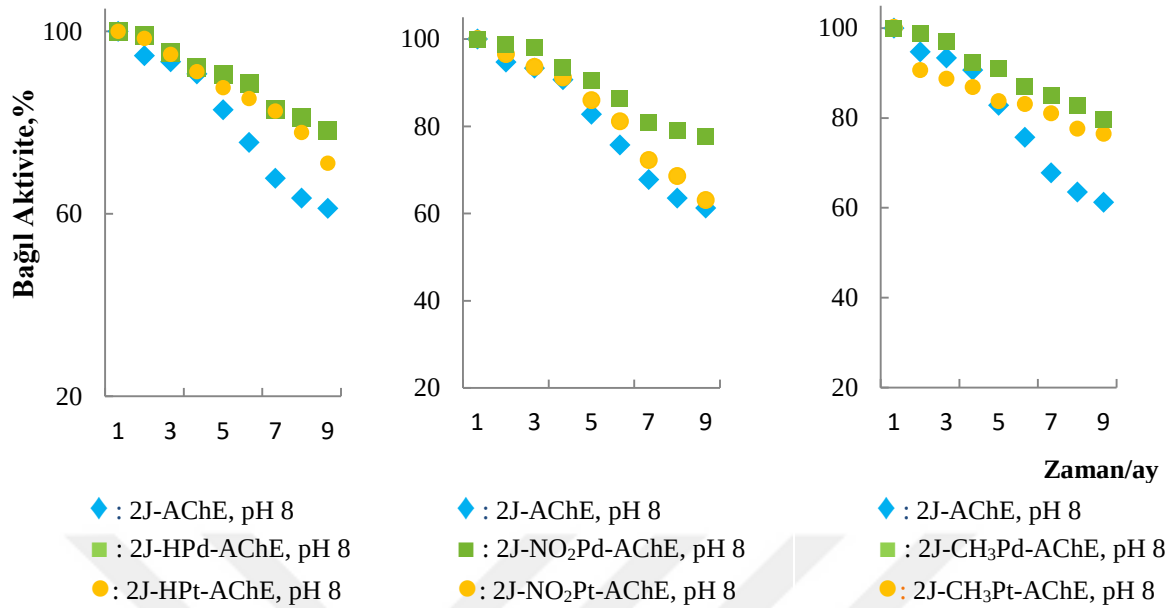
K_m ve V_{mak} değerleri üzerine süstitüe grupların etkisini incelendiğinde elektron sağlayıcı -CH₃ grubunu içeren dendronların immobilize edilmesiyle substrata olan ilgilerini arttırırken, süstitüe gruplarındaki farklılık hız değerlerinde dikkate değer bir değişim meydana getirmediği görülmüştür.

Çizelge 5.13. İmmobilize(AChE) dendronlar için kinetik parametre değerleri

İmmobilize Dendronlar	Optimum pH	Optimum Sıcaklık	K _m (mM)	V _{mak} mM.dk ⁻¹
2J-AChE	8	70°C	3,65	0,75
<i>Serbest Enzim</i>			0,12	1,68
2J-HPt-AChE	8	60°C	0,89	0,41
<i>Serbest Enzim</i>			0,07	4,32
2J-NO ₂ Pt-AChE	8	60°C	44,25	10,98
<i>Serbest Enzim</i>			0,07	4,32
2J-CH ₃ Pt-AChE	8	50°C	0,33	0,05
<i>Serbest Enzim</i>			0,15	1,09
2J-HPd-AChE	8	60°C	0,42	0,34
<i>Serbest Enzim</i>			0,07	4,32
2J-NO ₂ Pd-AChE	8	70°C	3,46	0,92
<i>Serbest Enzim</i>			0,12	1,68
2J-CH ₃ Pd-AChE	8	60°C	0,28	0,44
<i>Serbest Enzim</i>			0,07	4,32

5.3.5. İmmobilize edilen AChE enziminin depolama kararlılığı

Dendronlara immobilize edilen AChE (Asetilkolin esteraz) enziminin depolama kararlılığı çalışmaları Bölüm 4.8.5’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. İmmobilize dendronların depolama kararlılığına ait grafikler Şekil 5.29’da verildi.



Şekil 5.29. İmmobilize (AChE) ikinci jenerasyon dendronlar için depolama grafikleri

Depolama kararlılığı enzimin saklama koşullarına bağlı bir parametre olup, ölçümler ayda bir defa olmak üzere dokuz (9) ay boyunca tekrarlandı. AChE immobilize edilmiş dendronlar için depolama kararlılığı grafikleri incelendiğinde, bir ayın sonunda tüm dendronların genel olarak bağlı aktivitelerinin %95 oranında korunduğu gözlenmiştir.

Dokuzuncu ayın sonundaki veriler değerlendirildiğinde ise, 2J-AChE dendronunun bağlı aktivitesi yaklaşık %60 oranında korunurken, Pt(II) ve Pd(II) metali içeren dendronlar bağlı aktivitelerinin %75'ini korumuşlardır.

Tüm veriler kıyaslandığında Pd^{2+} iyonu içeren dendronların aktifliklerini uzun süre koruyabildikleri belirlenmiştir. Bunun nedeni enzimlerin Pd^{2+} iyonu içeren desteklerle daha kuvvetli etkileşim içinde bulunmasından kaynaklanabilir. Ayrıca immobilize enzimin konformasyonel kararlılığının daha iyi olduğu söylenebilir.

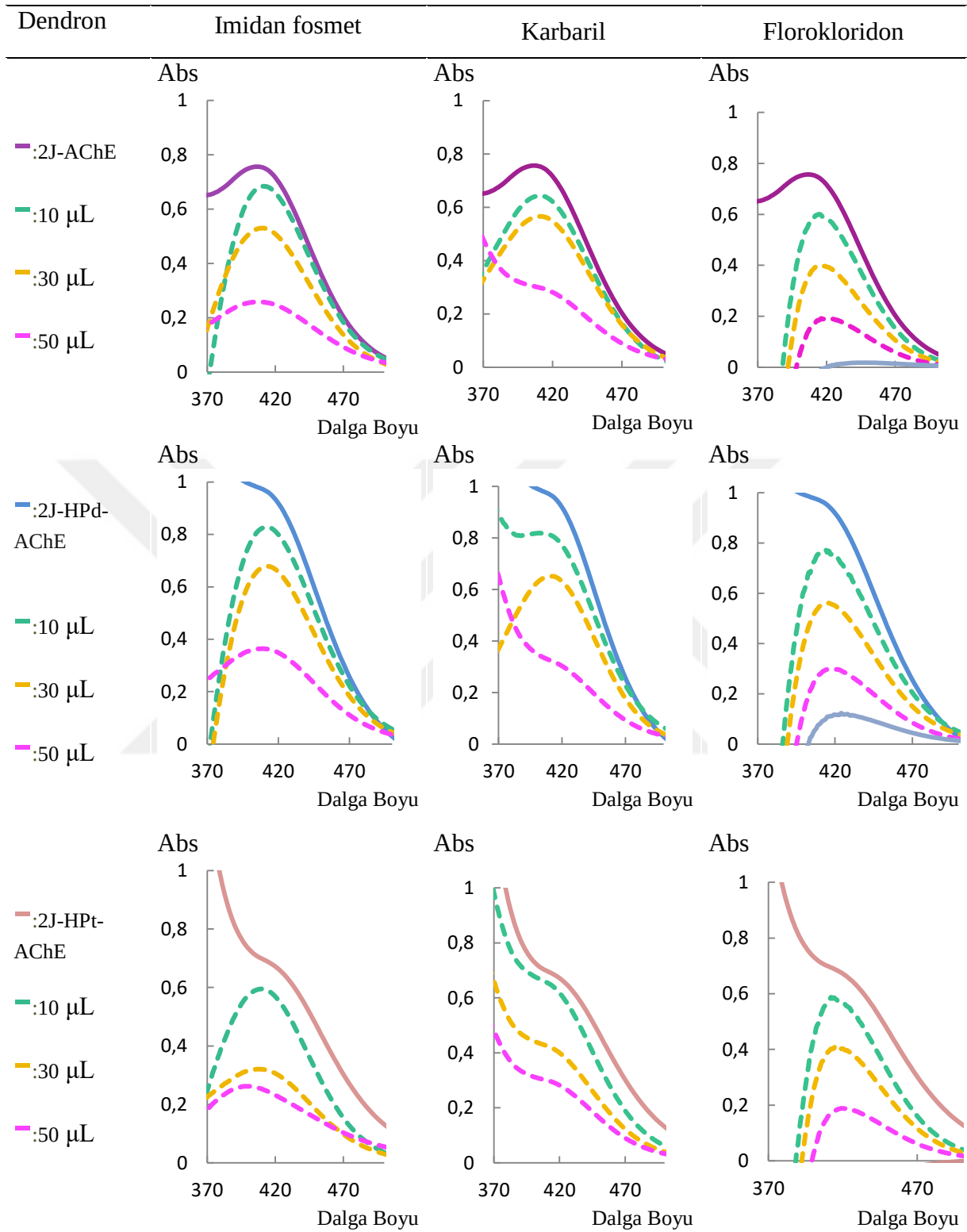
Çizelge 5.14. İmmobilize (AChE) dendronların 9 aylık depolama değerleri

Zaman(ay) Dendron	Bağıl aktivite%				
	2.ay	4.ay	6.ay	8.ay	9.ay
2J-AChE	94,70	90,68	82,80	67,80	61,22
2J-HPd-AChE	99,15	92,19	90,50	82,95	78,20
2J-HPt-AChE	98,48	91,20	87,63	82,53	71,09
2J-CH ₃ Pd-AChE	98,87	92,42	91,02	85,13	79,78
2J-CH ₃ Pt-AChE	90,64	86,86	83,75	81,04	76,50
2J-NO ₂ Pd-AChE	98,81	93,52	90,40	80,74	77,57
2J-NO ₂ Pt-AChE	96,58	91,18	85,97	72,27	63,11

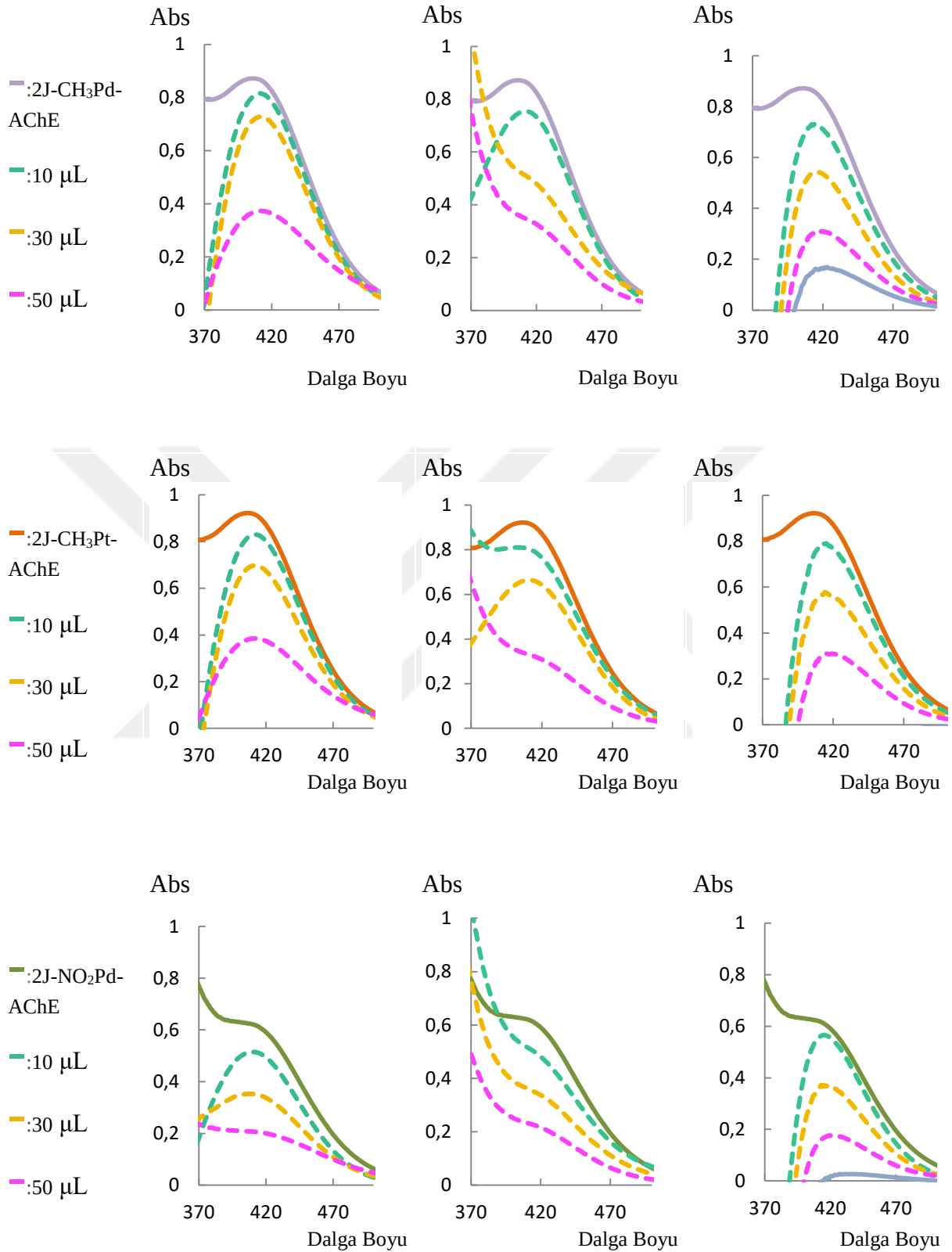
5.3.6. Enzim inhibitörü pestisitlerin immobilize AChE enzimi aktifliği üzerine etkisi ve pestisit tayini

Dendronlara immobilize edilen AChE (Asetilkolin esterase) enzim aktifliğinin inhibisyonu üzerine pestisitlerin (Imidan fosmet, karbaril ve florokloridon) etkisi Bölüm 4.8.6’da anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. AChE immobilize edilmiş dendronların bağıl aktiviteleri üzerine pestisitlerin etkisi ile ilgili grafikler Şekil 5.30’da verildi.

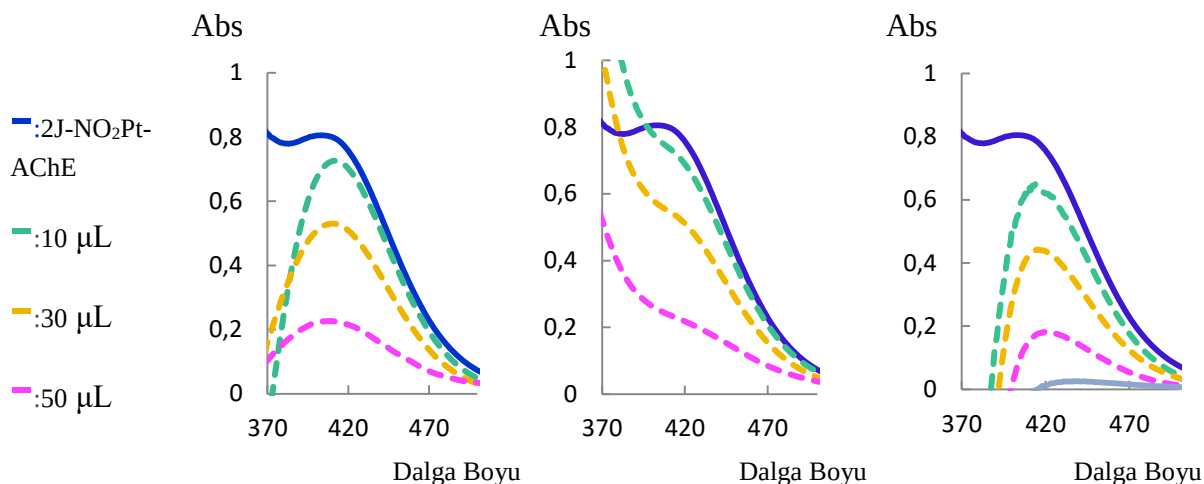
X ekseninde dalga boyuna, y ekseninde ise absorbans değerlerine yer verilerek grafikler (Şekil 5.30) oluşturuldu. Pestisitlerin ilavesi ile 412nm dalga boyundaki absorbans değişimleri Çizelge 5.15, 5.16 ve 5.17’de verildi.



Şekil 5.30. İmmobilize (AChE) dendronların bağıl aktiflikleri üzerine pestisitlerin etkisi



Şekil 5.30. (devam) İmmobilize (AChE) dendronların bağıl aktiflikleri üzerine pestisitlerin etkisi



Şekil 5.30. (devam) İmmobilize (AChE) dendronların bağıl aktiflikleri üzerine pestisitlerin etkisi

Imidan Fosmet'in immobilize AChE enzimi üzerine inhibisyon sonuçları

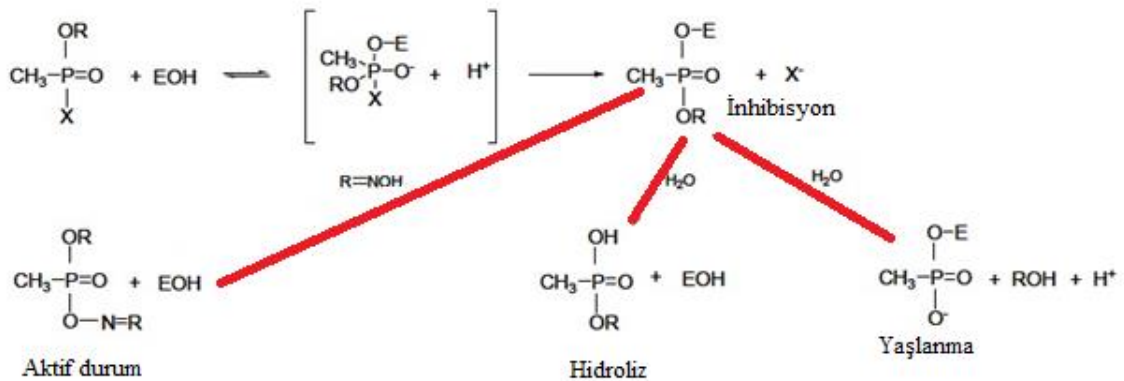
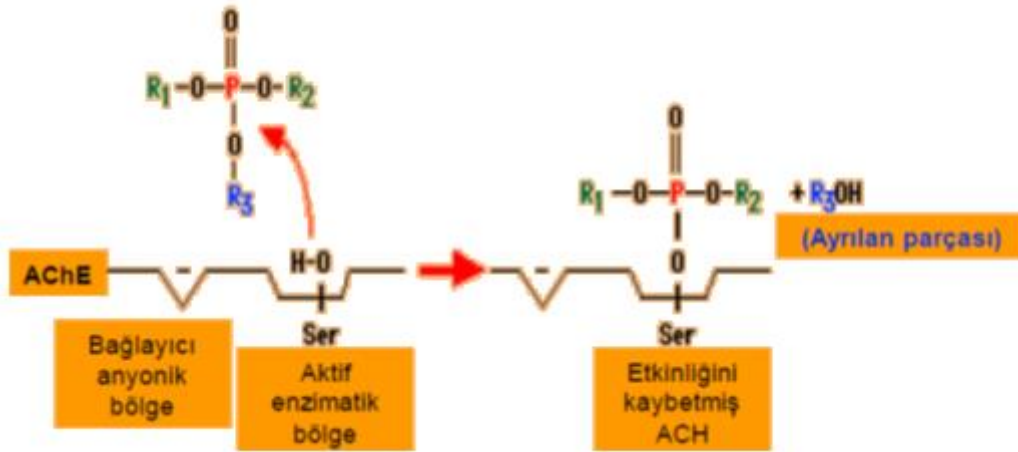
İmmobilize (AChE) dendron ve onun substratı olan asetiltiyokolinilyodür (ATCh) ile verdiği reaksiyon ortamına, bir OP pestisiti olan Imidan fosmet'i artan hacimlerde (10-50 µL) ilave edildiğinde AChE enziminin bağıl aktivitesinde belirgin bir düşüş gözlemlendi. 50 µL pestisit ilavesinde immobilize dendronların bağıl aktivitesinin yaklaşık % 35'inin korunduğu belirlendi.

Çizelge 5.15. İmmobilize (AChE) dendronların % bağıl aktiflikleri üzerine Imidan fosmet'in etkisi

Dendron	Eklenen Pestisit Hacimleri (Imidan fosmet) ve Bağıl Aktivite%		
	10 µL	30 µL	50 µL
2J-AChE	91,08%	76,69%	34,24%
2J-HPd-AChE	85,92%	70,38%	37,64%
2J-NO ₂ Pd-AChE	91,45%	74,97%	33,30%
2J-CH ₃ Pd-AChE	94,24%	74,29%	43,04%
2J-HPt-AChE	94,34%	56,21%	35,90%
2J-NO ₂ Pt-AChE	91,22%	66,59%	28,28%
2J-CH ₃ Pt-AChE	90,67%	76,22%	42,07%

Tüm veriler kıyaslandığında metal iyonu içeren immobilize dendronlardan Pd^{2+} iyonu içerenin, sübstituentlar arasında ise $-\text{CH}_3$ grubu içeren immobilize dendronların enzim aktifliğini daha iyi koruduğu belirlenmiştir. Enzim aktifliğinin daha iyi korunmasının nedeni, enzimin üç boyutlu yapısının daha iyi korunması ve konformasyonel kararlılığının daha iyi olmasından kaynaklandığı söylenebilir.

OP'lar AChE enziminin aktif bölgesindeki Ser200 amino asidinin hidroksil grubuna kovalent bağ ile bağlanarak enzimi inhibe ettiği belirtilmektedir [166]. Oluşan kovalent bağ zayıf ise, inhibisyon geri dönüşümlü olabilir. Fakat fosfat molekülünden bir grup ayrılıyorsa inhibisyon geri dönüşümsüz hale gelir (Şekil 5.31).

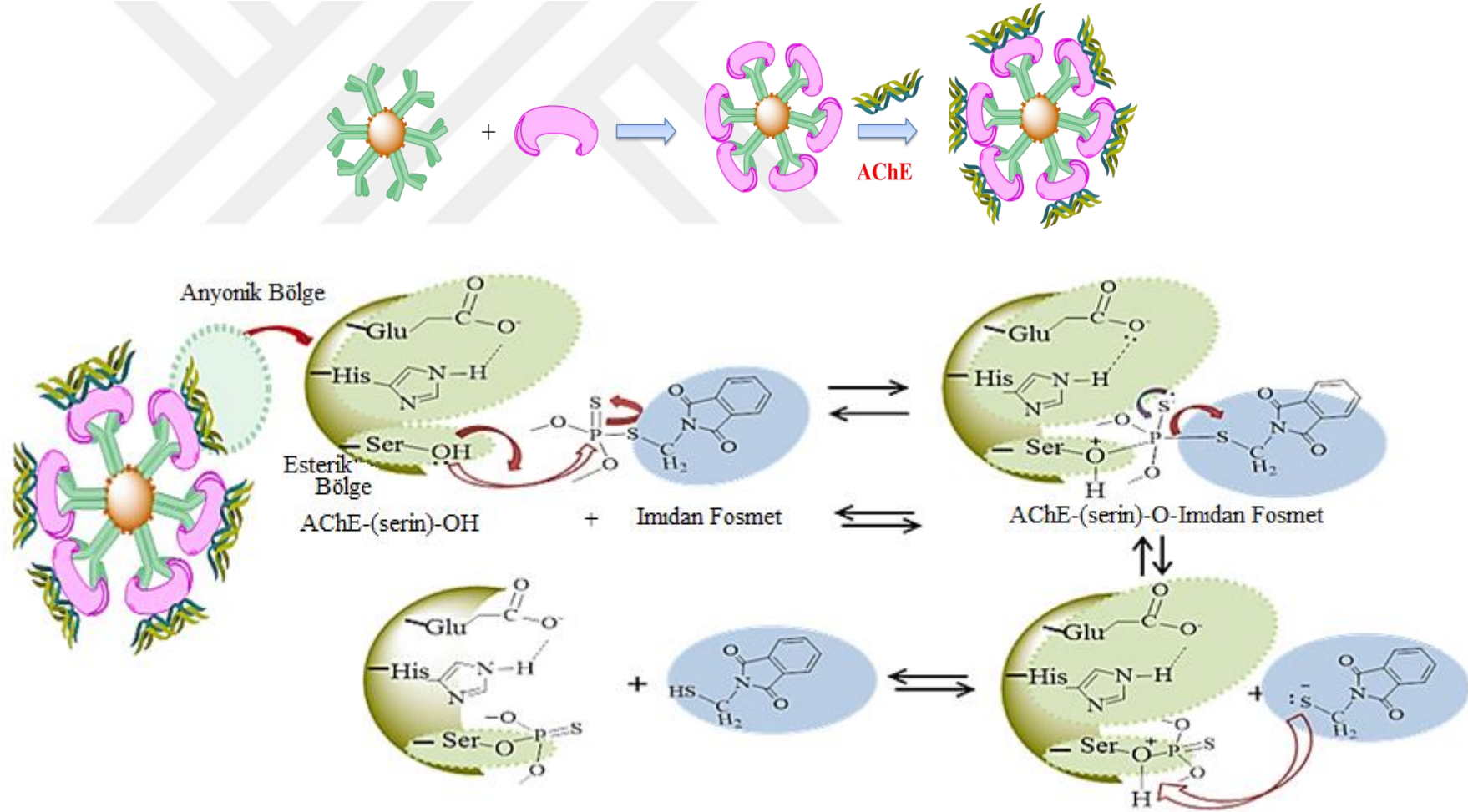


Şekil 5.31. Organofosforlu bileşiklerin AChE enzim inhibisyon mekanizması

İmmobilize (AChE) dendron ve onun substratı olan asetiltiyokolinilyodür (ATCh) ile verdiği reaksiyon ortamına, bir OP pestisiti olan Imidan fosmet'i artan hacimlerde ilave

edildiğinde AChE enziminin bağıl aktivitesinde düşüş gözlenmesinin nedeni; Imidan fosmetin immobilize AChE enziminin aktif bölgesinde bulunan Ser200 amino asidinin hidroksil grubuna bağlanarak geri dönüşümsüz olarak inhibe etmesinden (Şekil 5.32) dolaydır.





Şekil 5.32. Organofosfor bileşiği ile AChE enzimi ile oluşan inhibisyon mekanizması

Çizelge 5.16. İmmobilize (AChE) dendronların bağıl aktiflikleri üzerine karbaril'in etkisi

Dendron	Eklenen Pestisit Hacimleri (Karbaril) ve Bağıl Aktivite%		
	10 µL	30 µL	50 µL
2J-AChE	85,66%	75,38%	39,58%
2J-HPd-AChE	83,88%	67,57%	33,46%
2J-NO ₂ Pd-AChE	82,73%	57,92%	37,26%
2J-CH ₃ Pd-AChE	87,15%	59,00%	40,15%
2J-HPt-AChE	93,94%	60,92%	42,90%
2J-NO ₂ Pt-AChE	91,89%	68,25%	29,47%
2J-CH ₃ Pt-AChE	87,54%	72,56%	35,85%

Karbaril'in immobilize AChE enzimi üzerine inhibisyon sonuçları

İmmobilize (AChE) dendron ve onun substratı olan asetiltiyokolinilyodür (ATCh) ile verdiği reaksiyon ortamına, bir Karbamat pestisit olan karbaril'i artan hacimlerde (10-50 µL) ilave edildiğinde AChE enziminin bağıl aktivitesinde belirgin bir düşüş gözlemlendi. 50 µL pestisit ilavesinde immobilize dendronların bağıl aktivitesinin yaklaşık % 60'lara varan kayıp gözlemlendi.

Tüm veriler kıyaslandığında sübstitüentlar arasında -CH₃ grubu içeren immobilize dendronların enzim aktifliğini daha iyi koruduğu sonucuna varılmıştır. Enzim aktifliğinin daha iyi korunmasının nedeni, enzimin üç boyutlu yapısının daha iyi korunması ve konformasyonel kararlılığının daha iyi olmasından kaynaklandığı söylenebilir.

Karbamatlar içinde, AChE enziminin aktif bölgesinde bulunan Ser200 amino asidinin hidroksil grubu kovalent bağ ile etkileşim sonucunda oluşturduğu bağ ile enzim inhibe olur. Oluşan bu bağ zayıf ise, inhibisyon geri dönüşümlü olabilir. Oluşan bağ kuvvetli ise inhibisyon geri dönüşümsüz hale gelir. Geri dönüşümsüz olan bu inhibisyonda karbamat molekülünden bir grubun ayrıldığı düşünülür (Bkz Şekil 5.31).

Çizelge 5.17. İmmobilize (AChE) dendronların bağıl aktiflikleri üzerine Florokloridon'ın etkisi

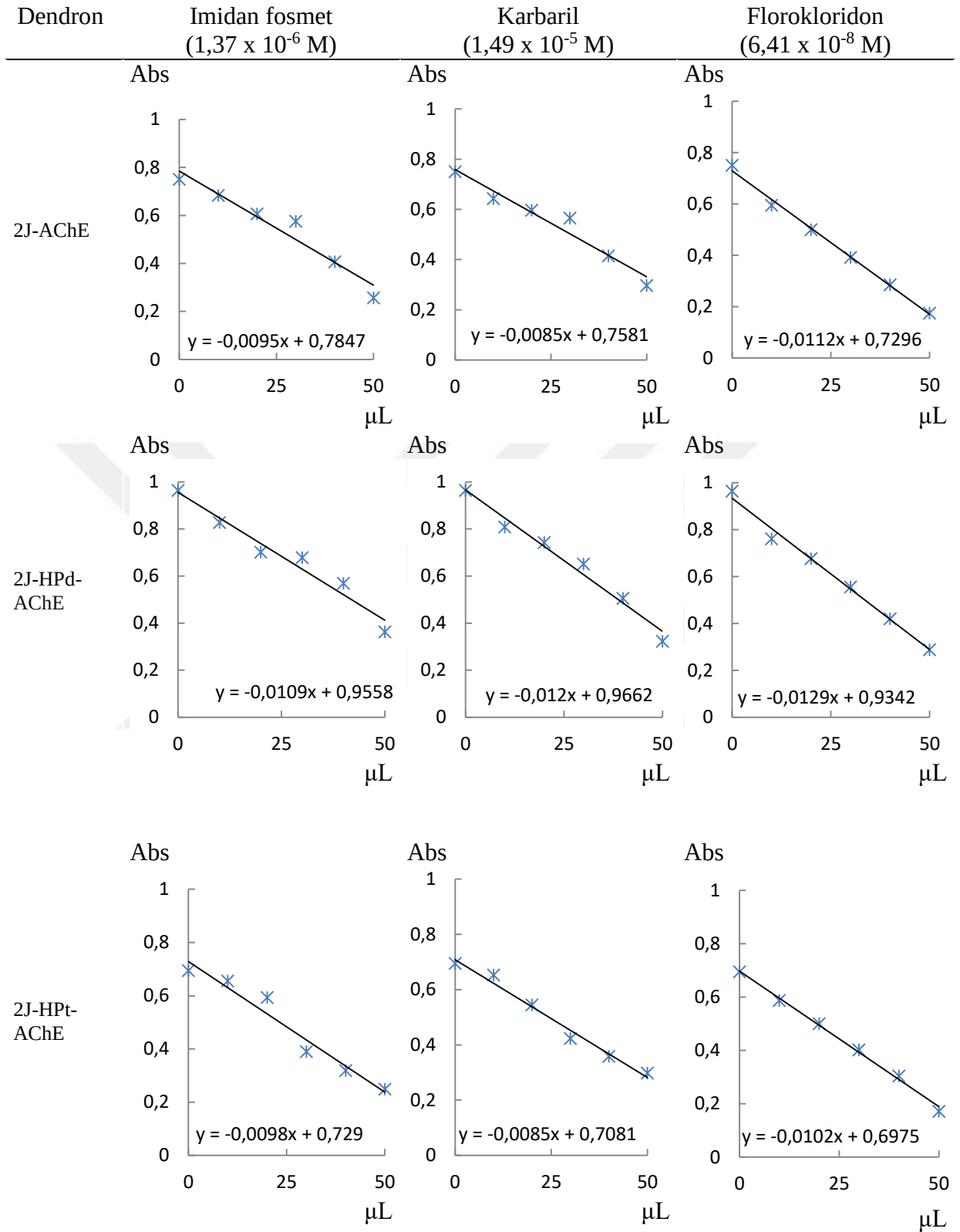
Dendron	Eklenen Pestisit Hacimleri (Florokloridon) ve Bağıl Aktivite%		
	10 µL	30 µL	50 µL
2J-AChE	79,29%	52,34%	23,39%
2J-HPd-AChE	78,98%	57,68%	29,95%
2J-NO ₂ Pd-AChE	90,44%	58,73%	24,93%
2J-CH ₃ Pd-AChE	84,39%	62,07%	34,48%
2J-HPt-AChE	84,54%	57,88%	24,66%
2J-NO ₂ Pt-AChE	80,90%	54,38%	20,41%
2J-CH ₃ Pt-AChE	85,30%	61,91%	32,60%

Florokloridon'ın immobilize AChE enzimi üzerine inhibisyon sonuçları

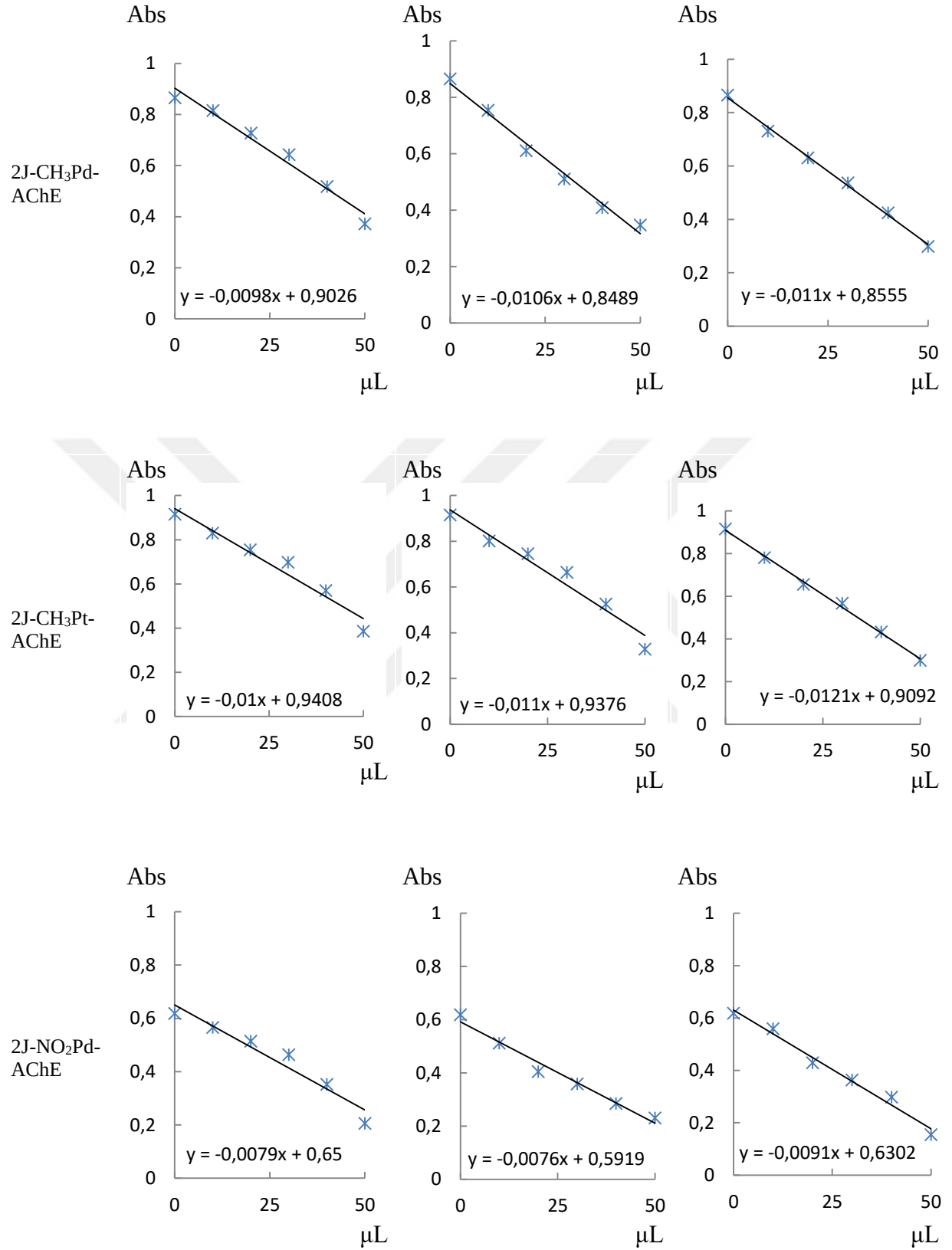
İmmobilize (AChE) dendron ve onun substratı olan asetiltiyokolinodür (ATCh) ile verdiği reaksiyon ortamına, bir herbisit olan Florokloridon'ı artan hacimlerde (10-50 µL) ilave edildiğinde AChE enziminin bağıl aktivitesinde belirgin bir düşüş gözlemlendi. 50 µL pestisit ilavesinde immobilize dendronların bağıl aktivitesinin yaklaşık % 25'inin korunabildiği görüldü.

Tüm veriler kıyaslandığında süstitüentler arasında -CH₃ grubu içeren immobilize dendronların enzim aktifliğini daha iyi koruduğu, -NO₂ grubu içeren immobilize dendronların ise enzim aktifliğinin daha düşük olduğu gözlemlendi.

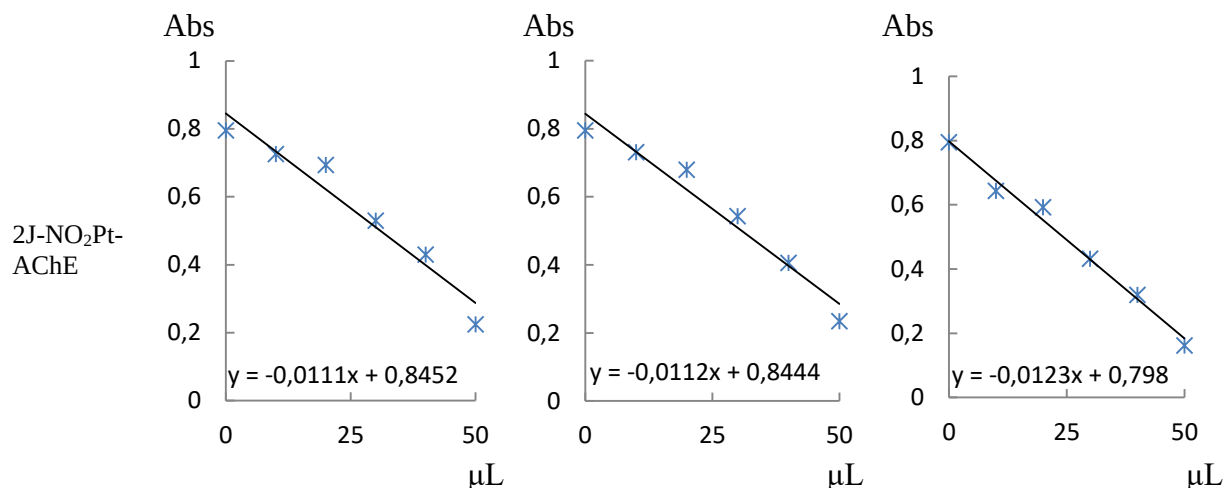
Çalışılan pestisitlere ait kantitatif bir uygulama yapabilmek için, 10-50 µL'deki immobilize AChE enziminin belirlenen dalga boyundaki absorbans değerlerine (y eksen) karşı pestisit miktarları (x eksen) yerleştirilerek kalibrasyon grafiği (Şekil 5.33) çizildi. Bu grafiğin eğiminden yararlanarak absorbans değerinin yarıya inebilmesi için (AChE enziminin aktifliğini %50'ye düşürebilecek) gereken pestisit çözeltisinin µL cinsinden miktarı hesaplandı.



Şekil 5.33. Enzim aktifliğini %50 inhibe eden pestisit miktarları



Şekil 5.33. (devam) Enzim aktifliğini %50 inhibe eden pestisit miktarları



Şekil 5.33. (devam) Enzim aktifliğini %50 inhibe eden pestisit miktarları

Çizelge 5.18. Bağlı Aktiviteyi 50%'ye indirmek için eklenmesi gereken pestisit hacimleri

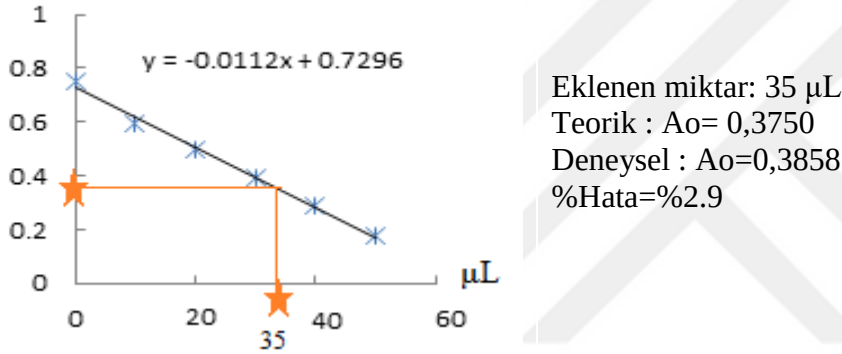
Dendron	Bağlı Aktivite 50%		
	İmıdan Fosmet	Karbaril	Florokloridon
2J-AChE	43,12 μL	45,07 μL	31,66 μL
2J-HPd-AChE	43,56 μL	40,43 μL	35,13 μL
2J-NO ₂ Pd-AChE	43,14 μL	37,20 μL	35,27 μL
2J-CH ₃ Pd-AChE	47,96 μL	39,27 μL	38,44 μL
2J-HPt-AChE	38,97 μL	42,47 μL	34,35 μL
2J-NO ₂ Pt-AChE	40,29 μL	39,86 μL	32,52 μL
2J-CH ₃ Pt-AChE	48,38 μL	43,69 μL	37,37 μL

Glikoprotein olan Asetilkolinesteraz (AChE), asetilkolin (ACh) /asetiltiyokolini (ATCh) hidrolizleyen bir enzimdir.

ACh ise sinir impulsu taşıma görevini üstlenen, taşıma görevi bittiği anda yıkılması gereken bir moleküldür. Yıkım, AChE tarafından yapılır. Endüstride yaygın olarak kullanılan böcek öldürücü ilaçların (organikfosforlar, karbamatlar, gibi..) AChE'ın aktif bölgesine bağlanması sonucunda, ACh yıkımı gerçekleşmez. Bu ise, sinirlerle kasların birleşme bölgelerinde, kasların sinirlere cevabının gecikmesine neden olur. Kas ve sinir arasında gerekli olan denge bozulur. Hatta hücrenin yıkımı ve canlının ölümüne giden

sonuçların ortaya çıkmasına neden olur. Bu nedenle pestisitlerin pratik yöntemlerle tayin edilebilmesi insan sağlığı açısından önemlidir. Bu fikirden yola çıkarak hazırlanan immobilize desteklerin pestisit derişimi tayininde kullanılabilir olduğunu gösteren bir çalışma yaptık.

Kalibrasyon grafiklerinin uygulanabilir olup olmadığının araştırması yapıldı. Bunun için, derişimi bilinen pestisit absorbans değeri ile, hazırlanan kalibrasyon grafiğinde (Şekil 5.33) aynı derişime karşılık gelen absorbans değeri karşılaştırıldı. Bu karşılaştırmanın nasıl yapıldığına dair bir örnek aşağıda verildi. Florokloridon ile 2J-AChE arasındaki kalibrasyon grafiği için verilen Şekil 5.33'dikkate alındı.



Şekil 5.34. 2J-AChE- Florokloridon'ın kantitatif tayini

Stok Florokloridon çözeltisinden 35 µL alındı. 35 µL'nin absorbans değeri 412nm'de 0,3858 olarak ölçüldü. Kalibrasyon grafiğinde ise 35 µL ye karşılık gelen 0,3750 değer ile karşılaştırması yapıldı. % 2,9 hatayla kalibrasyon grafiğinin uygulanabilir olabileceği sonucuna varıldı.

6. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Enzimler, klasik kimyasal katalizörler ile karşılaştırıldıklarında genelde kararlılıkları düşük ve pahalı katalizörlerdir. “Enzimlerin bu tip sorunlarının üstesinden gelinebilmesi için, çözünmeyen desteklerin üzerine immobilizasyonlarının sağlanması ile giderilebilir”. Bu temel düşünceyle yeni dendron desteklerin hazırlanmasına yönelik olan tez çalışması iki ana bölüm halinde incelenmiştir. İlk bölüm ferrosen gövdeli dendronların (1J, 2J) sentezi üzerinedir. Bu dendronlar birinci ve ikinci jenerasyonlu yapılara sahiptir. Ayrıca ikinci jenerasyonlu olan dendritik yapıya heterosiklik aminlerin (2J; 2-Aminofenol türevleri) eklenmesiyle oluşan çözelti ortamındaki Schiff bazlarına Pt(II)/Pd(II) iyonların tepkimesi sonucunda (template metoduna göre) genişletilmiş ikinci jenerasyonlu dendronlar (2J-HPt, 2J-HPd, 2J-NO₂Pt, 2J-NO₂Pd, 2J-CH₃Pt, 2J-CH₃Pd) sentezlenmiştir. Yapıları çeşitli spektral yöntemlerle açıklanmıştır.

Tez çalışmasının ikinci bölümü ise, enzimin immobilizasyonu ve pratik uygulamaları üzerinedir. Immobilizasyon çalışmasında kullanılan enzimler GOx ve AChE'dir. Bu bölümde, enzimlerin serbest haldeki %bağıl aktivitesi ile genişletilmiş ikinci jenerasyon dendrimerlerine immobilize olan GOx, AChE enzimlerin %bağıl aktivitesine etki eden çeşitli parametreler incelenmiştir. İncelemeler sonucunda elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

- Dendronların DMSO, asetonitril gibi polar çözücülerde iyi çözünürken, CCl₄ ve benzen gibi apolar çözücülerde çözünmediği (Çizelge 4.1) görüldü.
- Jenerasyon sayısının artmasıyla erime noktalarında düşüş gözlenirken çözünürlüklerinde artış gözlemlendi.
- Metal içeren dendronların erime noktaları kıyaslandığında, Pd(II) iyonu içeren dendronların Pt(II) iyonu içeren dendronlarıkinden daha düşük olduğu, çözünürlüklerinin ise daha iyi olduğu gözlemlendi.
- Farklı sübstitüentlere sahip dendronların erime noktaları kıyaslandığında, -NO₂ sübstitüentlerini içeren dendronların -CH₃ sübstitüentlerini içeren dendronlara kıyasla daha yüksek olduğu görüldü.
- Serbest GOx enzimi için enzim aktifliğinin maksimum olduğu optimum pH değeri 5, optimum sıcaklık değerleri 30 ve 70°C iken, çalışılan immobilize dendronların

optimum pH değeri 4-8 aralığında değişirken, optimum sıcaklığın 40-80°C aralığında olduğu görüldü.

- Yüksek sıcaklıklardaki enzim uygulamalarında (80°C) ve nötral ortamda (pH7) kullanılacak immobilize dendron 2J-HPd-GOx'dır.
- Yüksek sıcaklıklardaki enzim uygulamalarında (80°C) ve asidik ortamda (pH6) kullanılacak immobilize dendron 2J-CH₃Pd-GOx'dır.
- Düşük sıcaklıklardaki enzim uygulamalarında (40°C) ve asidik ortamda (pH4) kullanılacak uygun immobilize dendron 2J-GOx'dır.
- Düşük sıcaklıklardaki enzim uygulamalarında (50°C) ve bazik ortamda (pH8) kullanılacak uygun immobilize dendron 2J-NO₂Pd-GOx'dır.
- Sulu ortamda immobilize dendronların onuncu (10.) tekrar kullanımından sonra okunan %bağıl aktivite 85 iken, yapay idrar çözeltisi ortamında bu değerin 55 olduğu görüldü.
- Tekrarlanabilirlik üzerine yapılan bu çalışmada çözücü ortamı değiştirildiğinde kullanım sayılarında azalmalar olsa da, desteklerimizin farklı ortamlarda da kullanılabilir olduğu sonucuna varıldı.
- GOx ile immobilize olan dendronlar arasında 12. ayın sonunda Pt²⁺ iyonu içeren dendronların aktifliklerini daha iyi koruduğu görüldü.
- Serbest AChE enzimi için enzim aktifliğinin maksimum olduğu optimum pH değeri 8, optimum sıcaklık değeri 40°C iken, çalışılan immobilize dendronların optimum pH değeri 8, optimum sıcaklıklarının 50-70°C aralığında değiştiği görüldü.
- Yüksek sıcaklıklardaki enzim uygulamalarında (70°C) ve bazik ortamda (pH8) kullanılacak immobilize dendronlar 2J-AChE ve 2J-NO₂Pd-AChE'dir.
- Düşük sıcaklıklardaki enzim uygulamalarında (50°C) ve bazik ortamda (pH8) kullanılacak uygun immobilize dendron 2J-CH₃Pt-AChE'dir.
- Tekrarlanabilirlik üzerine yapılan çalışma sonucunda ise kullanılabilirliği en yüksek dendronun 2J-CH₃Pt-AChE olduğu sonucuna varıldı.
- Immobilize desteklerin pestisitler üzerine etkileri incelendiğinde ise Imıdan Fosmet'e karşı en dayanıklı desteğin 2J-HPt-AChE dendronu olduğu görülürken, Karbaril için bu destek 2J-NO₂Pd-AChE, Florokloridon için de 2J-AChE olduğu sonucuna varıldı.

7. ÖNERİLER

İnorganik dendronların birçok alanda kullanım potansiyeli olması nedeni ile önemli makro moleküllerdir. Özellikle farmakoloji, tıp, elektronik optik, kataliz, biosensör gibi alanlarda kullanılabilmeleri nedeniyle hem sağlık hem de endüstri alanında uygulanabilir olabileceği önerilmektedir.

Hazırlanan dendronlarda çeşitli donör atomların bulunması nedeniyle bir çok metal ve ametallerle kompleks yapabileceği için, metal ve ametal iyonların uzaklaştırılmasında kullanılabilecek bir sensör hazırlanmasında önerilebilir. Bu dendronlara enzimin immobilize edilmesi sonucunda enzimin aktifliğini koruması nedeniyle biyosensör alanında da kullanılabileceği önerilmektedir.

Bundan sonraki çalışmalara ışık tutması amacıyla tez çalışması değerlendirildiğinde; hazırlanan dendronlara farklı enzimlerin immobilize edilebileceği, medyatörlerin önemli olduğu tüm çalışmalarda kullanılabileceği (kanda , idrarda, ..) önerilmektedir.

Çalışılan AChE ile immobilize dendronların pestisit tayininde kullanılabiliirliği üzerine olan çalışmanın başarılı olması nedeniyle diğer pestisitler içinde uygulanabileceği söylenebilir. İmmobilize (GOx, AChE) dendronların çeşitli kataliz reaksiyonlarında kullanılabileceği gibi kantitatif ve kalitatif tayinlerde de kullanılabileceği önerilmektedir.

GOx enzimin raf ömrünü uzatmak için; Pt^{2+} iyonu içeren, AChE enziminin raf ömrünü uzatmak için ise Pd^{2+} iyonu içeren dendronların hazırlanması önerilmektedir.

İlk kez bu tez çalışmasında hazırlanan dendronlara immobilize edilen enzimlerin depolama kararlılığı ve tekrarlanabilirliğinin daha iyi iyileştirilmesi için buna benzer yeni dendronların hazırlanabileceği önerilebilir.



KAYNAKLAR

1. Newkome, G. R., Moorefield, C. N., Vögtle, F. (2001). *Dendrimers and dendrons, concepts, syntheses, applications* (First edition). Germany:Wiley-VCH Verlag GmbH, 342-345.
2. Astruc, D., Boisselier, E., Ornelas, C. (2010). Dendrimers designed for functions: From physical, photophysical and supramolecular properties to applications in sensing, catalysis, molecular electronics, photonics and nanomedicine. *Chemical. Reviews*, 110, 1857-1959.
3. Dandliker, P. J., Diederich, F., Gisselbrecht, J. P., Louati, A., Gross, M. (1995). Water-soluble dendritic iron porphyrins: synthetic models of globular heme proteins. *Angewandte Chemie International Edition*, 34, 2725-2728.
4. Gray, H. B., Wrinkler, J. R. (1996). Electron transfer in proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 65, 537-561.
5. Geiger, W. E. (2007). Organometallic electrochemistry: origins, development, and future. *Organometallics*, 26 (24), 5738-5765.
6. Ornelas, C., Ruiz, J., Belin, C., Astruc, D. (2009). Giant dendritic molecular electrochrome batteries with ferrocenyl and pentamethylferrocenyl termini. *Journal of the American Chemical Society*, 131, 590-601.
7. Buhleier, E.; Wehner, W., Vögtle, F. (1978). Cascade and nonskid-chain-like, syntheses of molecular cavity topologies. *Synthesis*, 1978,155-158.
8. Vögtle, F., Weber, E. (1974). Octopus molecules. *Angewandte Chemie International Edition*, 13, 814-816.
9. Maciejewski, M. (1982).Concepts of trapping topologically by shell molecules. *Journal of Macromolecular Science:Part A-Chemistry*,. 17, 689-703.
10. Tomalia, D. A., Naylor, A., Goddard, W. A. (1990). Starburst Dendrimers: Molecular-level control of size, shape, surface chemistry, topology, and flexibility from atoms to macroscopic matter. *Angewandte Chemie International Edition*, 29, 138-175.
11. De Gennes, P. G., Hervet, H. (1983). Statics of "starburst" polymers. *Journal of Physical Chemistry Letter*, 44, 351-360.
12. Tomalia, D. A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J., Smith P. (1985). Starburst-dendritic macromolecules. *Journal of Polymer*, 17, 117-132.
13. Newkome, G. R., Yao, Z. Q., Baker, G. R., Gupta, V. K. (1985). Cascade molecules: a new approach to micelles. A[27]-arborol. *Journal of Organic. Chemistry*, 50, 2003-2004.

14. Cancar, H. D., Söylemez, S., Akpınar, Y., Kesik, M., Göker, S., Günbaş, G., Volkan, M., Toppare, L. (2016). A novel Acetylcholinesterase biosensor: core-shell magnetic nanoparticles incorporating a conjugated polymer for the detection of organophosphorus pesticides. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8, 8058-8067.
15. Toit, L.C.D., Pillay, V., Choonara, Y.E. (2010). Nano-microbicides: challenges in drug delivery, patient ethics and intellectual property in the war against HIV/AIDS. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 18, 532-546.
16. Kaya, İ., Yıldırım, M., Kamacı, M. (2011). A new kind of optical Mn(II) sensor with high selectivity: Melamine based poly(azomethine-urethane). *Synthetic Metals*, 161, 2036-2040.
17. Grayson, S. M., Frechet, J. M. J. (2001). Divergent synthesis of dendronized poly-(p-hydroxystyrene). *Macromolecules*, 34, 6542-6544.
18. Gleick, C., J. (1987). *Making a New Science* (First edition). New York: Viking Penguin, 99.
19. Trahasch B., Frey, H., Lorenz, K., Stühn, B. (1999). Dielectric relaxation in carbosilane dendrimers with cyanobiphenyl end groups. *Colloid Polymer of Science*, 277, 1186-1192.
20. Vögtle F., Richardt G., Werner N. (2007). *Dendritische Moleküle : Konzepte, Synthesen, Eigenschaften, Anwendungen* (First edition). Germany: Wiesbaden: B.G. Teubner Verlag, 342.
21. Froehling, P.E. (2001). Dendrimers and dyes-a review. *Dyes and Pigments*, 48(3), 187-195.
22. Esfand, R., Tomalia, D.A. (2001). Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov Today*, 6(8), 427-436.
23. Klajnert, B., Bryszewska, M. (2001). Dendrimers: properties and applications. *Acta Biochimica Polonica*, 48(1), 199-208.
24. Sarkar, A., Kaganove, S.N., Dvornic, P.R., Satoh, P.S. (2005). Colorimetric biosensors based on polydiacetylene (PDA) and polyamidoamine (PAMAM) dendrimers. *Polymer News*, 30, 370-377.
25. Pavlov, G. M., Korneeva, E. V., Meijer, E. W. (2002). Molecular characteristics of poly (propylene imine) dendrimers as studied with translational diffusion and viscometry. *Colloid Polymer Science*, 280, 416-423.
26. Rodriguez, E., Freire, J. J., Echenique, G. R., Hernandez, C. J. G., Torre, J. G., (2007). Improved simulation method for the calculation of the intrinsic viscosity of some dendrimer molecules. *Polymer*, 48, 1155-1163.
27. Freire, J. J., Rodríguez, E., Rubio, A. M. (2005). Monte Carlo calculations for the intrinsic viscosity of several dendrimer molecules. *The Journal of Chemical Physics*. 123(154901), 1-14.

28. Caminati, G., Turro, N. J., Tomalia, D.A. (1990). Photophysical investigation of starburst dendrimers and their interactions with anionic and cationic surfactants. *Journal of American Chemical Society*, 112, 8515-8522.
29. Emrick, T.; Chang, H. T., Fréchet, J. M. J. (2000). The preparation of hyperbranched aromatic and aliphatic polyether epoxies by chloride-catalyzed proton transfer polymerization from AB(n) and A(2) + B-3 monomers. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 38, 4850.
30. Frey, H.; Schlenk, C. (2000). Silicon-based dendrimers. *Topics in Current Chemistry*, 210, 69-128.
31. Boas, U., Heegaard, P. M. (2004). Dendrimers in drug research. *Chemical Society Review*, 33, 43-63.
32. Misset, J. L., Bleiberg, H., Sutherland, W. (2000). Oxaliplatin clinical activity: a review, critical reviews in oncology-hematology. *Journal of Oncology*, 35, 75-93.
33. Agarwal, A., Asthana, A., Gupta, U., Jain, N. K. (2008). Tumour and dendrimers: a review on drug delivery aspects. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60, 671-688.
34. Tomalia, D. A., Baker, H., Dewald, J. R., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J., Smith, P. (1985). A new class of polymers. *Polymer-Journal*, 17, 117-132.
35. Cheng, Y., Xu, Z., Ma, M., Xu, T. (2008). Dendrimers as drug carriers: applications in different routes of drug administration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97, 123-143.
36. Agarwal, A., Saraf, S., Asthana, A., Gupta, U., Gajbhiye, V. (2008). Ligand based dendritic systems for tumor targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, 1, 3-13.
37. Hawker, C. J., Wooley, K. L., Fréchet, J. M. J. (1993). Unimolecular micelles and globular amphiphiles: dendritic macromolecules as novel recyclable solubilization agents. *Perkin trans. 1. J. Chem. Soc.*, 12, 1287-1297.
38. Grubbs, R. B.; Hawker, C. J.; Dao, J.; Fréchet, J. M. J. (1997). Zeitschriften. *Angewandte Chemie International Edition*, 36, 270-679.
39. Cuadrado, I., Mora'n, M., Casado, C.M., Alonso, B., Losada, J. (1999). Organometallic dendrimers with transition metals. *Coordination Chemistry Reviews*, 193(195), 395-445.
40. Lakshmi, N. V., Mandal, D., Ghosh, S., Prasad, E. (2014). Multi-stimuli-responsive organometallic gels based on ferrocene-linked poly(aryl ether) dendrons: reversible redox switching and Pb²⁺-Ion sensing. *ChemPubSociety Europe*, 20(29), 9002-9011.
41. Neerman, M. F. (2007). The efficiency of a PAMAM dendrimer toward the encapsulation of the antileukemic drug 6-mercaptopurine. *Anti-Cancer Drugs*, 18(7), 839-842.

42. Zhao, Y., Zhao, J., Chunying, H., Meihua, H., Wang, M. C., Guo, Y., Wang, X. (2016) Self-assembled thermosensitive nanoparticles based on oligoethylene glycol dendron conjugated doxorubicin: preparation, and efficient delivery of free doxorubicin. *Royal Society of Chemistry Advances*, 6(4), 2602-2610.
43. Reinhoudt, D. N. (2007, March). *Dendrimers as building blocks for nanofabrication*. Paper presented at the Second International Symposium on Trends in Nanoscience, Kloster Irsee.
44. Klajnert, B., Bryszewska, M. (2002). Fluorescence studies on PAMAM dendrimers interactions with bovine serum albumin. *Bioelectrochemistry*, 55, 33-35.
45. Tan, C., Tasaka, H., Kou-Ping, Y. (1967) Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease, clinical evaluation with special reference to childhood Leukemia. *Cancer*, 20, 333-353.
46. Ma, S., Zhou, J., Wali, A. R. M., He, Y., Xu, X., Tang, J. Z., Gu, J. Z. (2015). Self-assembly of pH-sensitive fluorinated peptide dendron functionalized dextran nanoparticles for on-demand intracellular drug delivery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26(219), 1-13.
47. Kolhe, P., Misra, E., Kannan, R. M., Kannan, S., Lieh-Lai, M. (2003). Drug complexation, in vitro release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 259, 143-160.
48. Vandamme, T. F., Brobeck, L. (2005). Poly(amidoamine) dendrimers as ophthalmic vehicles for ocular delivery of pilocarpine nitrate and tropicamide. *Journal of Controlled Release*, 20, 23-38.
49. Jain, N. K., Kesharwani, P., Gupta, U. (2012). A review of glycosylated carriers for drug delivery. *Biomaterials*, 33, 4166-4186.
50. Haensler, J., Szoka Jr. F. C. (1993). Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjugate Chemistry*, 4(5), 372-379.
51. Kelly, M. K., Foraker, A. B.; Kolhatkar, R. B., Swaan, P. W., Ghandehari, H. (2007). Endocytosis and interaction of poly(amidoamine) dendrimers with caco-2 cells. *Pharmaceutical Research*, 24(11), 2138-2145.
52. Seib, F. P., Jones, A. T., Duncan, R. (2007). Comparison of the endocytic properties of linear and branched PEIs, and cationic PAMAM dendrimers in B16f10 melanoma cells. *Journal of Controlled Release*, 117(3), 291-300.
53. Kelly, M. K., Kolhatkar, R. B., Swaan, P. W., Ghandehari, H. (2008). Endocytosis inhibitors prevent poly(amidoamine) dendrimer internalization and permeability across caco-2 Cells. *Molecular Pharmaceutics*, 5(2), 364-369.
54. Xiao, F., Liang, Y., Li, S., Gu, M., Yue, L. (2014). Electrochemical behavior of ferrocene-terminated hyperbranched polyurethane and its directly electrochemical sensing to glucose and ATP²⁻. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 733, 77-84.

55. Ando, T., Ito, K. (2014). Gelation properties of poly(aryl ether)dendrons bearing long alkyl chains. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 80, 285-294.
56. Kaya, C. (2011). *İnorganik kimya*. (Üçüncü Baskı, Cilt 1) Ankara: Palme Yayıncılık, 9-13.
57. Pauson, P. L., Kealy, T. J. (1951). A new type of organo-iron compound. *Nature*, 168 (4285) 1039-1040.
58. Miller, S. A., Tebboth J. A., Tremaine, J. F. (1952). Dicyclopentadienyliron. *Journal of Chemical Society*, 632-635.
59. Verep, G. (2013). *Bazı ferrosenil süstitüe 1,3,4-oksadiazol türevlerinin sentezi*, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
60. Wasi, N., Singh, H. B., Gajanana, A., Raichowdhary, A. N. (1987). Synthesis of metal-complexes of antimalarial-drugs and invitro evaluation of their activity against plasmodium-falciparum. *Inorganica Chimica Acta*, 135(2), 133-137.
61. Top, S., Vessieres, A., Leclerq, G., Quivy, J., Tang, J., Vaissermann, J., Huche, M., Jaouen, G. (2003). Synthesis, biochemical properties and molecular modelling studies of organometallic specific estrogen receptor modulators (SERMs), the ferrocifens and hydroxyferrocifens: Evidence for an antiproliferative effect of hydroxyferrocifens on both hormonedependent and hormone-independent breast cancer cell lines. *Chemistry - A European Journal*, 9(21), 5223-5236.
62. Vessieres, A., Top, S., Pigeon, P., Hillard, E., Boubeker, L., Spera, D., Jaouen, G. (2005). Modification of the estrogenic properties of diphenols by the incorporation of ferrocene. Generation of antiproliferative effects in vitro. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(12), 3937-3940.
63. Wang, J., Li, D., Yang, M., Zhang, Y. (2014). A novel ferrocene-tagged peptide nanowire for enhanced electrochemical glucose biosensing. *Analytical Methods*, 6, 7161-7165.
64. Pandey, P. C., Prakash, A. (2014). Electrochemistry of redox mediators encapsulated within organically modified silicate matrix in the presence of TiO₂ and palladium nanoparticles; application on electroanalysis of ascorbic acid. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 729, 95-102.
65. Sung, D., Yang, S. (2014). Facile method for constructing an effective electron transfer mediating layer using ferrocene-containing multifunctional redox copolymer. *Electrochimica Acta*, 133, 40-48.
66. Zhang, J., Chen, X., Yang, M. (2014). Enzyme modified peptide nanowire as label for the fabrication of electrochemical immunosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 196, 189-193.

67. Daeneke, T., Mozer, A. J., Kwon, T., Duffy, N. W., Holmes, A. B., Bach, U., Spiccia, L. (2012). Dye regeneration and charge recombination in dye-sensitized solar cells with ferrocene derivatives as redox mediators. *Energy Environmental. Science*, 5(5), 7090-7099.
68. Karagöllü, O., Görür, M., Gode, F., Şennik, B., Yılmaz, F. (2014). Phosphate ion sensors based on triazole connected ferrocene moieties. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 193, 788-798.
69. Bunte, C., Hussein, L., Urban, G. A. (2014). Performance of non-compartmentalized enzymatic biofuel cell based on buckypaper cathode and ferrocene-containing redox polymer anode. *Journal of Power Sources*, 247, 579-586.
70. Takahashi, S., Anzai, J. I. (2013). Recent progress in ferrocene-modified thin films and nanoparticles for biosensors. *Materials*, 6, 5742-5762.
71. Moyo, M., Okonkwo, J.O., Agyei, N.M. (2012). Recent advances in polymeric materials used as electron mediators and immobilizing materials in developing enzyme electrodes. *Sensors*, 12, 923-953.
72. Kang, D., Zuo, X., Yang, R., Xia, F., Plaxco, K.W., White, R.J. (2009). Comparing the properties of electrochemical-based DNA sensors employing different redox tags. *Analytical Chemistry*, 81, 9109-9113.
73. Song, M. J., Lee, S. K., Lee, J.Y., Kim, J. H., Lim, D. S. (2012). Electrochemical sensor based on Au nanoparticles decorated boron-doped diamond electrode using ferrocene-tagged aptamer for proton detection. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 677, 139-144.
74. Lawal, A. T., Adeloju, S. B. (2012). Mediated xanthine oxidase potentiometric biosensors for hypoxanthine based on ferrocene carboxylic acid modified electrode. *Food Chemistry*, 135(4), 2982-2987.
75. Deng, H., Shen, W., Gao, Z. (2012). Synthesis of water-soluble and cross-linkable ferrocenyl redox polymers for uses as mediators in biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 168, 238-242.
76. Indzhgiya, E. Y., Ponamoreva, O. N., Alferov, V. A., Reshetilov, A. N., Gorton, L. (2012). Interaction of ferrocene mediators with gluconobacter oxydans immobilized whole cells and membrane fractions in oxidation of ethanol. *Electroanalysis*, 24(4), 924-930.
77. Iijima, S., Kato, D., Yabuki, S., Niwa, O., Fumio, M. (2011). Enzymatically amplified electrochemical detection for lipopolysaccharide using ferrocene-attached polymyxin B and its analogue. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5) 2080-2084.
78. Cheng, Z., Xu, P., Guo, B., Qiu, Y., Fan, H., Chang, X., Ren, B. (2015). Synthesis and characterization of a novel ferrocenyl-terminated percec-type dendron and application for redox batteries. *Ionics*, 21, 1489-1494.

79. Bunte, C., Prucker, O., König, T., Rühe, J. (2010). Enzyme containing redox polymer networks for biosensors or biofuel cells: A photochemical approach. *Langmuir*, 26(8), 6019-6027.
80. Bennett, T. P., Frieden, E. (1969). *Modern topics in biochemistry*. (First edition). London : Macmillan, 43-45.
81. Holum, J. (1968). *Elements of general and biological chemistry* (Second Edition). New York: Wiley, 377.
82. Martinek, R. (1969). Practical Clinical Enzymology. *The American Journal of Medical Technology*, 31, 162.
83. Harrow, B., Mazur, A. (1958). *Textbook of biochemistry* (First edition). Philadelphia: Saunders, 109.
84. Pfeiffer, J. (1954). *Enzymes, the physics and chemistry of life* (First edition). New York: Simon-Schuster, 171-173.
85. Özdem, N. (2013). *Polistren Tabanlı Schiff Bazlarının Sentezi ve İmmobilizasyon Uygulamaları*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
86. Illanes, A., (2008). *Enzyme biocatalysis: principles and applications* (First edition). Chile: Business Media, 391.
87. Cheng, Z., Xu, P., Guo, B., Qiu, Y., Fan, H., Chang, X., Ren, B. (2015). Synthesis and characterization of a novel ferrocenyl-terminated percec-type dendron and application for redox batteries. *Ionics*, 21, 1489-1494.
88. Hatzinikolaou, D. G., Hansen, O. C., Macris, B. J., Tingey, A., Kekos, D., Goodenough, P. (1996). A new glucose oxidase from *Aspergillus niger* characterization and regulation studies of enzyme and gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46, 371-381.
89. Sukhacheva, M. V., Davydova, M. E., Netrusov, A. I. (2004). Production of penicillium funiculosum 433 glucose oxidase and its properties. *Applied Biochemistry Microbiology*, 40(1), 25-29.
90. Hatzinikolaou, D. G., Macris, B. J. (1995). Factors regulating production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 530-534.
91. Witt, S, Wohlfahrt, G., Schomburg, D., Hecht, H., Kalisz, H. (2000). Conserved arginine-516 of Penicillium amagasakiense glucose oxidase is essential for the efficient binding of β -D-glucose. *Journal of Biochemistry*, 347, 553-559.
92. Hasanoğlu Özkan, E., Kurnaz Yetim, N., Nartop, D., Sarı, N. (2015). Influence of load on the recycling stability of nanospheres attached platinumium II / IV for determination of glucose. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 25, 180-185.

93. Petruccioli, M., Federici, F., Bucke, C., Keshavarz, T. (1999). Enhancement of glucose oxidase production by *Penicillium variabile* P16. *Enzyme and Microbial Technology*, 24, 397-401.
94. Pluschkell, S., Hellmuth, K., Rinas, U. (1996). Kinetics of glucose oxidase excretion by recombinant *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Bioengineering*, 51, 215-220.
95. Gerritsen, M., Kros, A., Lutterman, J., Nolte, R., Jansen, J. (2001). A percutaneous device as model to study the in vivo performance of implantable amperometric glucose sensors. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 12(2),129-134.
96. Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S., Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase - An overview. *Biotechnology Advances*, 27, 489-501.
97. Wohlfahrt, G., Witt, S., Hendle, J., Schomburg, D., Kalisz, H., Hecht, H. (1999). 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 55, 969-977.
98. Chang, M. S., Strichartz, G. R., (2005). *Cholinergic pharmacology principles of pharmacology* (First edition). New York: Wolters Kluwer Company, 89-93.
99. Schaffer, N. K., Michel, H. O., Bridges, A. F. (1973). Amino acid sequence in the region of the reactive serine residue of eel acetylcholinesterase. *Biochemistry*, 12, 2946-2950.
100. Froede, H. C., Wilson, I. B. (1971). *In the enzymes* (Third edition). New York: Boyer Academic, 87-114.
101. Taylor, P., Gillman, A. G., Goodman, L. S., Murad, F. (1985). *In Pharmacological basis of therapeutics* (Seventh edition). New York: MacMillan, 110-129.
102. Quinn, D. M. (1987). Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews American Chemical Society*, 87, 955-979.
103. Schegg, K. M., Harrington, L. S., Neilsen, S., Zweig, R. M., Peacock, J. H. (1992). Soluble and membrane-bound forms of brain acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 13(6), 697-704.
104. Öcal, B. L. (2007). *Poli(vinil alkol)-kalsiyum aljinat, poli(n-izopropilakrilamit) - kalsiyum aljinat kürelerine β -Galaktosidaz immobilizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2, 3, 9-11.
105. Guisan, J. M. (2006). *Methods in biotechnology: immobilization of enzymes and cells* (Second edition). New Jersey: Totawa Humana Press Inc, 15-26.
106. Fatoni, A., Numnuam, A., Kanatharana, P., Limbut, W., Thammakhet, C., Thavarungkul, P. (2013). A highly stable oxygen-independent glucose biosensor based on a chitosan-albumin cryogel incorporated with carbon nanotubes and ferrocene. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 185, 725-734.

107. Shim, J., Kim, G. Y., Moon, S. H. (2011). Covalent co-immobilization of glucose oxidase and ferrocenedicarboxylic acid for an enzymatic biofuel cell. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 653(1), 14-20.
108. Reitingner, A. A., Hutter, N. A., Donner, A., Steenackers, M., Williams, O. A., Stutzmann, M., Jordan, R., Garrido, J. A. (2013). Functional polymer brushes on diamond as a platform for immobilization and electrical wiring of biomolecules. *Advanced Functional Materials*, 23, 2979-2986.
109. Qiu, J. D., Huang, J., Liang, R. P. (2011). Nanocomposite film based on graphene oxide for high performance flexible glucose biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 160 (1), 287-294.
110. Şenel, M. (2011). Construction of reagentless glucose biosensor based on ferrocene conjugated polypyrrole. *Synthetic Metals*, 161, 1861-1868.
111. Barik, M. A., Deka, R., Dutta, J. C. (2016). Carbon nanotube-based dual-gated junctionless field-effect transistor for Acetylcholine detection. *IEEE Sensors Journal*, 16(2), 280-286.
112. Muñoz, J., Jimenez, C., Bratov, A., Bartroli, J., Alegret, G., Dominguez, C. (1997). Photosensitive polyurethanes applied to the development of chemfet and enfet devices for biomedical sensing. *Biosensors Bioelectron*, 12(7), 577-585.
113. Dutta, J. C. (2012). Ion sensitive field effect transistor for applications in bioelectronic sensors, a research review. *Computitation. Intell. Signal Process*, 185, 191.
114. Bergveld, P. (1970). Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 17(1), 70-71.
115. Cheng, F., Wan, W. M., Zhou, Y., Sun, X. L., Bonder, E. M., Jäkle, F. (2015). Borinic acid block copolymers: new building blocks for supramolecular assembly and sensory applications. *Polymer Chemistry*, 6, 4650-4656.
116. Costa, L. G. (1997). Basic toxicology of pesticides. *Occupational Medicine*, 12, 251.
117. Adams, M. S. (2002). *Biological indicators of aquatic ecosystem stress* (First edition). Maryland Bethesda: American Fisheries Society, 644.
118. Rekha, K., Murthy, B. N. (2008). Studies on the immobilisation of acetylcholine esterase enzyme for biosensor applications. *Food and Agricultural Immunology*, 19(4), 273-281.
119. Vakurov, A., Simpson, C. E., Daly, C. L., Gibson, T. D., Millner, P. A. (2005). Acetylcholinesterase-based biosensor electrodes for organophosphate pesticide detection II. Immobilization and stabilization of acetylcholinesterase. *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 2324-2329.

120. Zejli, H., Hidalgo, J. L., Hidalgo, C., Rodriguez, I. N., Liu, B., Temsamani, K. R., Marty, J. L. (2008). Alumina sol-gel/sonogel-carbon electrode based on acetylcholinesterase for detection of organophosphorus pesticides. *Talanta*, 77, 217-221.
121. Periasamy, A. P., Umasankar, Y., Chen, S. M. (2009). Review nanomaterials-acetylcholinesterase enzyme matrices for organophosphorus pesticides electrochemical sensors: a review. *Sensors*, 9, 4034-4055.
122. Ebrahimi, B., Shojaosadati, S. A., Mousavi, S. M. (2010). Evaluation and optimization of factors affecting the performance of a flow-through system based on immobilized acetylcholinesterase as a biosensor. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15, 383-391.
123. Ebrahimi, B., Shojaosadati, S. A., Ranaie, S. O., Mousavi, S. M. (2010). Optimization and evaluation of acetylcholine esterase immobilization on ceramic packing using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 45, 81-87.
124. Norouzy, A., Rezaei, M. H., Qujeq, D., Vatani, M., Badiei, A. (2010). Adsorptive immobilization of acetylcholine esterase on octadecyl substituted porous silica: optical bio-analysis of carbaryl. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 31(1), 157-161.
125. Chauhan, N., Narang, J., Pundir, C. S. (2011). Immobilization of rat brain acetylcholinesterase on porous gold-nanoparticle-CaCO₃ hybrid material modified Au electrode for detection of organophosphorous insecticides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49, 923-929.
126. Santi, A., Menezes, C., Duarte, M. M. F., Leitemperger, J., Lopes, T., Loro, V. L. (2011). Oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in human erythrocytes exposed to clomazone (in vitro). *Interdisciplinary Toxicology*, 4(3), 149-153.
127. Han, D. Y., Jeong, C. Y., Lee, J. H., Lee, D. S., Yoon, H. C. (2012). Microchip-based organophosphorus detection using bienzyme bioelectrocatalysis. *Japanese Journal of Applied Physics*, 51, 1-7.
128. Gholami-Seyedkolaei, S. J., Mirvaghefi, A., Farahmand, H., Kosari, A. A. (2013). Effect of a glyphosate-based herbicide in *Cyprinus carpio*: Assessment of acetylcholinesterase activity, hematological responses and serum biochemical parameters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 135-141.
129. Siriviriyanun, A., Imae, T., Nagatani, N. (2013). Electrochemical biosensors for biocontaminant detection consisting of carbon nanotubes, platinum nanoparticles, dendrimers, and enzymes. *Analytical Biochemistry*, 443, 169-171.
130. Oujji, N. B., Bakas, I., Istamboulié, G., Ait-Ichou, I., Ait-Addi, E., Rouillon, R., Noguer, T. (2013). Sol-gel immobilization of acetylcholinesterase for the determination of organophosphate pesticides in olive oil with biosensors. *Food Control*, 30, 657-661.

131. Oujji, N. B., Bakas, I., Istamboulié, G., Ait-Ichou, I., Ait-Addi, E., Rouillon, R., Noguer, T. (2014). A simple colorimetric enzymatic-assay, based on immobilization of acetylcholinesterase by adsorption, for sensitive detection of organophosphorus insecticides in olive oil. *Food Control*, 46, 75-80.
132. Kaur, N., Thakur, H., Pathak, S., Prabhakar, N. (2015). Acetylcholinesterase immobilised eggshell membrane-based optical biosensor for organophosphate detection. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 95(12), 1134-1147.
133. Ju, K. J., Feng, J. X., Feng, J. J., Zhang, Q. L., Xu, T. Q., Wei, J., Wang, A. J. (2015). Biosensor for pesticide triazophos based on its inhibition of acetylcholinesterase and using a glassy carbon electrode modified with coral-like gold nanostructures supported on reduced graphene oxide. *Microchimica Acta*, 182, 2427-2434.
134. Cancar, H. D., Söylemez, S., Akpınar, Y., Kesik, M., Göker, S., Günbaş, G., Volkan, M., Toppare, L. (2016). A novel Acetylcholinesterase biosensor: core-shell magnetic nanoparticles incorporating a conjugated polymer for the detection of organophosphorus pesticides. *Applied Materials & Interfaces*, 8, 8058-8067.
135. Zhang, Q., Xu, Q., Guo, Y., Sun, X., Wang, X. (2016). Acetylcholinesterase biosensor based on the mesoporous carbon/ferroferric oxide modified electrode for detecting organophosphorus pesticides. *Royal Society of Chemistry*, 6, 24698-24703.
136. Nie, Z., Nijhuis, C. A., Gong, J., Chen, X., Kumachev, A., Martinez, A. W., Narovlyanskya, M., Whitesides, G. M. (2010). Electrochemical sensing in paper-based microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 10, 477-483.
137. Solomons, G., Fryhle, C. (2000). *Organic Chemistry* (Seventh edition). New York: Wiley, 120.
138. Geary, W. S. (1970). The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterization of coordination compounds. *Coordination Chemistry*, 7, 81-122.
139. Chandra, S., Jain, D., Sharma, A. K., Sharma, P. (2009). Coordination modes of a Schiff base pentadentate derivative of 4-Aminoantipyrine with cobalt (II), nickel (II) and copper(II) metal ions: Synthesis, spectroscopic and antimicrobial studies. *Molecules*, 14, 174-190.
140. Dutta, S., Roy, M.S., Verma, M. (2009). Anthelmintic activity of some 2-substituted 4,5-diphenyl imidazole. *Indian Drugs*, 46(7), 50-53.
141. Trinder, P. (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry.*, 6, 24-25.
142. Özdem, N., Hasanoğlu Özkan, E., Sarı, N., Arslan, F., Tümtürk, H. (2014). Immobilization of glucose oxidase attached to new nanospheres including azomethine. *Macromolecular Research*, 22(12), 1282-1287.
143. Vasonconcelos, A. (2007). Could type 2 diabetes be reversed using surgery. *New Scientist*, 2619, 11-13.

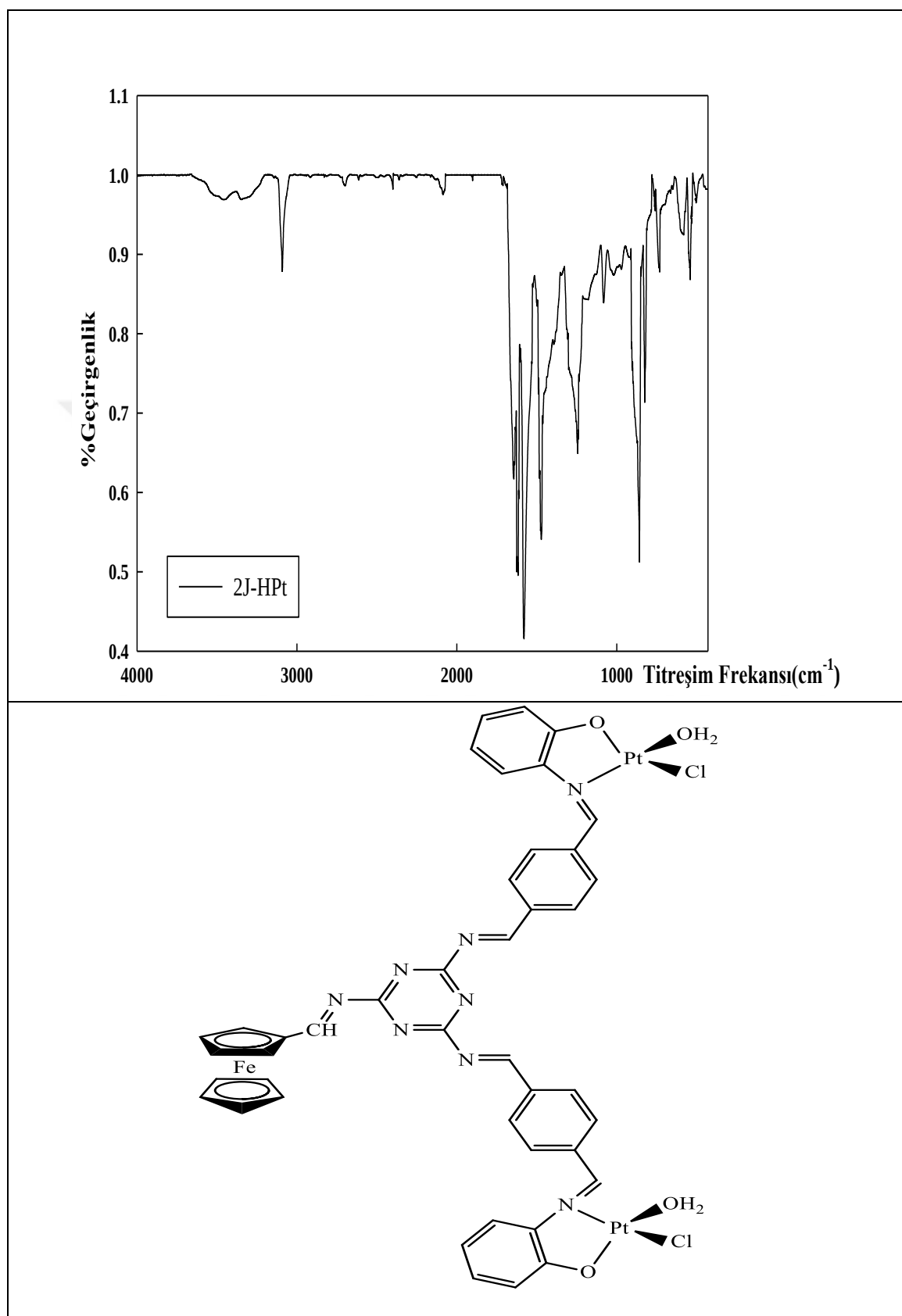
144. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Robert, M. (1961). Featherstone. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
145. Erdik, E. (2007). *Denel Organik Kimya* (Dördüncü Baskı). Ankara: Gazi Kitabevi, 110-185.
146. Karaböcek, N., Karaböcek, S., Mazlum, H., Değirmencioğlu, İ., Serbest, K. (2004). Synthesis and characterization of Cu(II) complexes of two ligands derived from malonyl dichloride. *Turkish Journal of Chemistry*, 28, 87-94.
147. Souza, G. D., Rodrigues, M. A., Silva, P. P., Maia, E. C. P., Botelho, F. V., Campos, T. A. (2013). A new complex of palladium (II) with 2- Furoic hydrazide: synthesis, characterization, theoretical calculations and biological studies. *Croatica Chemica Acta*, 86(2), 201-206.
148. El-Sayed, B. A., Abo Aly, M. M., Emara, A. A. A., Khalil, S. M. E. (2002). Synthesis and structural study of the ligand o-OH acetophenone azine and its Cu(II), Ni(II), Co(II) and Zn(II) complexes. *Vibrational Spectroscopy*, 30, 93-100.
149. Mathiyalagan, K., Gopal, S., Ramasamy, E., Vennila, T. (2012). In-vitro antimicrobial screening of ferrocene derived compounds. *International Journal of ChemTech Research*, 4(4), 1775-1781.
150. Gök, Y., Bekaroğlu, Ö. (1981). The synthesis and complex formation of stereoisomers of some new Vic-dioximes. *Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry*, 11, 62.
151. Mardani, H. R., Golchoubian, H. (2006). Selective and efficient C-H oxidation of alkanes with hydrogen peroxide catalyzed by a manganese (III) schiff base complex. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 259, 197-200.
152. Hollman, T. R., Hendrich, M. P., Que, L. (1992). EPR studies of dinickel complex in its (II, III) and (II, III) oxidation states. *Inorganic Chemistry*, 31, 937-939.
153. Manonmani, J., Kandaswamy, M., Narayanan, V., Thirumurugan, R., Raj, S. S. S., Shanmugam, G., Ponnuswamy, M. N., Fun, H. K. (2001). Synthesis of copper(II) and nickel(II) complexes using compartmental ligands: X-ray, electrochemical and magnetic studies. *Polyhedron*, 20, 3039-3048.
154. Al-Saif, F. A., Refat, S. (2012). Ten metal complexes of vitamin B₃/niacin: Spectroscopic, thermal, antibacterial, antifungal, cytotoxicity and antitumor studies of Mn(II), Fe(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Pd(II), Cd(II), Pt(IV) and Au (III) complexes. *Journal of Molecular Structure*, 1021, 40-52.
155. Wayland, B. B., Schramm, R. F. (1969). Cationic and neutral chloride complexes of palladium(II) with the nonaqueous solvent donors acetonitrile, dimethyl sulfoxide, and a series of amides. Mixed sulfur and oxygen coordination sites in a dimethyl sulfoxide complex. *John Harrison Lab. of Chemistry*, 8(4), 971.

156. Souza, G. D., Rodrigues, M. A., Silva, P. P., Maia, E. C. P., Botelho, F. V., Campos, T. A., Franca, E. F., Almeida, K. J., Guerra, W. (2013). A new complex of palladium (II) with 2- furoic hydrazide: synthesis, characterization, theoretical calculations and biological studies. *Croatica Chemica Acta*, 86(2), 201-206.
157. Leskovaca, V., Trivic, S., Wohlgahrt, G., Kandrak, J., Pericin, D. (2005). *Tje International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37, 731-750.
158. Massoulie, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., Valette, F. M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology*, 41(1), 31-91.
159. Sussman, J. L., Harel, M., Frolov, F., Oefner, C., Goldman, A. (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo californica: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 253(5022), 872-879.
160. Barak, D., Kronman, C., Ordentlich, A., Ariel, N., Bromberg, A. (1994). Acetylcholinesterase peripheral anionic site degeneracy conferred by aminoacid arrays sharing a common core. *The Journal of Biological Chemistry*., 269(9), 6296-6305.
161. Radic, Z., Pickering, N. A., Vellom, D. C., Camp, S., Taylor, P. (1993). Tree distinct domains in the cholinesterase inhibitors. *Biochemistry*, 32(45), 12074-12084.
162. Zhang, Y., Kua, J., Mc Cammon, J. A. (2002). Role of catalytic triad and oxyanion hole in Acetylcholinestrace catalysis: An ab initio QM/MM study. *Journal of the American Chemical Society*, 124(35), 10572-10577.
163. Pezzementi, L., Johnson, K., Tsigelny, I., Cotney, J. (2003). Amino acids defining the acyl pocket of an invertebrate cholinesterase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 136(4), 813-832.
164. Koellner, G., Kryger, G., Millard, C. B., Silman, I., Sussman, J. L. (2000). Active-site gorge and buried water molecules in crystal structures of acetylcholinesterase from torpedo californica. *Journal of Molecular Biology*, 296(2), 713-735.
165. Lineweaver, L., Burk, D. (1934). The Determination of enzyme dissociation constant. *Journal of the American Chemical Society*, 56, 658-666.
166. Hasanoğlu Özkan, E., Kurnaz Yetim, N., Tümtürk, H., Sarı, N. (2015). Immobilization of Acetylcholinesterase for the determination of pesticides, nanoparticles attached Pt(II) and Pt(IV). *Dalton Transactions*, 44, 16865-16872.

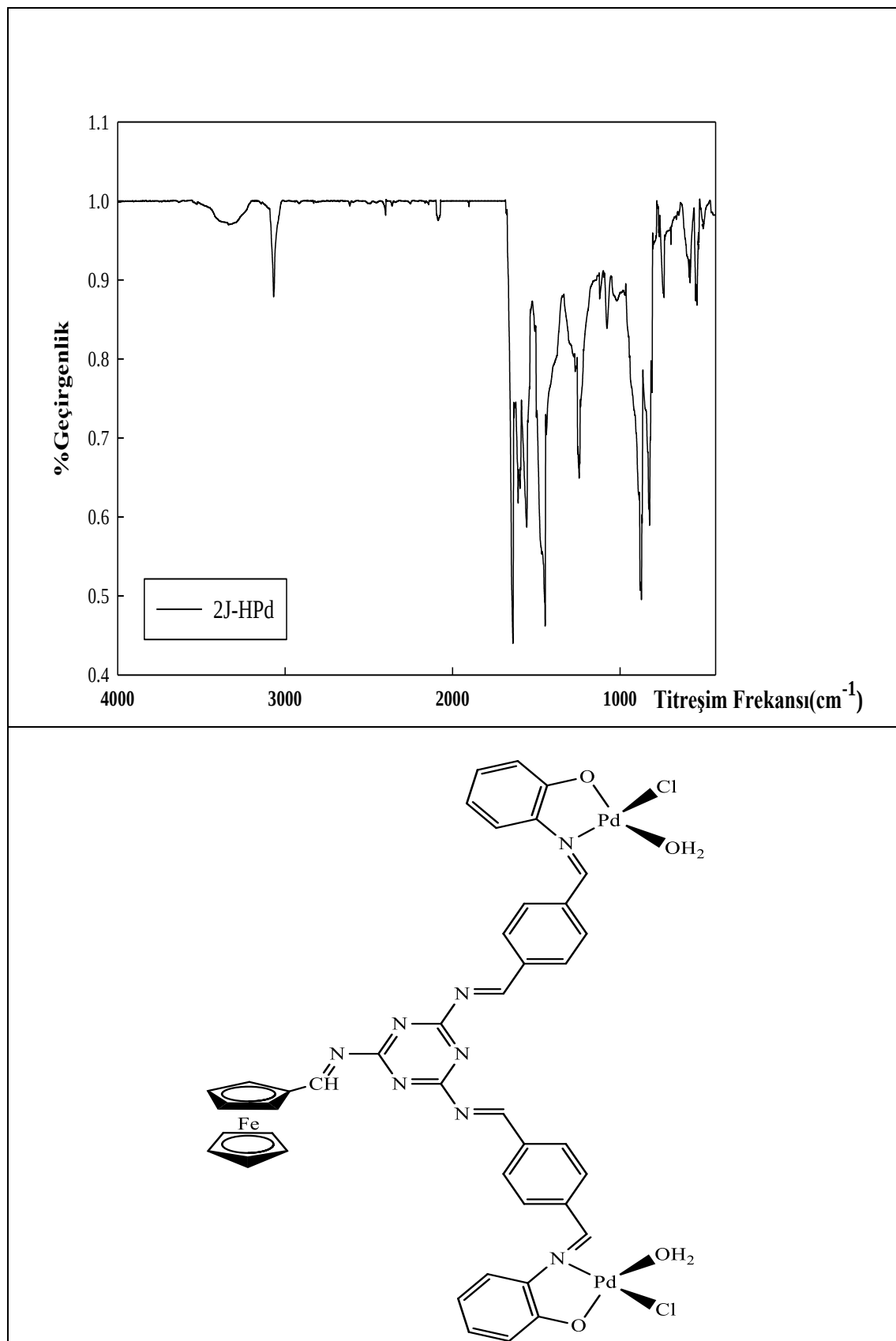


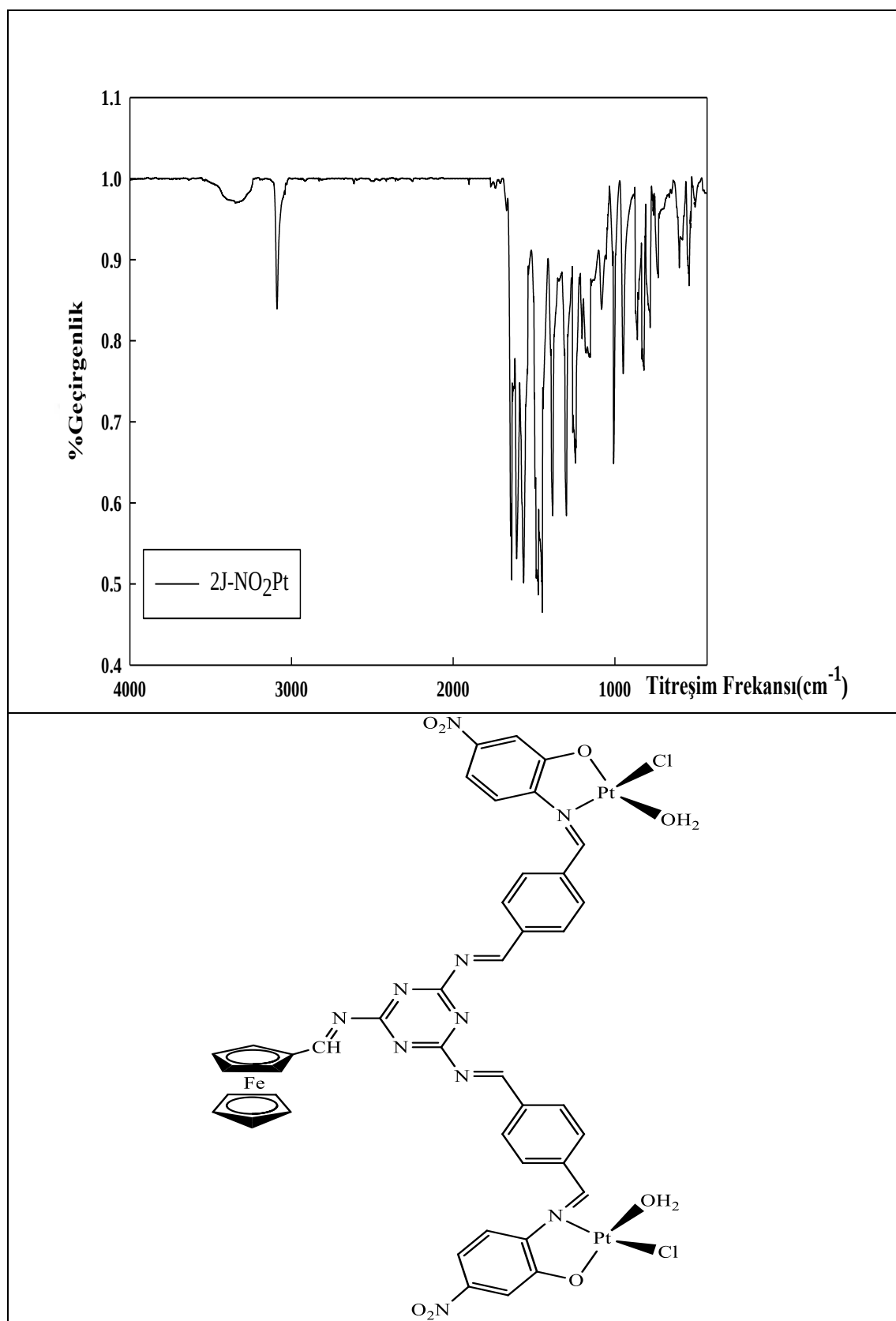


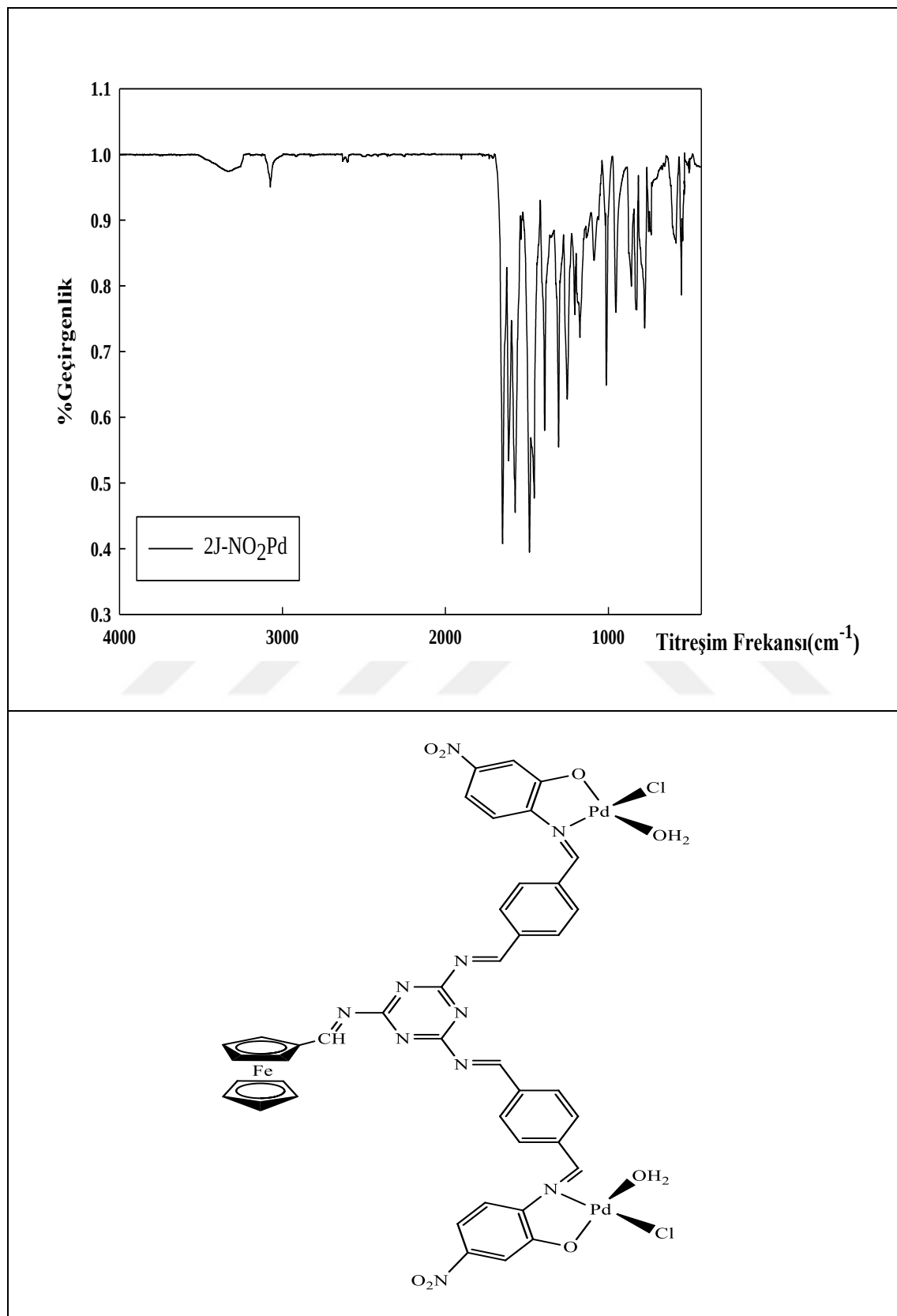
EK-1. 2J-HPt dendronunun FT-IR spektrumu

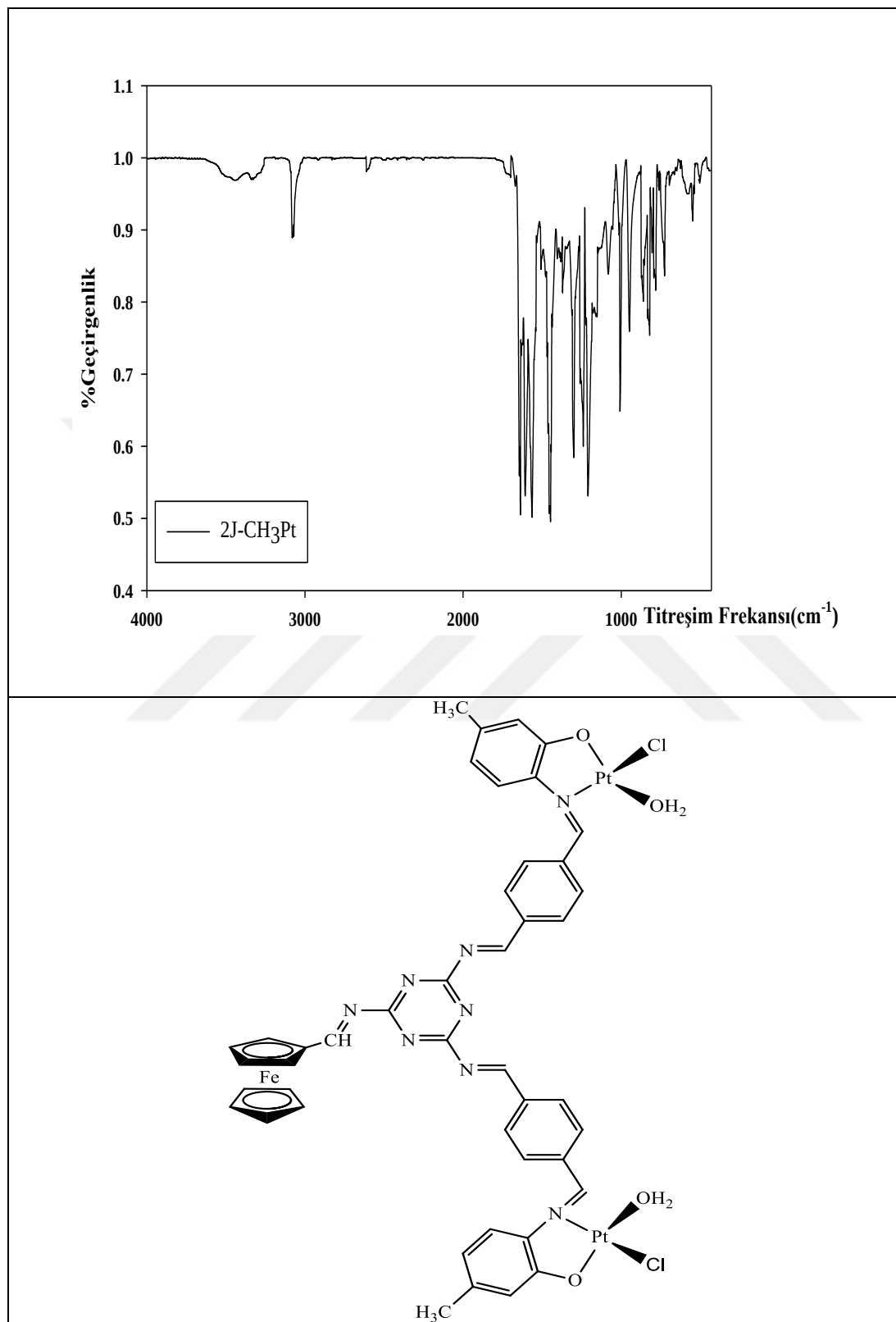


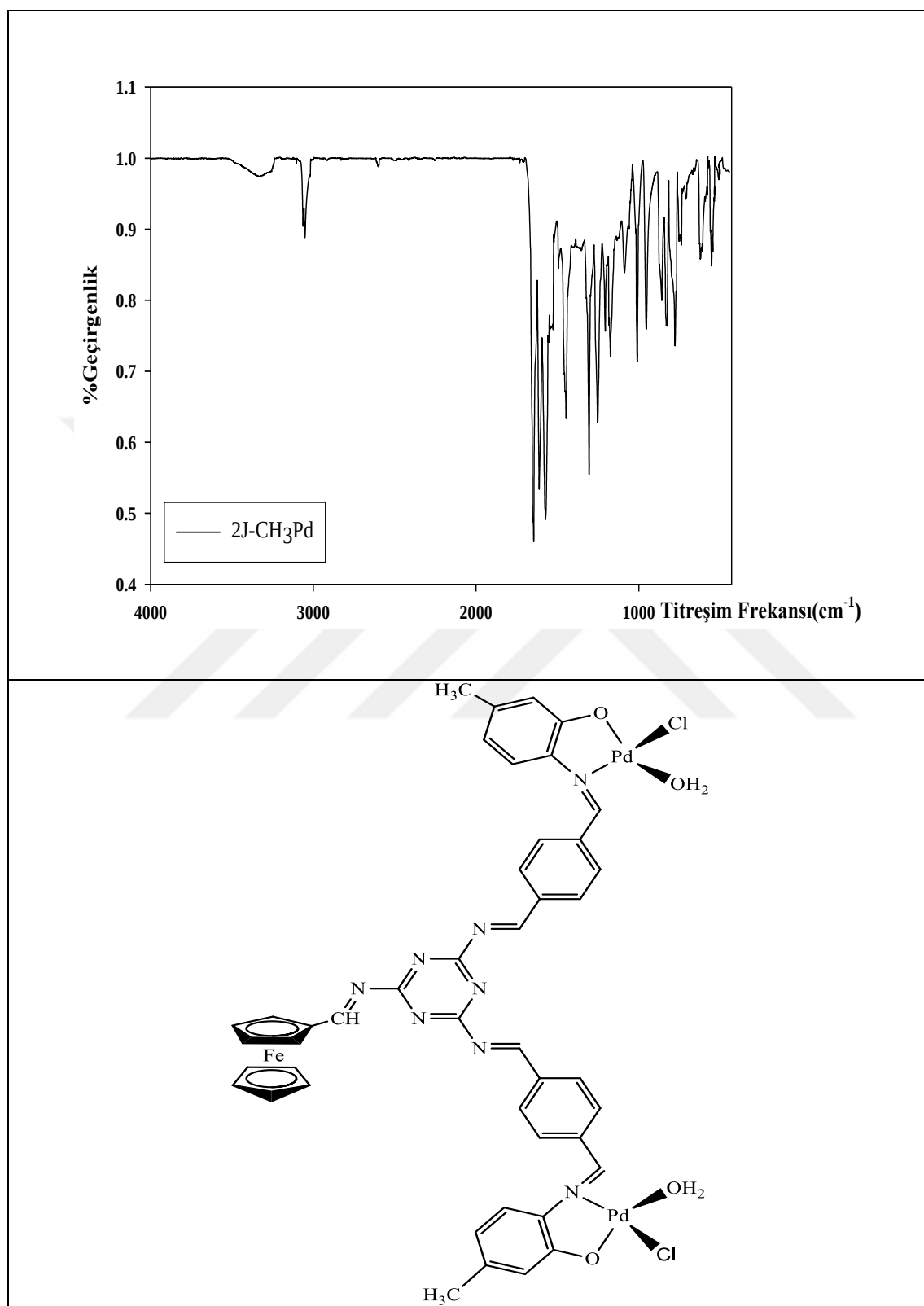
EK-2. 2J-HPd dendronunun FT-IR spektrumu



EK-3. 2J-NO₂Pt dendronunun FT-IR spektrumu

EK-4. 2J-NO₂Pd dendronunun FT-IR spektrumu

EK-5. 2J-CH₃Pt dendronunun FT-IR spektrumu

EK-6. 2J-CH₃Pd dendronunun FT-IR spektrumu

EK-7. Elementel analiz sonuç raporları

	ORTA DOĞU TEKNİK ÜNİVERSİTESİ MERKEZ LABORATUVARI AR-GE EĞİTİM VE ÖLÇME MERKEZİ Üniversiteler Mah. Dumlupınar Blv. No:1, 06800 Çankaya Ankara/TÜRKİYE Tel: +90 312 210 64 21 Fax: +90 312 210 64 25 e-posta: merlab@metu.edu.tr http://www.merlab.odtu.edu.tr																																										
DENEY RAPORU ANALYSIS REPORT																																											
DENEY SONUÇLARI – ANALYSIS RESULTS																																											
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="width: 30%;">Numune Bilgileri</th> <th style="width: 10%;">Numune Adı</th> <th style="width: 10%;">%C</th> <th style="width: 10%;">%H</th> <th style="width: 10%;">%N</th> <th style="width: 10%;">%S</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>01-FeM-14414</td> <td>01</td> <td>45,02</td> <td>4,12</td> <td>35,05</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>02-FePt-14414</td> <td>02</td> <td>40,39</td> <td>3,47</td> <td>9,89</td> <td>0,10</td> </tr> <tr> <td>03-FePt(II)-14414</td> <td>03</td> <td>34,99</td> <td>3,49</td> <td>10,34</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>04-FePt(IV)-14414</td> <td>04</td> <td>32,97</td> <td>3,02</td> <td>9,65</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>05-1Fe2M-14414</td> <td>05</td> <td>53,18</td> <td>5,50</td> <td>18,91</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>06-FEM-14414</td> <td>06</td> <td>52,13</td> <td>5,03</td> <td>26,30</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table>		Numune Bilgileri	Numune Adı	%C	%H	%N	%S	01-FeM-14414	01	45,02	4,12	35,05	-	02-FePt-14414	02	40,39	3,47	9,89	0,10	03-FePt(II)-14414	03	34,99	3,49	10,34	-	04-FePt(IV)-14414	04	32,97	3,02	9,65	-	05-1Fe2M-14414	05	53,18	5,50	18,91	-	06-FEM-14414	06	52,13	5,03	26,30	-
Numune Bilgileri	Numune Adı	%C	%H	%N	%S																																						
01-FeM-14414	01	45,02	4,12	35,05	-																																						
02-FePt-14414	02	40,39	3,47	9,89	0,10																																						
03-FePt(II)-14414	03	34,99	3,49	10,34	-																																						
04-FePt(IV)-14414	04	32,97	3,02	9,65	-																																						
05-1Fe2M-14414	05	53,18	5,50	18,91	-																																						
06-FEM-14414	06	52,13	5,03	26,30	-																																						

Bu rapor, MERLAB' ın yazılı izni olmadan kısmen de olsa kopyalanıp çoğaltılamaz. Sonuçlar sadece deneyi yapılan numuneye aittir. İmzasız raporlar geçersizdir. This report can not be partially copied or reproduced without official permission of MERLAB. The results only belong to the analysed sample. The reports without asignature are unvalid.

FRM-NKB-03 Rev.No/Tarih: 00/-

2/2

EK-7.(devam) Elementel analiz sonuç raporları

	ORTA DOĞU TEKNİK ÜNİVERSİTESİ MERKEZ LABORATUVARI AR-GE EĞİTİM VE ÖLÇME MERKEZİ Üniversiteler Mah. Dumlupınar Blv. No:1, 06800 Çankaya Ankara/TÜRKİYE Tel: +90 312 210 64 21 Fax: +90 312 210 64 25 e-posta: merlab@metu.edu.tr http://www.merlab.odtu.edu.tr
	DENEY RAPORU ANALYSIS REPORT

DENEY SONUÇLARI – ANALYSIS RESULTS

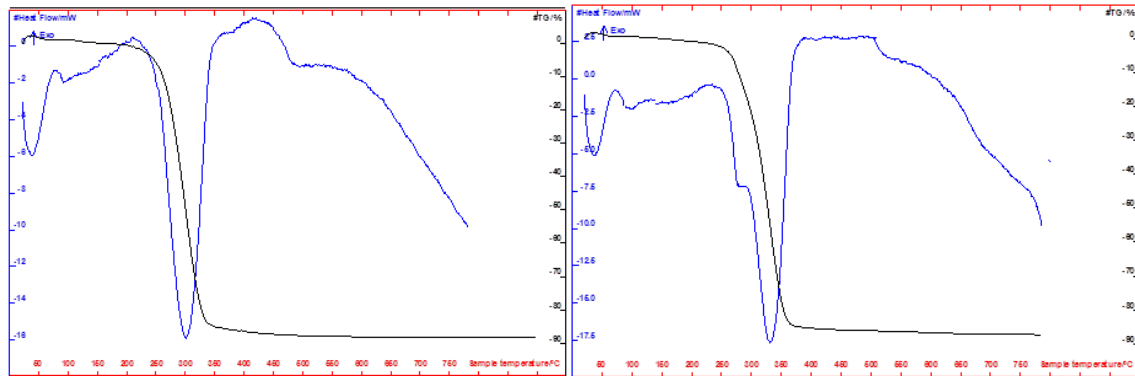
Numune Bilgileri	Numune Adı	%C	%H	%N
1NO2-Pt(II)-14766-01	01	32,79	3,06	12,35
2NO2-Pt(IV)-14766-02	02	29,94	2,61	11,11
3CH3-Pt(II)-14766-03	03	35,40	3,81	10,60
4CH3-Pt(IV)-14766-04	04	32,94	3,12	9,60
NO2PdII-14766-05	05	43,05	3,08	12,43
NO2PtII-14766-06	06	37,60	3,12	10,77
CH3PdII-14766-07	07	49,01	4,09	10,05
CH3PtII-14766-08	08	41,11	3,63	9,07
HPdII-14766-09	09	47,60	4,00	11,06

Bu rapor, MERLAB'ın yazılı izni olmadan kısmen de olsa kopyalanıp çoğaltılamaz. Sonuçlar sadece deneyi yapılan numuneye aittir. İmzasız raporlar geçersizdir. This report can not be partially copied or reproduced without official permission of MERLAB. The results only belong to the analysed sample. The reports without asignature are unvalid.

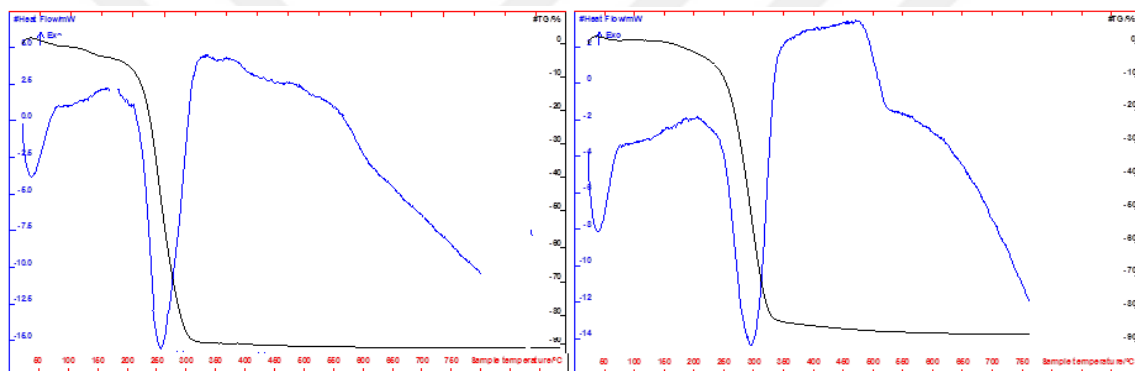
FRM-NKB-03 Rev.No/Tarih: 00/-

2/2

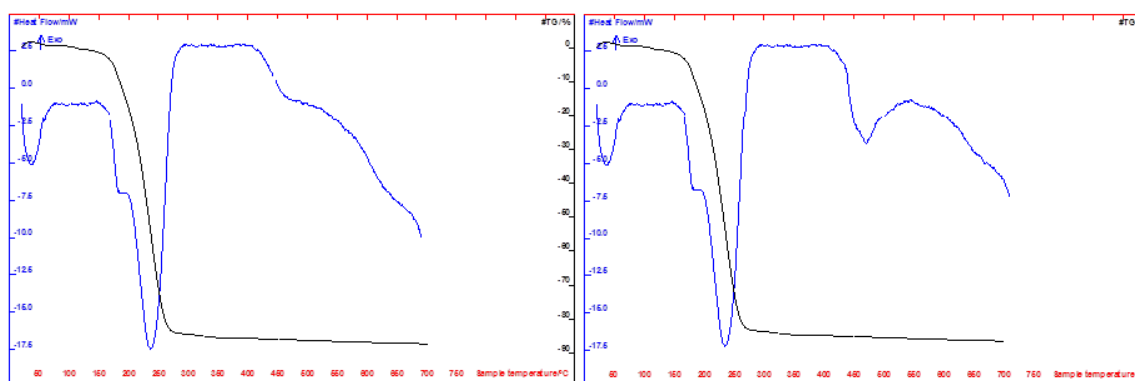
EK-8. Dendronların TGA eğrileri



2J-HPt

2J-NO₂Pt2J-CH₃Pt

2J-HPd

2J-NO₂Pd2J-CH₃Pd



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Industrial and Engineering Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jiec

Influence of load on the recycling stability of nanospheres attached platinum ion for determination of glucose

Elvan Hasanoğlu Özkan^a, Nurdan Kurnaz Yetim^{a,b}, Dilek Nartop^c, Nurşen Sarı^{a,*}^a Department of Chemistry, Faculty of Science, Gazi University, Teknikokullar, Ankara 06500, Türkiye^b Department of Chemistry, Faculty of Sciences and Art, Kırklareli University, Kırklareli, Türkiye^c Department of Chemistry, Faculty of Arts and Science, Nevşehir University, 2000 Evler Mh. Zübeyde Hanım Cd. Nevşehir 50300, Türkiye

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 May 2014

Received in revised form 28 September 2014

Accepted 18 October 2014

Available online 29 October 2014

Keywords:

Biocatalysis
Glucose oxidase
Nanospheres
Platinum ion

ABSTRACT

New nanospheres have been prepared with Pt²⁺ and Pt⁴⁺ for compare enzymatic properties of glucose oxidase enzyme (GOx). In this study nanoparticles, (aminomethyl)polystyrene (APS), 2-hydroxy-5-methylbenzaldehyde and Pt²⁺/Pt⁴⁺ have been synthesized by means of template and investigated the enzymatic properties of glucose oxidase enzyme (GOx) immobilized on there. The characteristics of the immobilized glucose oxidase (APS–Pt²⁺–GOx and APS–Pt⁴⁺–GOx) enzyme showed one optimum pH value. The influence of temperature, reusability and storage capacity on the free and immobilized glucose oxidase enzyme have been investigated. It is found that nanosphere including platinum atom exhibits excellent performance as the immobilized supporter of GOx, the immobilized enzyme demonstrates perfected storage and recycling stability. APS–Pt²⁺–GOx retains more than 30% of the initial activity after 32 successive cycles, which is a remarkable result.

© 2014 The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

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 [1,2]. The use of nanoparticles in medicine and more specifically drug delivery is set to spread rapidly [3]. 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 [4]. Nanoparticles have been recognized as effective enzyme loading, because they offer the special and fascinating characteristics for balancing the key factors that determine the biocatalyst efficiency, including high specific surface area [5].

Determination of Glucose is important in many areas, from clinical studies to industrial productions. Researchers are developing new methods for the last decade due to rapid determination of glucose and control is significant. In view of these, nanoparticle structures have attracted great attention in preparing advanced materials [6]. Metal nanoparticles have been extensively utilized due to their extraordinary catalytic activities for both oxidation and reduction reactions. Among them, Pt nanoparticles were one of

the mostly used for immobilization of enzymes for the investigation biocatalyst due to their unique properties such as electrocatalytic ability [7].

Although glucose oxidase enzyme has attracted interests in the varying process, this enzyme is unstable due to its complex molecular structure. Therefore, a number of immobilization techniques have recently been investigated to improve its stabilities. Immobilization of enzymes onto polymeric nanosphere is the most useful strategy to improve the operational stability of biocatalysts [8,9]. Other benefits are obtained as well, such as better operational control, ease of product recovery without catalyst contamination [8].

Recently, Singh et al. reported that Hybrid xerogel as an effective carrier support for glucose oxidase. They noted that was loss in bioactivity up to six cycles of recycling of Hybrid xerogel-GOX [10]. Arslan et al., immobilized glucose oxidase (GOx) onto polyaniline-polyvinylsulfonate film without any cross linking agents or modifiers [11]. Guo and coworkers immobilized GOx on iron oxide nanoparticles [12] prepared via a coprecipitation method.

Polymers such as polystyrene, poly(vinyl alcohol), poly(ethylene oxide) can be covalently linked with enzymes, resulting in surfactant-like giant molecules that have the ability to form catalytic molecular layers at the interface of aqueous/organic biphasic systems [13–16].

* Corresponding author. Tel.: +90 312 2021157; fax: +90 312212 22 79.
E-mail address: nursen@gazi.edu.tr (N. Sarı).

Research on the Repeated Use of Novel Ferrocene-Tagged Nanomaterial for Determination of Glucose

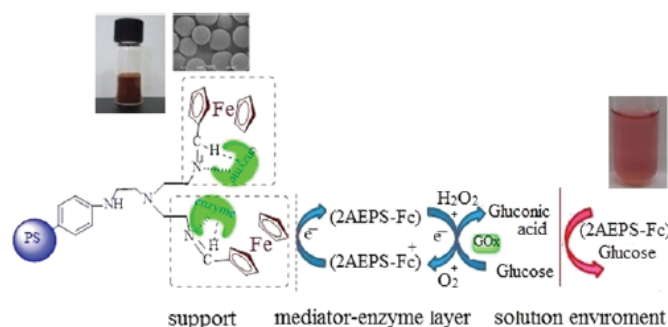
NURDAN KURNAZ YETİM^{1,2}, ELVAN HASANOĞLU ÖZKAN¹, BÜŞRA DANIŞ¹, HAYRETTİN TÜMTÜRK¹, and NURŞEN SARI¹

¹Gazi University, Faculty of Science, Department of Chemistry, Ankara, Turkey

²Kırklareli University, Faculty of Arts and Science, Department of Chemistry, Kırklareli, Turkey

Received 10 January 2015, Accepted 14 March 2015

A good novel double ferrocene-tagged nanomaterial is designed for glucose determination and its recycling stability. Double Ferrocene-tagged nanomaterial displays higher catalytic activity toward the glucose oxidation than non-ferrocene-tagged nanomaterial. In this study novel nanoparticles including double ferrocene, N-(2-[Bis(2-aminoethyl)amino]ethyl)aminomethyl-polystyrene (2AEPS) and ferrocene aldehyde (Fc) have been synthesized by means of condensation and investigated the enzymatic properties of glucose oxidase enzyme (GOx) immobilized on there. Double ferrocene-tagged nanomaterial-GOD shows high reusability and storage capacity and fast incubation time determination of glucose. 2AEPSFc-GOD retains more than 15% of the initial activity after forty five successive cycles, which is a perfect performance.



Keywords: Biocatalysis, ferrocene-tagged, glucose oxidase, nanospheres, recycling stability

1. Introduction

In recent year, enzyme immobilization on nanospheres has been extensively studied due to its small size and large surface area [1]. Support materials involving nanospheres are useful the strategy to improve the operational stability of immobilization [2]. There are easier operational control and ease of product recovery without catalyst contamination with this strategy.

Address correspondence to: Nurşen Sari, Department of Chemistry, Gazi University, 06500 Ankara, Turkey. E-mail: nursens@gazi.edu.tr

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/gpom.

The last 20 years, chemically modified nanospheres have been employed for the determination of various materials and application [3,4]. Norman et al. [5] pioneered the development of nanomaterial-based polystyrene in 1993. Neal et al. [6] have developed physical and biological properties of polystyrene nanospheres with radiolabeled. In recent years, there has been increasing interest in enzyme immobilization of nano- and micro-particles due to easier operational control. Surface modification using some functional groups has been shown to be useful for the immobilization of enzymes to the surface of the nanospheres or microspheres [7,8]. Many nanospheres or microspheres have been investigated for immobilize of Glucose oxidase (GOx) enzyme. Xian and Ming [9]

Immobilization of Glucose Oxidase Attached to New Nanospheres Including Azomethine

Nurbanu Özdem, Elvan Hasanoglu Özkan, Nurşen Sarı*, Fatma Arslan, and Hayrettin Tümtürk

Department of Chemistry, Faculty of Science, Gazi University, 06500 Teknikokullar, Ankara, Türkiye

Received May 3, 2014; Revised July 21, 2014; Accepted August 11, 2014

Abstract: New nanosphere supports were prepared and characterized for the immobilization of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Nanoparticles ((APS-tio), (APS-tioCH₃), and (APS-tioCl)) modified (aminomethyl)polystyrene (APS) with some tyophenealdehyde derivatives were synthesized by means of condensation and we investigated the enzymatic properties of glucose oxidase enzyme (GOx) immobilized on them. Modified polystyrene was characterized by IR spectra, gel permeation chromatography and scanning electron microscopy. Immobilized GOx on (APS-tioCH₃) showed a optimum pH, whereas immobilized GOx on (APS-tio) and (APS-tioCl) performed the optimum condition at two pHs.

Keywords: biocatalysis, crystal, glucose oxidase, nanospheres.

Introduction

Immobilization of enzymes onto polymeric microsphere is the most useful strategy to improve the operational stability of biocatalysts.¹ Other benefits are obtained as well, such as better operational control, ease of product recovery without catalyst contamination.¹ So, we have witnessed extensive efforts in incorporating enzymes with various nanostructured materials, such as immobilization on inorganic or organic nanoparticles, encapsulation of the enzyme into sol-gel materials.^{2,3} Immobilization of enzymes is very important for many industrial applications, *e.g.*, food, medicine, pharmacology, *etc.*

Glucose oxidase converts glucose to gluconic acid, which have wide applications in pharmaceutical industry as a biosensor for the enzymatic determination of glucose in diabetes and the fermentation of liquor, and in the food industry for the removal of glucose and shelf life of various products.⁴⁻⁶ Although glucose oxidase enzyme has attracted interests in the varying process, this enzyme is unstable due to its complex molecular structure. Therefore, a number of immobilization techniques have recently been investigated to improve its stability. Today still, different methods have been used for enzyme immobilization.⁷⁻⁹ During immobilization, the enzyme's active center must be protected. When an enzyme is attached to the support, the functional groups, which are located at the active site of the enzyme and responsible for the catalysis reaction, should not be involved in the immobilization process and therefore remain potent.¹⁰ Polymeric support should have functional groups like hydroxyl, carboxyl, amino, *etc.*,

for binding the enzymes. Hydroxyl groups in GOx having carbohydrate chains are connected by hydrogen bonds to polymeric support including O, N, and S atom. Polymeric support should have functional groups like hydroxyl, amino, imine, *etc.*, for binding the enzyme. As is known, enzyme immobilization by adsorption involves interactions between the support and the enzyme such as ionic, hydrogen bonding and Van Der Waals forces.¹¹

Huang and coworkers immobilized GOx on Fe₃O₄/SiO₂ magnetic nanoparticles (FSMNs) as different from polymers.¹² Li and Guo immobilized GOx on sphere-nanostructured conducting polymer/metal oxide composite for biosensor.¹³ Polymers such as polystyrene (PSt), can be covalently linked with enzymes, resulting in surfactant-like giant molecules that have the ability to form catalytic molecular layers at the interface of aqueous/organic biphasic systems.^{12,8} Arslan *et al.*, immobilized glucose oxidase (GOx) onto polyaniline-polyvinylsulfonate film without any cross linking agents or modifiers.^{14,15} Chen and coworkers immobilized GOx onto chitosan-graft-polyaniline polymers.¹⁵

As a continuation of our study on nanoplateforms including -CH=N- group, to investigate the effect of hydrogen bond on enzyme immobilization prepared polymeric support attached thiophenealdehyde and it's derivatives involving -Cl and -CH₃ group. To prepare such a polymeric support, the (aminomethyl)polystyrene (APS) reacted with tyophenealdehyde, 5-Methyl tyophenealdehyde and 5-Nitro-tyophenealdehyde (Figure 1) by means of condensation method. Furthermore, first time faced in this study formed crystal structures on nanosphere support (Figure 2). As far as we know, there is no formed crystal on nanosphere.

*Corresponding Author. E-mail: nursens@gazi.edu.tr

EK-12. Tez dışı 4. makalemin ilk sayfası

Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology 2016; 44: 853–858
 Copyright © 2015 Informa Healthcare USA, Inc.
 ISSN: 2169-1401 print / 2169-141X online
 DOI: 10.3109/21691401.2014.991792



Useful agents against aflatoxin B₁ – antibacterial azomethine and Mn(III) complexes involving L-Threonine, L-Serine, and L-Tyrosine

Mustafa Anar¹, Elvan Hasanoğlu Özkan², Hatice Ögütçü³, Güleray Ağar¹, İffet Şakıyan⁴ & Nurşen Sarı²

¹Department of Molecular Biology and Genetics, Ataturk University, Erzurum, Turkey, ²Department of Chemistry, Gazi University, Ankara, Turkey, ³Department of Biology, Ahi Evran University, Kirsehir, Turkey, and ⁴Department of Chemistry, Ankara University, Turkey

Abstract

The present study is focused on evaluating the antimutagenic properties of Schiff bases and Mn(III) complexes with L-Threonine, L-Serine and L-Tyrosine, which have antimicrobial activity. These six compounds were investigated for antimutagenic properties against Aflatoxin B₁ (AFB₁) by the micronucleus (MN) assay in a human lymphocyte cell culture *in vitro*. The protective role of these compounds against AFB₁-induced MN is probably related to its doses. A mechanism has been proposed to reduce the effect of AFB₁.

Keywords: antimicrobial properties, aflatoxin B₁, Mn(III) complexes, mutagenicity

Introduction

Many amino acid derivatives possess a wide variety of pharmacological activities (Kuhl et al. 2005). Amino acids hold promise as ideal targets for tumor imaging. They are necessary for the continuous, sustained, and uncontrolled growth of tumor cells. Studies have demonstrated that malignant tumors can be detected with high sensitivity and specificity, by imaging their increased metabolic rates for amino acids. Therefore, many natural and artificial amino acids have been radiolabeled for positron emission tomography (PET) imaging of tumors (McConathy et al. 2002).

Recently, several studies have demonstrated that certain amino acids (such as cysteine, glycine, tryptophan, lysine, arginine, glutamine, and alanine) show an antimutagenic effect, tested by different systems (Roy et al. 2002, Tavares et al. 1998, and Handique and Aprem 1997). However, no report so far has demonstrated the protective effect of these compounds against AFB₁ genotoxicity. AFB₁ is the most potent of the naturally occurring mycotoxins. The activation of AFB₁ on organisms, initiated by the oxidation of the 8,9-vinyl ether bond, is shown in Figure 1. AFB₁ in itself is not dangerous, but is metabolized by the body, ultimately producing a carcinogenic metabolite. Oxidized AFB₁ may

bind to nuclear DNA, resulting in nuclear damage due to electrophilic attack on the N⁷ position of guanine of DNA and RNA (McClean and Dutton 1995).

Molecules attached with amino acids have wide applications for the synthesis of drugs as antimutagenic and antibacterial agents. Therefore, there is considerable interest in the synthesis and characterization of these compounds. However, drug resistance against antimutagenic/antibacterial agents may pose a problem in their use for medical purposes. The problem could be overcome by the preparation of metal complexes by a process of chelation, with the coordination of transition metal ions. It is well known that N and O atoms play a key role in the coordination of metals. Liping et al. have studied the inhibitory activity of oxovanadium (IV) complexes with amino acid-Schiff base, against human tyrosine phosphatase 1B *in vitro* (2011). Zasukhina et al., have studied the antimutagenic activity of compounds including nitrogen (2003). Many research studies have demonstrated that the genotoxicity of some metal salts (e.g. Cd(II), Ni(II), Pt(II), etc.) might depend on the phase of the cell cycle in human lymphocytes (Hartmann and Hartwig 1998, Snow 1992, Coluccia et al. 1984).

We know that one of the major challenges in medical and drug delivery is the development of new antimutagens, because they have good prospects of practical use in preventing delayed negative effects of mutagens induced in humans, the most important of which are the high prevalence of hereditary diseases and cancer (Zasukhina et al. 2003). Therefore, the purpose of this study was to investigate the antimutagenic effects of Schiff bases attached with L-Serine and L-Threonine, and L-Tyrosine, and their Mn(III) complexes, on human peripheral blood *in vitro*, by the micronucleus assay. Furthermore, antimicrobial activity was tested in the ligands and complexes by the well-diffusion method. First of all, amino acid-Schiff bases were synthesized by using the condensation methods. Then, their Mn(III) complexes were synthesized by means of a template method (Figure 2).

Correspondence: Nurşen Sarı, Department of Chemistry, Gazi University, Ankara, Turkey. E-mail: nursens@gazi.edu.tr
 (Received 1 October 2014; revised 9 November 2014; accepted 21 November 2014)



Cite this: *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 16865

Immobilization of acetylcholinesterase on Pt(II) and Pt(IV) attached nanoparticles for the determination of pesticides

E. Hasanoğlu Özkan,^a N. Kurnaz Yetim,^{a,b} H. Tümtürk^a and N. Sarı^{*a}

Pt(II) and Pt(IV)-tagged nanoparticles have been synthesized according to the template method for the identification of pesticides. Their morphologies have been investigated using scanning electron microscopy and characterized by means of spectral measurements. Then, acetylcholinesterase (AChE) was immobilized onto the nanoparticles. The AChE immobilized Pt(II) and Pt(IV)-tagged nanomaterials show high reusability and storage capacity. The catalytic activity of AChE followed Michaelis–Menten kinetics. Assays for enzyme activity measurements demonstrate that the nanospheres tagged with Pt(II) have a much better performance than those with Pt(IV). Furthermore, whether or not there was any interaction between the immobilized enzyme and 1-naphthyl-*N*-methylcarbamate, which is a carbamate insecticide, was examined.

Received 4th August 2015,
Accepted 27th August 2015
DOI: 10.1039/c5dt03004h
www.rsc.org/dalton

1. Introduction

The importance of acetylcholinesterase (AChE) in the transmission of nerve impulses is very well known. Its inactivation is possible by means of some pesticides and heavy metals. Inactivation occurs via the hydroxyl groups of serine in the “active site” of acetylcholinesterase (AChE).¹ For this reason, it is important to develop accessible methods for the rapid detection of some pesticides and heavy metals. In recent years, studies based on the immobilization of AChE have been reported by many authors^{2,3} because it forms the basis of biosensors. 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.^{4,5} Nanospheres are useful for improving the operational stability of immobilization. Therefore enzyme immobilization into or onto various nanoparticles has been proposed and reported. We can see that various nanomaterials have been investigated for the immobilization of acetylcholinesterase (AChE). Especially, the immobilization of AChE on nanomaterials of

noble metals (such as gold and silver) or carbon nanospheres is common.^{6,7}

After Norman *et al.*⁸ pioneered the development of nanomaterial-based polystyrene in 1993, many researchers have since developed the immobilization properties of polystyrene nanospheres.^{9–11} One method to achieve immobilized species is covalent immobilization. The covalent immobilization of an enzyme can protect its conformation, thus leading to better activity and stability.¹²

In the present work, by taking advantage of the coordination band in between the enzyme and metal ion, and to improve the recycling stability performance for the determination of hazardous materials, a new support has been prepared, as illustrated in Fig. 1 and 2. And then, acetylcholinesterase was immobilized on the Schiff base and Pt(II)/Pt(IV) nanoparticles (Fig. 4A).

The experimental results showed that the prepared Pt(II) and Pt(IV) attached nanoparticles had high sensitivity and good usability. We can say that this support, including platinum ions is a good candidate for the immobilization of AChE to detect hazardous materials.

2. Experimental

2.1. Materials and methods

4-Benzyloxybenzaldehyde (polymer-bound), tryptophan, acetylcholinesterase (Type C3389, from electric eel, 518 units per mg, 10KU), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), acetylthiocholine iodide and 1-naphthyl-*N*-methylcarbamate were purchased

^aDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Gazi University, 06500 Teknikokullar, Ankara, Turkey. E-mail: nursens@gazi.edu.tr; Fax: +90-312-212 22 79; Tel: +90-312-202 11 57

^bKırklareli University, Faculty of Arts and Science, Department of Chemistry, Kırklareli, Turkey

EK-14. Tez dışı 6. makalemin ilk sayfası

Accepted Article

Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase on a carbon paste electrode modified with microspheres attached L-glycine

Soner Donmez^{a*}, Fatma Arslan^b, Nurşen Sarı^b, Elvan Hasanoğlu Özkan^b, Halit Arslan^b

^a*School of Health, Sinop University, 57000, Sinop, Turkey*

^b*Department of Chemistry, Faculty of Science, Gazi University, 06500, Ankara, Turkey*

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the [Version of Record](#). Please cite this article as [doi: 10.1002/bab.1533](#).

This article is protected by copyright. All rights reserved.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı :HASANOĞLU ÖZKAN, Elvan
 Uyuğu : T.C.
 Doğum Tarihi ve Yeri: 09.07.1985/İSTANBUL
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 (530) 174 39 49
 e-posta : elvan.hasanoglu@gazi.edu.tr



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi/Kimya Bölümü	Devam Ediyor
Yüksek Lisans	Niğde Üniversitesi/Kimya Bölümü	2009
Lisans (Bölüm 1.'si)	Niğde Üniversitesi/Kimya Bölümü	2007
Lise	Çemberlitaş Anadolu Lisesi/Fen Bilimleri	2003
Orta Öğrenim	Prof.Dr.Muharrem Ergin İlköğretim Okulu	1999

Ek Eğitimler	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Operatörlük Belgesi	Milli Eğitim Bakanlığı /Bilgisayar Eğitimi	2006
Sorumlu Müdürlük	Kimyagerler Derneği	2009
Sertifikası		
ISO 9001 - ISO 22000	Dolunay Akademi	2009
GMP (Good Manufacturing Practices)	Kimyagerler Derneği	2009
HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	Gazi Üniversitesi/Fen Fakültesi	2011
İSG(C Sınıfı)	GAZİSEM	2014
Pedagojik Formasyon	Gazi Üniversitesi/Eğitim Fakültesi	2016

Akademik ve Mesleki Deneyim

Görev Dönemi	Unvan	Firma /Üniversite	Bölüm
05/06-05/08 2006	Stajyer	Altınyıldız Kumaş Boya Fabrikası A.Ş.	Boya/Kalite Kontrol/ Su Analiz ve Arıtım Lab.
09/03-28/05 2009	Sorumlu Yönetici	Gaziantep Salkım Baklava ve Börek Salonu(Gıda Firması)	Kalite Kontrol-Güvence
01/09/2009-28/11/2010	Sorumlu Yönetici	ATA Toplu Yemek ve Sosyal Organizasyon Hizmetleri Sanayi ve Ticaret	Kalite Kontrol-Güvence
2013-2014	Öğretim Görevlisi	Gazi Üniversitesi Atatürk Meslek Yüksek Okulu Kimya Teknolojileri Bölümü/AKYURT	Analitik Kimya
2013-2014	Öğretim Görevlisi	Gazi Üniversitesi Atatürk Meslek Yüksek Okulu Kimya Teknolojileri Bölümü/AKYURT	Analitik Kimya Laboratuvarı

Yabancı Dili

İngilizce

Akademik Faaliyetler

A1. Bilimsel Toplantı-Kongrelerde Basılan Bildiriler (Tez Kapsamı)

1. Elvan Hasanoğlu Özkan, Nursen Sarı, 2014, Synthesis of Novel Dendritic Macromolecules and Investigation of Glucose Oxidase Enzyme as Biocatalysts, *5th World Congress on Biotechnology*, June 25-27, Valencia SPAIN.

2. E. Hasanoğlu Özkan, N. Sarı, 2015, Immobilization of Glucose Oxidase onto Novel Dendron with Two-Generation Containing Ferrocene, *International Conference on Chemical and Biochemical Engineering*, July 20-22, 2015, Paris, FRANCE.
3. Elvan Hasanoğlu Özkan, Nurşen Sarı, Synthesis of Novel Dendron Based on Ferrocene, Immobilization of Enzyme and First Investigation as Catalytic of Glucose in Artificial Urine, *46th IUPAC Macro 2016 World Polymer Congress*, July 17-21, 2016, İstanbul, TURKEY.

A2. Bilimsel Toplantı-Kongrelerde Basılan Bildiriler (Tez Kapsam Dışı)

1. Elvan Hasanoğlu, Nihat Pişkin, Nurdan Kurnaz, Hatice Ögütçü, Nurşen Sarı, 2011. Synthesis and Biological Evaluation of Schiff Bases-Ni(II) Complexes as Antibacterial Agents, *1st International Symposium of Secondary Metabolites: Chemical, Biological and Biotechnological Properties* (ISSMET2011), September 12-15, 2011, Denizli, TURKEY.
2. Nurdan Kurnaz, Nihat Pişkin, Elvan Hasanoğlu, Nurşen Sarı, Hatice Ögütçü, 2011. Synthesis of Azomethine-Cr(III) Complexes and Evaluation of the in Vitro Antibacterial against *Microoccus Luteus* and *Brucella Abortus*, *1st International Symposium of Secondary Metabolites: Chemical, Biological and Biotechnological Properties* (ISSMET2011), September 12-15, 2011, Denizli, TURKEY.
3. Elvan Hasanoğlu Özkan, Emre Kızıl, Hatice Ögütçü, Nurşen Sarı, Güleray Agar, İffet Sakiyan, 2013. Antibakteriyal Özellik Gösteren Fenilalanin ve Aspartik Asit Takılı Amino Asitlerin Aflatoksin B1'e Karşı Etkisi, *IV. Anorganik Kimya Kongresi*, 30 Mayıs-2 Haziran, 2013, Tokat, TÜRKİYE.
4. Nurşen Sarı, Zehra Nehir Bağcıoğlu, Nurdan Kurnaz Yetim, Elvan Hasanoğlu Özkan, Dilek Nartop, 2013. New Supports for Use of Glucose Oxidase Enzyme as Biocatalysis, *ICC 2013 - International Conference on Chemistry*, June 20-21, 2013, İstanbul, TURKEY.
5. Emre KIZIL, Elvan HASANOĞLU ÖZKAN, Hatice ÖĞÜTÇÜ, Güleray AĞAR, Nurdan KURNAZ YETİM, Nurşen SARI, İffet ŞAKIYAN, 2013. Antibakteriyal Özellik Gösteren Schiff Bazı ve Mn(II) Komplekslerinin Antimutajenik Etkisinin Belirlenmesi, *XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi*, 3-6 Eylül, 2013, İzmir, TÜRKİYE.
6. Elvan H. Özkan, Dilek Nartop, Nurşen Sarı, 2013. Pt(IV) İyonu Takılı Nanoplatform Üzerine Glukoz Oksidaz Enziminin Biyokataliz Olarak İncelenmesi, *Biyo&Nano Teknoloji Kongresi*, 1-3 Ekim, 2013, İstanbul, TURKEY.

7. Elvan Hasanoğlu Özkan, Nurdan Kurnaz, Dilek Nartop, Nurşen Sarı, 2014. Biyokatalizör Olarak Glukozun Glukonik Aside Dönüşümünde Kullanılan Enzimin Tekrar Kullanma Sayısında Pt(II) ve Pt(IV) İyonlarının Rolü, *V. Ulusal Kataliz Kongresi*, 23-26 Nisan 2013, Adana, TÜRKİYE.
8. Büşra Danış, Elvan H. Özkan, Nurdan K. Yetim, Nurşen Sarı, 2014. Nanokürelere Çift Ferrosen Takılması ve Biyokataliz Özelliklerinin Araştırılması, *5. Kimya Öğrenci Kongresi*, 17-19 Mayıs 2014, İstanbul, TÜRKİYE. (Sözel Sunum)
9. Esengül Çiftçi, Nurdan K. Yetim, Elvan H. Özkan, Nurşen Sarı, 2014. Nanokürelere Takılı Aminoasit İçerikli Ferrosenin, Glukoz Tayininde Kullanımı için Optimum Şartların Belirlenmesi, *5. Kimya Öğrenci Kongresi*, 17-19 Mayıs 2014, İstanbul, TÜRKİYE (Poster 1.'liği)
10. Hatice Ögütçü, Aliye Altundaş, Nurşen Sarı, Elvan H. Özkan, 2014. Investigation of Effects Against Pathogenic Bacteria of Novel Pt(IV) Complexes, *3rd International Molecular Biology and Biotechnology Congress*, June 02-06 2014, Sarayevo, BOSNA HERSEK.
11. Elvan Hasanoğlu Özkan, Nurdan Kurnaz Yetim, Dilek Nartop, Nursen Sarı, 2014. Attached of Pt(IV)-Schiff Base Complexes on Nanoplatforms; Covalent Immobilization of Glucose Oxidase Enzyme as Biocatalysts, *5th World Congress on Biotechnology*, June 25-27 2014, Valencia, SPAIN.
12. Nurdan Kurnaz Yetim, Elvan Hasanoğlu Özkan, Dilek Nartop, Nurşen Sarı, 2014. Nanospheres Attached Pt(II) for Investigation of Glucose Oxidase Enzyme as Biocatalysts, *5th World Congress on Biotechnology*, June 25-27 2014, Valencia, SPAIN. (Oral Presentation)
13. Hatice Ögütçü, Nurdan Kurnaz Yetim, Elvan Hasanoğlu Özkan, Aliye Altundaş, Nursen Sarı, 2014. Investigation of Antimicrobial Activity Against Pathogenic Strains of Novel Pt (II) Complexes, *5th World Congress on Biotechnology*, June 25-27 2014, Valencia, SPAIN.
14. Elvan Hasanoğlu Özkan, Nurdan Kurnaz Yetim, Esengül Çiftçi, Nurşen Sarı, 2015. İmmobilize GOx'un Lineweaver-Burk Grafiğinden Yararlanılarak Kinetik Parametlerinin Belirlenmesi, *V. Ulusal Anorganik Kimya Kongresi*, 22-25 Nisan 2015, Mersin, TÜRKİYE.
15. Elvan Hasanoğlu Özkan, Nurdan Kurnaz Yetim, Nurşen Sarı, Hayrettin Tümtürk, 2015, Pt(II) Koordinasyon Polimerlerinin Hazırlanması, Toksik Bileşiklerin Analizinde AChE'ın Kullanımı için Önemli Parametrelerinin Araştırılması, *V. Ulusal Anorganik Kimya Kongresi*, 22-25 Nisan 2015, Mersin, TÜRKİYE.

16. Nurdan Kurnaz Yetim, Elvan Hasanoğlu Özkan, Büşra Danış, Hayrettin Tümtürk, Nurşen Sarı, 2015, Çift Ferrosen İçeren Nano Boyuttaki Küreler Üzerine Enzim Çalışması, *V. Ulusal Anorganik Kimya Kongresi*, 22-25 Nisan 2015, Mersin, TÜRKİYE.
17. Nurdan Kurnaz Yetim, Elvan Hasanoğlu Özkan, Hayrettin Tümtürk, Nurşen Sarı, 2015, Asetilkolin Esteraz Enziminin Tekrar Kullanım Sayısında Pt(II) ve Pt(IV) İyonlarının Etkisi, *V. Ulusal Anorganik Kimya Kongresi*, 22-25 Nisan 2015, Mersin, TÜRKİYE. (Mansiyon Ödülü)
18. Orçun Eren, Nurdan Kurnaz Yetim, Elvan Hasanoğlu Özkan, Gamze Kaya, Nurşen Sarı, Hatice Ögütçü, 2015, Pt(II) ve Pt(IV) Takılı Polimerik Nanokürelerin Bazı Patojen Bakterilere Karşı Etkilerinin Araştırılması, *V. Ulusal Anorganik Kimya Kongresi*, 22-25 Nisan 2015, Mersin, TÜRKİYE.
19. E. Hasanoğlu Özkan, N. Kurnaz Yetim, N. Sarı, O. Eren, H. Ögütçü, 2015, Attaching the Support of Platinum(II) Complex and Antifungal Activities, *ISOPS 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences*, June 09-12, 2015, Ankara, TURKEY.
20. E. Hasanoğlu Özkan, N. Kurnaz Yetim, N. Sarı, 2015, Enhancement of the Response Time of the Immobilized Glucose Oxidase Enzyme, *ISOPS 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences*, June 09-12, 2015, Ankara, TURKEY.
21. N. Kurnaz Yetim, E. Hasanoğlu Özkan, N. Sarı, O. Eren, H. Ögütçü, 2015, Investigation of Antimicrobial Effect for Novel the Polymers with Nano-Sphere, *ISOPS 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences*, June 09-12, 2015, Ankara, TURKEY.
22. N. Kurnaz Yetim, E. Hasanoğlu Özkan, N. Sarı, 2015, The Response Time in the Enzyme Studies of the Polymer Supports Including Different Substituents, *ISOPS 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences*, June 09-12, 2015, Ankara, TURKEY.
23. E. Hasanoğlu Özkan, N. Sarı, 2015, Synthesis of Novel Nano-Catalyst that Includes Dendron and Enzyme Studies, *11th Nanoscience and Nanotechnology Conference Middle East Technical University*, June 22-25, 2015, Ankara, TURKEY.
24. S. Dönmez, F. Arslan, N. Sarı, E. Hasanoğlu Özkan and H. Arslan, 2015, Template and Glucose Biosensor Based on Immobilization of Glucose Oxidase in Carbon Paste Electrodes Involving Nanoparticles Poly(styrene) Attached Glycine, *11th Nanoscience and Nanotechnology Conference Middle East Technical University*, June 22-25, 2015, Ankara, TURKEY.

25. N. Kurnaz Yetim, E. Hasanoğlu Özkan, N.Sarı, 2015, Use of Nanospheres as Support Material for Enzyme Immobilization, *11th Nanoscience and Nanotechnology Conference Middle East Technical University*, June 22-25, 2015, Ankara, TURKEY.
26. E. Hasanoğlu Özkan, N. Kurnaz Yetim, N. Sarı, 2015, Performance on the Recycling Stability of Ferrocene-Tagged Sphere for Determination of Glucose, *International Conference on Chemical and Biochemical Engineering*, July 20-22, 2015, Paris, FRANCE. (Oral Presentation)
27. N. K. Yetim, E. H. Özkan, H. Tümtürk and N. Sarı, 2015, Determination of optimum conditions of immobilized acetylcholinesterase, *International Conference on Chemical and Biochemical Engineering*, July 20-22, 2015, Paris, FRANCE.
28. Elvan Hasanoğlu Özkan, Nurdan Kurnaz Yetim, Murat Gümüş, Ali Dişli, Nurşen Sarı, 2016, Immobilization of Acetylcholinesterase on Macromolecule for Pesticide Control, *46th IUPAC Macro 2016 World Polymer Congress*, July 17-21, 2016, İstanbul, TURKEY.
29. Nurdan Kurnaz Yetim, Elvan Hasanoğlu Özkan, Murat Gümüş, Ali Dişli, Nurşen Sarı, 2016, The Preparation of Some New ¹H-Tetrazole Derivatives and Their Attaching on Nano Spheres, *46th IUPAC Macro 2016 World Polymer Congress*, July 17-21, 2016, İstanbul, TURKEY.
30. Dilek Nartop, Murat Güleç, Birtane Demirel, Elvan Hasanoğlu Özkan, Nurdan Kurnaz Yetim, Nurşen Sarı, 2016, Enzyme Immobilization on Polymer-based Supports, *46th IUPAC Macro 2016 World Polymer Congress*, July 17-21, 2016, İstanbul, TURKEY.
31. Elvan HASANOĞLU ÖZKAN, Nurdan KURNAZ YETİM, Nurşen SARI, 2016, Sentezlenen Polimerin WHO Standartlarına Uygun Aralıktaki Pestisit Varlığının Saptanmasında Kullanılması, *VI. Ulusal Polimer Bilim ve Teknoloji Kongresi*, 4-7 Eylül 2016, Ankara, TÜRKİYE.
32. Nurdan KURNAZ YETİM, Elvan HASANOĞLU ÖZKAN, Nurşen SARI, 2016, AChE Enzimi Tutturulmuş Destek Polimerin (FMPS) Elma Kurduna Karşı Kullanılan Pestisit Tayininde Kullanılması, *VI. Ulusal Polimer Bilim ve Teknoloji Kongresi*, 4-7 Eylül 2016, Ankara, TÜRKİYE. (Sözel Sunum)
33. Emre KARMAZ, Nurdan KURNAZ YETİM, Elvan HASANOĞLU ÖZKAN, Nurşen SARI, 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.

34. E. Hasanoğlu Özkan, N. Kurnaz Yetim, N. Sarı, A. Dişli, 2016, The Effect of the para and meta Positions in Immobilized New Supports for Determination Phosphate, *3rd International Congress on Biosensors*, October, 5-7, 2016, Ankara, TURKEY.
35. N. Kurnaz Yetim, E. Hasanoğlu Özkan, E. Karmaz, N. Sarı, 2016, Double-Arm Schiff Bases-Tagged Nanomaterial; Synthesis and Acetylcholinesterase Immobilization, *3rd International Congress on Biosensors*, October, 5-7, 2016, Ankara, TURKEY.

B2. SCI, SCI-EXP., SSCI, AHCI Tarafından Taranan Makaleler

1. Donmez, S., Arslan, F., Sarı, N., Hasanoğlu Özkan, E., Arslan, H. (2016). Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase on a carbon paste electrode modified with microspheres attached L-glycine (baskıda). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1,1.
2. Anar, M., Hasanoğlu Özkan, E., Ögütçü, H., Açar, G., Şakıyan, İ., Sarı, N. (2016). Useful agents against aflatoxin B₁ antibacterial azomethine and Mn(III) complexes involving L-Threonine, L-Serine and L-Tyrosine. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 44(3), 853-858.
3. Hasanoğlu Özkan, E., Kurnaz Yetim, N., Tümtürk, H., Sarı, N. (2015). Immobilization of Acetylcholinesterase on Pt(II) and Pt(IV) attached nanoparticles for the determination of pesticides. *Dalton Transactions*, 44, 16865-16872.
4. Hasanoğlu Özkan, E., Kurnaz Yetim, N., Nartop, D., 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.
5. Kurnaz Yetim, N., Hasanoğlu Özkan, E., Danış, B., Tümtürk, H., Sarı, N. (2015). Research on the use repeated of novel ferrocene-tagged nanomaterial for determination of glucose . *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 64(17), 888-893.
6. Özdem, N., Hasanoğlu Özkan, E., Sarı, N., Arslan, F., Tümtürk, H. (2014). Investigation of Glucose Oxidase attached to new nanospheres including azomethine. *Macromolecular Research*, 22(12), 1282-1287.

C2. Diğer İndeksler Tarafından Taranan Makaleler

1. Sarı, N., Bağcıacı, Z. N., Kurnaz Yetim, N., Hasanoğlu Özkan, E., Nartop, D. (2013). New supports for use of Glucose Oxidase enzyme as biocatalysis. *W. A. Science, Engineering and Technology*, 78, 949-953.
2. Kızıl, E., Hasanoğlu Özkan, E., Ögütçü, H., Açar, G., Kurnaz Yetim, N., Sarı, N., Şakıyan, İ. (2013). Investigation of antimutagenic effects of schiff bases and the

Mn(III) complexes have antibacterial property. *Turkish Journal of Biochemistry*, 235,38.

PATENT

- Faydalı Model-(Patent) Biyokataliz Uygulamalarında Kenger Sakızı İçerikli Doğal Destek Materyali ve Hazırlanması, 2014/10229 (2015). Buluş Sahipleri: Nurşen SARI, Elvan HASANOĞLU ÖZKAN, Nurdan KURNAZ YETİM.

PROJE

- Yeni dendrimer ve dendron sentezi, onların biyokataliz araştırmaları (Araştırmacı, tamamlandı) (2016) Gazi Üniversitesi BAP.
- Bazı Ferrosen türevlerinin ve Ferrosen-tabanlı makromoleküllerin sentezi (Araştırmacı, tamamlandı) (2013) Gazi Üniversitesi, BAP.



GAZİ GELECEKTİR..