
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

FERROSEN TAKILI NANOPARTİKÜLE İMMOBİLİZE EDİLEN ASETİLKOLİNESTERAZ'IN AZİNFOS-ETİL, AZİNFOS-METİL VE TETRAKLORVİNPOS PESTİSİTLERİ İLE OLAN ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ

Zeynep ŞAHİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANA BİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NİSAN 2025

ETİK BEYAN

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

- 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 çalışmasında 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.

Zeynep ŞAHİN

08/04/2025

FERROSEN TAKILI NANOPARTİKÜLE İMMOBİLİZE EDİLEN ASETİLKOLİNESTERAZ'IN AZİNFOS-ETİL, AZİNFOS-METİL VE TETRAKLORVİNPOS PESTİSİTLERİ İLE OLAN ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Zeynep ŞAHİN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Nisan 2025

ÖZET

Asetilkolinesteraz enzimini küre yapısındaki yüzeye immobilize etmek için, ferrosenkarboksaldehit ve küre yapısında bulunan (aminometil)polistiren'in katılma ayrılma tepkimesi sonucunda oluşan bir destek hazırlanmıştır. Desteğin yüzey modifikasyonu için Elementel Analiz, Enerji Dağılımlı X-Işını Analizi (EDX) ile birlikte Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM-EDX), ve Fourier dönüşümlü IR spektroskopis (FTIR) ile karakterize edilmiştir. İmmobilize enzimin katalitik aktivitesi asetiltiyokolin substratı kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. İmmobilizasyondan sonraki sekizinci hafta sonunda immobilize enzimin göreceli olarak aktivitesini %88,8 koruduğu belirlenmiştir. Çalışılan pestisitler içinde immobilize enzimi en fazla inhibe eden pestisitin Azinfos-etil pestisiti olduğu spektrofotometrik ölçüm sonuçlarına göre karar verilmiştir.

Bilim Kodu : 20103
Anahtar Kelimeler : Asetilkolinesteraz, nanopartikül, schiff bazı, immobilizasyon
Sayfa Adedi : 43
Danışman : Prof. Dr. Nurşen SARI

INVESTIGATION OF THE INTERACTION OF ACETYLCHOLYNESTERASE IMMOBILIZED ON FERROCENE-ATTACHED NANOPARTICLES WITH AZINFOS-ETHYL, AZINFOS-METHYL AND TETRACHLORVINPOS PESTICIDES

(M. Sc. Thesis)

Zeynep ŞAHİN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

April 2025

ABSTRACT

In order to immobilize acetylcholinesterase enzyme on the spherical surface, a support was prepared by the addition-dissociation reaction of ferrocenecarboxaldehyde and (aminomethyl) polycitrene in the sphere structure. The surface modification of the support was characterized by Elemental Analysis, Scanning Electron Microscopy (SEM-EDX) with Energy Dispersive X-Ray Analysis (EDX), and Fourier transform IR spectroscopy (FTIR). The catalytic activity of the immobilized enzyme was determined spectrophotometrically using acetylthiocholine substrate. At the end of the eighth week after immobilization, the immobilized enzyme retained 88.8% of its relative activity. According to the spectrophotometric measurement results, Azinfos-ethyl pesticide was found to be the most inhibitory pesticide to the immobilized enzyme among the pesticides studied.

Science Code : 20103
Key Words : Acetylcholinesterase, schiff base, nanosphere, immobilization
Page Number : 43
Supervisor : Prof. Dr. Nurşen SARI

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmam süresince benden bilgisini, desteğini ve yardımını hiç esirgemeyen ve tüm birikimiyle bana yol gösteren başta değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Nurşen SARI'ya saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans çalışması yapmaya teşvik eden, karar vermemde etkili olan ve beni destekleyen ablam Fatma ŞAHİN'e, aynı laboratuvarda çalıştığım, taze bilgileriyle beni yüreklendiren arkadaşım Esma TAŞKIRAN'a, teknik destekleriyle çalışmamı kolaylaştıran yeğenlerim Neslihan KAYA ve Ömer Faruk ŞAHİN'e, bu günlere gelmemde yanı başımdaki en büyük duacım olan annem Hatice ŞAHİN'e teşekkür ediyor bu tezin tamamlanmasını çok isteyen fakat sevincime ortak olamayan merhum babam Ekrem ŞAHİN'i rahmetle anıyorum.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ ix

ŞEKİLLERİN LİSTESİ x

RESİMLERİN LİSTESİ xii

SİMGELER VE KISALTMALAR xiii

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Polimer Bazlı Nanopartiküller 3

2.2. Polistiren (PS), Polistiren-nanopartiküller (PS-NP) ve Enzim İmmobilizasyonunda Kullanımı 4

2.3. Enzimi İmmobilize Etme Yöntemleri 11

2.3.1. Çapraz bağlama yöntemi 12

2.3.2. Adsorpsiyon yöntemi 12

2.3.3. Kovalent bağlanma 12

2.3.4. Tutuklama 12

2.4. Enzimin Kinetiği 13

2.5. Ellman Metodu 14

2.6. Pestisitler 15

2.6.1. Tez çalışmasında kullanılan pestisitler 16

3. MATERYAL VE YÖNTEM 17

3.1. Kimyasal Maddeler 17

3.2. Kullanılan Cihazlar 17

Sayfa

4. DENEYSEL YÖNTEM 19
4.1. Hazırlanan Çözeltiler 19
4.1.1. Tampon çözeltileri 19
4.1.2. Enzim aktiflik tayininde kullanılan çözeltiler 19
4.1.3. Pestisit çözeltilerinin hazırlanması 19
4.2. Ferrosen Etiketli Destek Polimerlerinin Sentezi (AS-Fc) 20
4.3. Ferrosen Etiketli Destek Polimerlere AChE Enziminin İmmobilizasyonu 20
4.3.1. İmmobilizasyon üzerine çalışmalar 21
4.3.2. İmmobilize AChE enzimi ile pestisit tayini 23
5. SONUÇLAR 25
5.1. Karakterizasyon 25
5.2. Serbest ve İmmobilize AChE Enzimi ile İlgili Sonuçlar 30
5.3. İmmobilize AChE Enzimi ile Pestisit Değerlendirmesi 33
5.4. İmmobilize AChE Enzimi ile Pestisit Tayinindeki Tekrar Kullanımdaki Değerlendirmeler 34
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 35
KAYNAKLAR 39
ÖZGEÇMİŞ 43

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal madde ve üretici firma bilgileri 17

Çizelge 5.1. (AS-Fc) kodlu polimerin M_w ve element analiz yüzdeleri 27

Çizelge 5.2. Ferrosen etiketli polimerin Termal Analiz Sonuçları 28

Çizelge 5.3. Serbest AChE ve (2AEPS-Fc)-AChE'ın optimum şartları ve Km ve Vmak değerleri..... 32

Çizelge 6.1. İmmobilize edilen ferrosen etiketli polimerin çalışılan pestisitlere karşı göreceli aktivite değişimleri..... 37

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Polimerik nanopartikül şekilleri 4

Şekil 2.2. Polistrenin genel gösterimi 4

Şekil 2.3. Sistein ile fonksiyonelleştirilmiş polistiren tabakasını gösterimi 5

Şekil 2.4. Modifiye edilen polimerlerin β-Galaktosidaz ile olan etkileşimlerin gösterimi 6

Şekil 2.5. Enzim ve polimer arasında ön görülen etkileşimin oluşumu..... 7

Şekil 2.6. Tekrarlanabilirliğin göreceli aktiflikle ilişkisi 8

Şekil 2.7. Çift ferrosen etiketli nanomateryal üzerine immobilize edilen GOD'ın enzimetik mekanizması..... 9

Şekil 2.8. Çalışılan pestisit tespitinde en iyi sonucu veren immobilize polimerik mikroküreler..... 10

Şekil 2.9. Amit içeren (TrisPS-Ntaa)-enzim ve (TrisPS-Ntaa-Fc)-enzim immobilize polimerlerin görüntüsü 10

Şekil 2.10. Enzim immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılan dört farklı yöntem..... 11

Şekil 2.11. Enzim-Substrat etkileşiminin şematik gösterimi 13

Şekil 2.12. Michaelis-Menten grafiği ve Lineweaver-Burk grafiği (K_m: Michaelis-Menten sabiti, V_{mak}: maksimum hız)..... 13

Şekil 2.13. AChE ile asetilkolinin arasında gerçekleşen mekanizma 14

Şekil 2.14. Ellman reaktifin kullanıması sonucunda gerçekleşen tiyokolinin reaksiyon mekanizması 15

Şekil 2.15. Tez çalışmasında kullanılan pestisitlerinin açık formül yapılan..... 16

Şekil 4.1. (AS-Fc) nanokürenin ön görülen yapı 20

Şekil 4.2. (AS-Fc)'nin AChE ile olan tepkimesi sonucunda oluşan etkileşim 21

Şekil 4.3. İmmobilize AChE enzimi ile pestisit tayininin tekrar kullanılabilirliğin deneysel gösterimi 24

Şekil 5.1. Ferrosen etiketli ve etiketli olmayan polimerlere ait EDX spektrumları..... 26

Şekil 5.2. Ferrosen etiketli polimere ait TGA eğrisi 28

Şekil **Sayfa**

Şekil 5.3. Ferrosen etiketli ve ferrosen etiketli olmayan polimerlere ait FT-IR spektrumu 30

Şekil 5.4. Serbest ve immobilize AChE'ın aktifliğine pH ve sıcaklık etkisi..... 31

Şekil 5.5. Serbest ve immobilize AChE'ın aktifliğine substrat derişiminin etkisi 32

Şekil 5.6. İmmobilize AChE enziminin tekrar kullanılabilirliği ve depolama kararlılığı grafikleri 33

Şekil 5.7. İmmobilize AChE enzimi ile pestisit etkileşimlerinin absorbandaki değişimlerine ait Uv-GB spektrumları (A: ilk ölçümler, B: 2.ölçümler)..... 34

Şekil 5.8. Enzimin çalışma şartlarının izlenmesi sırasında uygulanan mekanizma (C)..... 35

Şekil 5.9. Çalışılan pestisitlerin molekül yapıları 35

Şekil 5.10. İmmobilize enzimin çalışılan tüm pestisitler için 4. tekrar kullanılabilirliğindeki absorbans değerleri ve dördüncü tekrarlama ile ilgili verilerin karşılaştırılması..... 36

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 5.1. Ferrosen etiketli destek (AS-Fc) polimerinin SEM (400, 1000 ve 2000 büyütmeli) görüntüsü 25

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	**Açıklamalar**
λ	Dalga Boyu
˚C	Derece santigrat
e.n.	Erime noktası
υ	Frekans
Ph	Hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması
K_m	Michaelis-Menten sabiti
V_{mak}	Maksimum hız

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
AChE	Asetilkolinesteraz
AChI	Asetiltiyokoliniyodür
BHC	Benzen hekzaklorür
CE	Kapiler elektroforez
DTNB	5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GC	Gaz kromatografisi
GOx	Glukoz oksidaz
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
NP	Nanopartikül
PNP	Polimerik nanopartikül
PS	Polistiren
PS-NP	Polistiren-nanopartiküller
TGA	Termogravimetrik analiz
UV-GB	Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi

1. GİRİŞ

Herhangi bir zararlıyı önleme, yok etme, kovma veya azaltma amaçlı kullanılan kimyasallar pestisit olarak ifade edilir. Benzen hekzaklorür (BHC) 1952 yılında üretilen ilk ticari pestisittir. Pestisitlerin çevre ile etkileşimleri, kimyasal yapıları ve etkileri birbirinden farklıdır. Pestisitlerin ciddi etkileri bilinse de kullanıcılar bu farkındalığı uygulamalarına yansıtamamaktadırlar. Pestisitlerin toprak ekosisteminde ve insanlarda zararlı etkileri vardır (biyolojik molekülleri, dokuları ve organları etkileyerek akut veya kronik bozukluklara yol açar). Doğum öncesi de dahil olmak üzere her yaştan insanı etkiler.

Tüm pestisitler kullanıcılar için toksik değildir [1]. Pestisitlerden kaynaklanan risk, kullanıcıların dikkat ve yetenek olgusu iyi olmadığında ve uygun koruma stratejilerini uygulamadığında ortaya çıkmaktadır. Dünya genelinde kullanılan pestisit ve diğer tarım kimyasalların halk sağlığına önemli bir problem oluşturduğu ifade edilmektedir [2]. Ciddi paraquat toksisite, çoklu organ yetmezliği ve ölümcül kan kanseri ile önemli halk sağlığı ortaya çıkmaktadır. Paraquat toksisite, solunum yetmezliği ve ölümle sonuçlanan akciğer bozukluğunun başlıca nedenlerinden biridir [3].

Pestisit kalıntıların ve metabolitlerin analizi gaz kromatografisi (GC), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kapiler elektroforez (CE) gibi çeşitli kromatografik yöntemler kullanılarak yapılabilmektedir [4-6]. Yüksek hassasiyetleri ve seçicilikleri nedeniyle GC ve HPLC bu bileşiklerin tespiti için en sık kullanılan yöntemlerdir. Bununla birlikte, birçok pestisit termal kararsızlık ve düşük uçuculuk sergilediğinden, GC ve HPLC için türevlendirme reaksiyonları, sıkıcı ön işlem prosedürleri ve büyük miktarda organik çözücü gereklidir [7]. Bu nedenle alternatif yöntemler geliştirmek önemli hale gelmiştir.

Bu tez çalışmasında, Asetilkolinesteraz enziminin inhibitörü olan pestisit kalıntılarının belirlenebilmesinde immobilizasyon yönteminin kullanılması amaçlanmıştır. Bu amaçla ferrosen destekli nanoküreler hazırlanmış ve asetilkolinesteraz enzimi immobilize edilmiştir. İmmobilize enzimim optimum koşulları, K_m ve V_{mak} değerleri belirlendikten sonra, Azinfos-etil, azinfos-metil ve tetraklorvinpos pestisitlerinin inhibitör özelliklerinin karşılaştırılması UV-GB spektrumlarının 412 nm deki maksimum absorbanslarının kıyaslanması ile yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

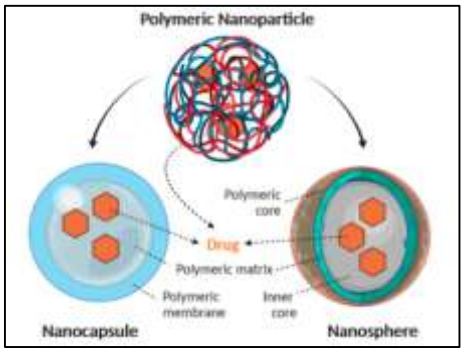
2.1. Polimer Bazlı Nanopartiküller

Polimerik-nanopartikül, 10 ila 1000 nm arasında yer alan bir boyuta sahip katı partiküllerdir. Polimerik nanopartiküller (NP'ler), küçük boyutları sayesinde son yıllarda büyük ilgi görmektedir [8-10]. Polimer bazlı nanopartiküller doğal veya sentetik polimerlerden oluşan kolloidal sistemlerdir. "Nanopartikül" terimi, morfolojilerine göre farklılık gösteren hem nanokapsülleri hem de nanoküreleri kapsamaktadır [11].

Fonksiyonelleştirilmiş NP'ler geniş çapta araştırılmış ve bu araştırmalar devam etmektedir. 1980'lerden bu yana [9] polimerik nanotaşıyıcılar, dendrimerler, nanofiberler, niozomlar, süngerler ve lipozomlar gibi yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Polimer bazlı nanopartiküller, nano boyutları nedeniyle sıklıkla yeni özelliklere sahiptir. Polimerlerin fizikokimyasal özellikleri PNP'lere dönüştürüldüklerinde değişir ve bu da nanobilim ve biyomedikal uygulama alanında uygulanabilirliğini geliştirmektedir [12]. PNP'ler, ilaç biyoyararlanımını iyileştirmek, salınımı uzatmak, sitotoksisiteyi azaltmak, farmakokinetiği iyileştirmek ve hedeflenen hücre veya dokuya daha fazla farmasötik ajan iletmek, bileşenleri enzimatik bozunmadan korumak ve genel olarak verimliliği ve terapötik etkinliği artırmak için önemli bir araç olarak öne çıkmaktadır [13-15].

Nanopartiküllerin hazırlanması için genellikle, poliesterler, poli-alkil-siyanoakrilatlar, polistiren ve amfifilik blok kopolimerler kullanılır. Nanoküreler, maddeyi (iyon, molekül, ilaç gibi) içinde tutulabildiği veya yüzeylerinde adsorbe edilebildiği bir polimerik ağa dayanmaktadır [12-14]. Rezervuar sistemi (nanokapsül) ve matris sistemi (nanosfer) [15] olarak tanınan bu iki tip polimerik NP Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

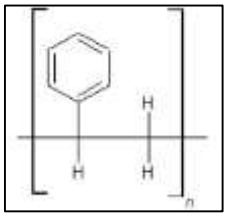


Şekil 2.1. Polimerik nanopartikül şekilleri [16]

Partikül boyutunun yanı sıra nanopartiküllerin şekli hem farmakolojik hem de fonksiyonel açıdan önemlidir. Küresel nanopartiküller yüksek yüzey-hacim oranı ve kendine özgü optik özellikleri sayesinde en çok arzu edilen nanopartiküllerdir. Nanopartiküllerin yüzey yapısı çözünürlüğe, agregasyon özelliklerine, biyolojik bariyerleri aşma kabiliyetine gibi önemli alanlara katkıda bulunur. Mükemmel fizikokimyasal özelliklere sahip PNP'ler, çeşitli biyonanomalzemelerin geliştirilmesinde önemlidir [17,18].

2.2. Polistiren (PS), Polistiren-nanopartiküller (PS-NP) ve Enzim İmmobilizasyonunda Kullanımı

PS, stiren monomerlerinin polimerizasyonu sonucu oluşan aromatik bir polimerdir (Şekil 2.2). PS, yüksek yarı saydamlık, dayanıklılık ve kolayca boyanabilme özelliklerine sahip termoplastik bir polimerdir. Ayrıca gıda depolama ve taşıma, çeşitli ambalaj ürünlerinin üretimi ve oyuncak, klips ve ofis malzemelerinin üretimi için de kullanılmaktadır [19,20].



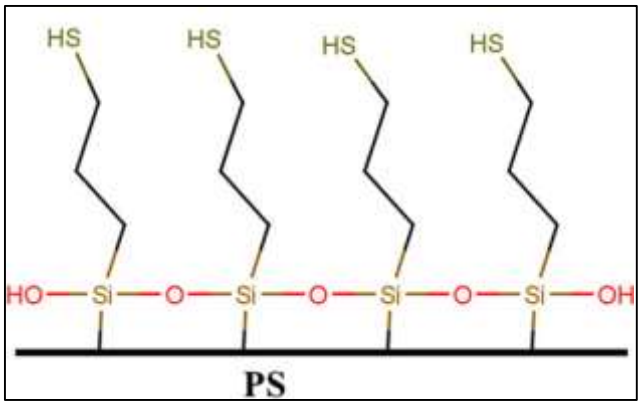
Şekil 2.2. Polistiren'in genel gösterimi

FDA tarafından bildirilen kabul edilebilir günlük alım miktarı (ADI) 90.000 µg/kişi/gündür [20]. Dolayısıyla, PS'nin gıda ve gıda dışı ürünlerde kullanımının insan güvenliği ve sağlığı açısından büyük bir sorun teşkil etmediği görülmektedir [21].

NP'ler, reaktiviteleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olan hacme göre daha yüksek yüzey ilişkisi ile karakterize edilir.

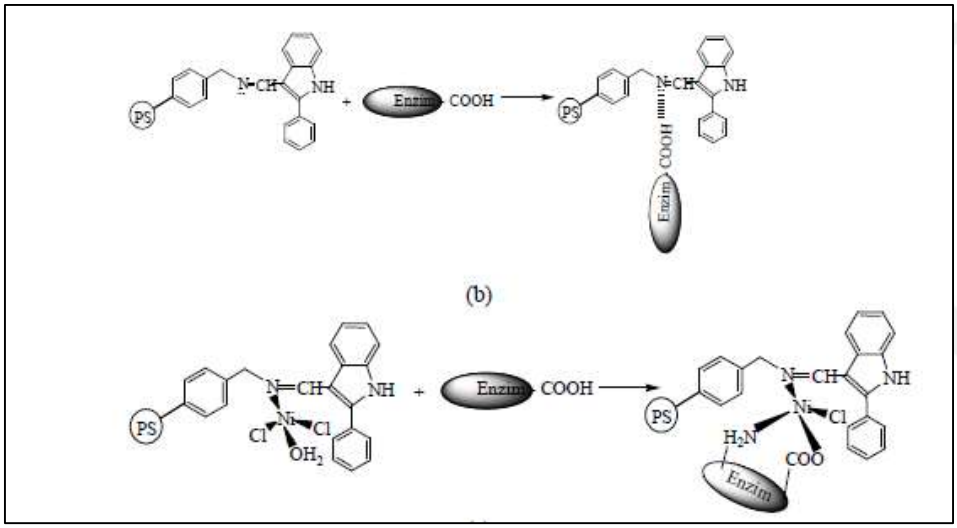
Boyutları, şekilleri ve çeşitli yüzey modifikasyonları nedeniyle PS-NP'ler teknolojik ve biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. NP'lerin kimyasal yüzeyinin modifikasyonları, biyolojik ajanlardaki çözünürlük ve dayanıklılığın yanı sıra biyo-dağılım ve biyo-uyumluluk açısından kilit öneme sahiptir [22]. Biyo-uyumluluk, PS'nin laboratuvar ekipmanı ve biyomedikal cihazların üretiminde yaygın olarak kullanılmasını sağlayan özelliktir [23]. Bu özellik aynı zamanda bu bileşiğin biyolojik sistemlerle olumsuz etkileşime girmemesi gerektiğine karar verir. PS'nin yüzeyi hidrofobiktir ve bu nedenle, örneğin oksidasyon yoluyla kolayca modifiye edilebilir ve hücre kültürleri için oldukça alıcı yüzeyler üretebilir [24]. Bu yüzeyler ayrıca UV ışınlama ve etilen oksit ile sterilize edilebilir [25]. PS-NP'ler, örneğin biyosensör olarak, fotonikte ve kendi kendine bir araya gelen nanoyapılarda geniş çapta kullanılmaktadır [26]. PS'nin biyo-uyumluluğu, bu maddenin NP'lerin biyolojik sistemlerle etkileşimi üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olmamasına neden olur. Modifiye yüzeyli PS-NP'ler homojeniktir. Düşük polidispersiyon indeksi ile karakterize edilirler ve biyolojik sıvılarda kararlı kolloidler oluştururlar [27].

Polistireni sistein amino asidi ile fonksiyonelleştirilerek bakır içeren nanopartikül hazırlayan Kumar ve diğerleri, üreazın kovalent immobilizasyonu için verimli bir nanopartikül tabakası oluşturduklarını ifade etmişlerdir. Böylece, üreaz enzim aktivitesini %72,37 oranında korunduğu, kayda değer bir kullanılabilirlik gösterdiği, serbest enzime kıyasla immobilize enzimin termal ve pH kararlılığında artış sağlandığı belirtilmiştir [28].



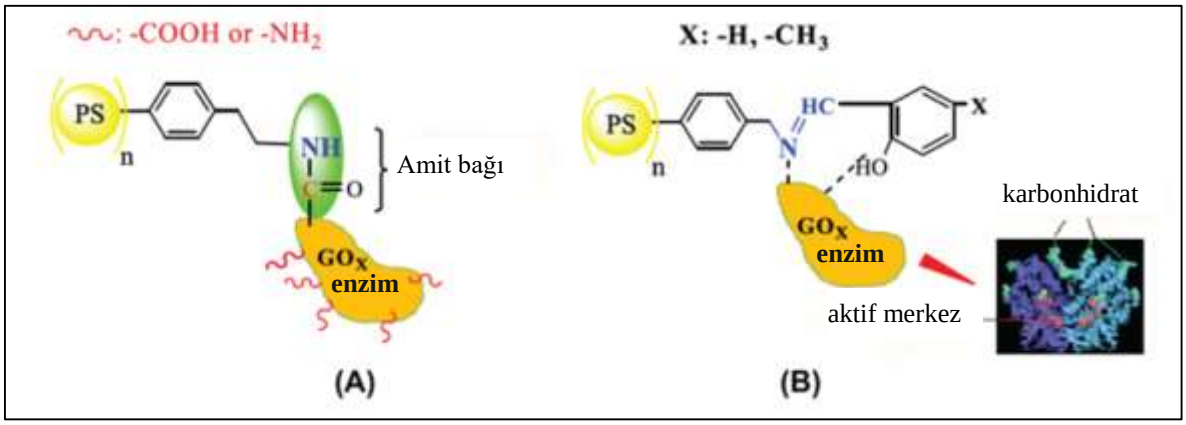
Şekil 2.3. Sistein ile fonksiyonelleştirilmiş polistiren tabakasını gösterimi

(Aminometil)polistirenin (APS) ve 2-fenilindol-3-karboksaldehit (2-PIn-Ald)'in katılma-ayrılma tepkimesi sonucunda polimerik-Schiff bazı (APS– 2PIn-Sch), ve o'nun Ni(II) kompleksi (APS-2PIn-Sch-Ni)'ni hazırlayan araştırmacılar kovalent bağlama yöntemi ile β-Galaktosidazı immobilize etmişlerdir. Serbest ve immobilize β-Galaktosidaz üzerine sıcaklık, pH, tekrar kullanım, depolama kararlılığı gibi parametrelerin etkisini araştıran Aynacı ve diğerleri immobilize edilen enzim için Km değerlerini sırasıyla 0,0363 mM ve, 0,380 mM olarak bulmuşlardır. (APS-2PIn-Sch-Ni) kodlu polimerik-nanokürelerin depolama kararlılığın diğer nano-polimere oranla daha yüksek çıktığını ifade etmişlerdir [29].



Şekil 2.4. Modifiye edilen polimerlerin β-Galaktosidaz ile olan etkileşimlerin gösterimi

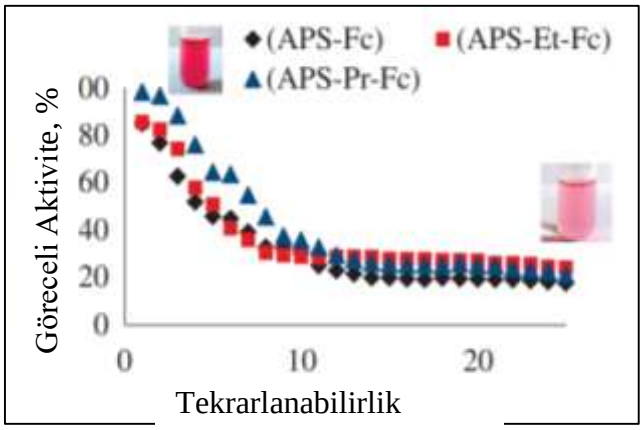
Amin destekli polistiren ile salisilaldehit ve 5- metilsalisilaldehitin kondenzasyon reaksiyonu sonucunda Schiff bazı takılı polimeri sentezleyen Kayhan ve diğerleri, Glukoz oksidaz (GOx) enzimini adsorpsiyon yöntemi ile immobilize ederek (Şekil 2.5), hem serbest hemde immobilize Glukoz oksidaz enzim üzerine olan pH, sıcaklık, depolama kararlılığı ve tekrar kullanım parametrelerin etkisi araştırmışlardır. Araştırmalarının sonunda, Schiff bazı takılı polimere immobilize edilen enzim için, iki optimum pH belirlenmiştir. Lineweaver-Burk eğrilerinden fayadalanarak, Vmax değeri C'de 1,069 mM.min-1 değeri ile (PSA–SalH) üzerine immobilize edilen GOx'in en büyük değere sahip olduğu ifade edilmiştir [30].



Şekil 2.5. Enzim ve polimer arasında ön görülen etkileşimin oluşumu

Özdem ve diğerleri, (aminometil)polistiren (APS) ile tiyofenaldehit ve o'nun türevleri olan, 5- klortiyofenaldehit, 5-metiltiyofenaldehit lerin katılma-ayrılma reaksiyonu sonucunda üç yeni Schiff bazı içeren polimerler sentezleyerek, Glukoz oksidaz (GOx) enzimini immobilize etmişlerdir. Enzimin substrat ile olan hızı sübstitüent içermeyen polimerik Schiff bazlarında 1,0948 mM/min^{-1} değeri ile en büyük değere sahip olduğunu belirlemişlerdir [31].

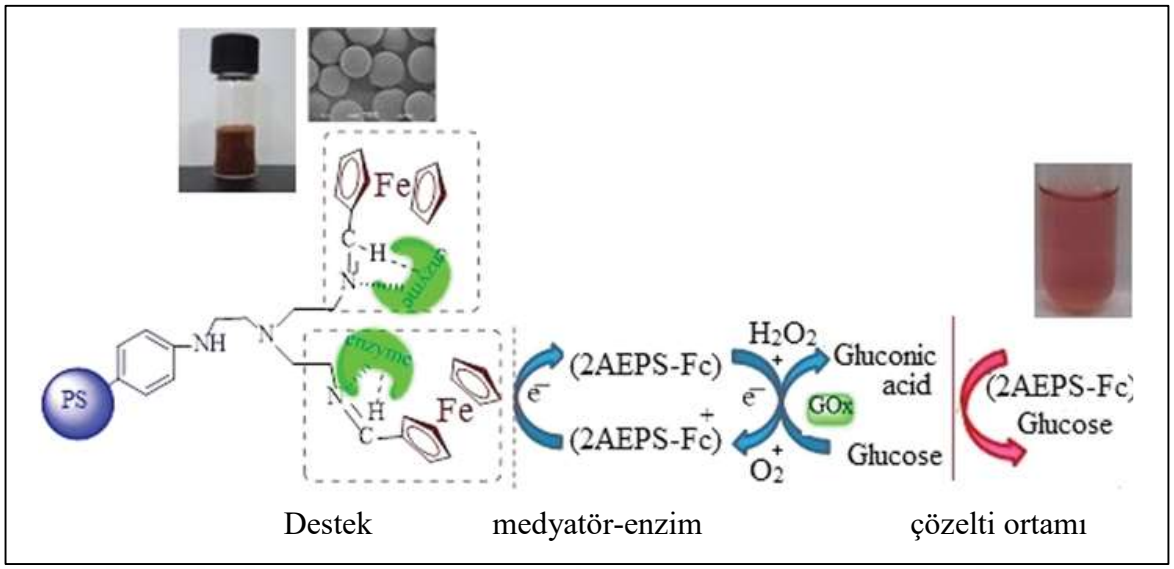
Glukozu belirleyabilmek için üç yeni ferrosen katkılı nanoküreler hazırlayan Antepli ve diğerleri, Ferrosen takılı nanokürelerin yüzeyindeki değişiklikleri SEM/EDX ile inceledikten sonra, β-Glukoz oksidaz (GOx) enzimini nanoküreler üzerine immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyon yöntemi olarak adsorpsiyon yöntemini uygulayan araştırmacılar immobilize edilen enzim için, optimum pH ları, pH=7,0, ve pH=8,0 olarak bulmuşlardır. Vmax / Km değerleri ise immobilize edilen enzim için, sırasıyla farklı destek polimerlerinde 0,274 mM.dak^{-1} /2,47 mM, 76,92 mM.dak^{-1}/ 4,61 mM ve 71,43 mM.dak^{-1} / 3,75 mM olarak bulunmuştur [32.] Araştırmacılar mükemmel tekrarlanabilirlik olduğunu ifade etmişlerdir (şekil 2.6).



Şekil 2.6. Tekrarlanabilirliğin göreceli aktiflikle ilişkisi

Sönmez ve diğerleri 2017 yılında, L-glisin ile (4-formil-3-metoksifenoksimetil)polistiren (FMPS) ile modifiye edilmiş mikroküreler kullanılarak glukoza duyarlı yeni bir biyosensör hazırlamışlardır. Glukoz oksidaz enzimi, glutaraldehit ile çapraz bağlanarak modifiye karbon pasta elektrot üzerine immobilize edilmişdir. Enzimatik olarak elde edilen H_2O_2'in yükseltgenmesi glukoz tayini için kullanmışlar, optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 50 °C ve 8.0 olarak bulmuşlardır. Biyosensörün, 20 ölçümden sonra %3,3 bağıl standart sapma ile mükemmel tekrarlanabilir sonuçlar verdiğini ve ayrıca iyi bir depolama kararlılığına sahip olduğunu tespit etmişlerdir [33.]

Glukoz tayinindeki tekrarlanabilirlik perfermansını araştıran Yetim N K ve arkadaşları 2015 yılında, çift ferrosen etiketli nanomateryal tasarlanmışlardır (şekil. 2.7) . Bu çalışmada, çift etiketli ferrosen, N-(2-[Bis(2-aminoetil)amino]etil)aminometil-polistiren (2AEPS) ve ferrosen aldehit (Fc) içeren yeni nanopartiküller kondensasyon yoluyla sentezlenmiş ve üzerine immobilize edilen glukoz oksidaz enziminin (GOD) enzimatik özellikleri araştırılmıştır. 2AEPSFc-GOD, kırk beş ardışık döngüden sonra başlangıç aktivitesinin %15'inden fazlasını koruduğu belirtilmiştir [34].

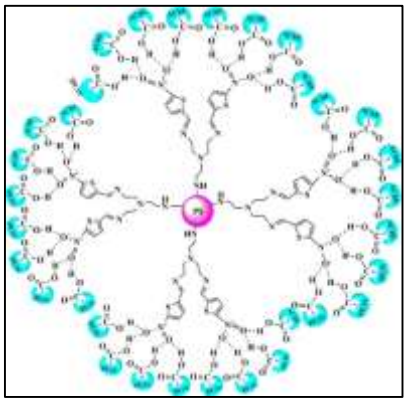


Şekil 2.7. Çift ferrosen etiketli nanomateryal üzerine immobilize edilen GOD'ın enzimetik mekanizması

Polistiren destekli Schiff bazı ve kompleskleri üzerine AChE immobilize ederek pestisit tayini üzerine ilk çalışmanın 2018 yılında lisansüstü tezle Karmaz tarafından yapılarak, 2021 yılında Karmaz ve diğerleri tarafından yayımlandığı görülmektedir [35,36].

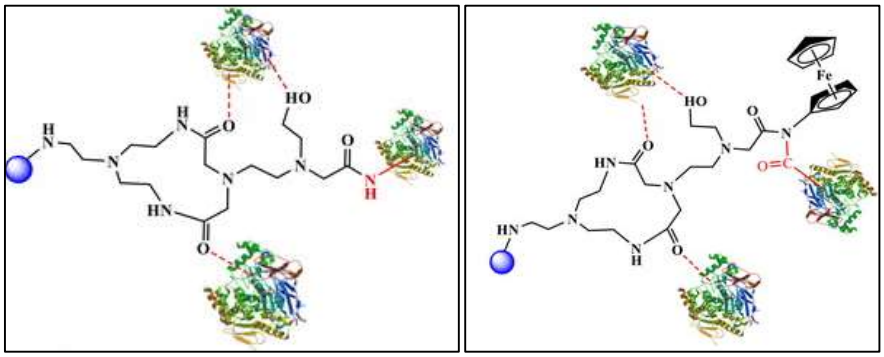
Asetilkolinesteraz enziminin (AChE), organofosfatları uzaklaştırabilme özelliğinden faydalanan Özkan E.H ve diğerleri polistiren destekli Schiff bazları ve onların Pt(II) ve Pd(II) koordinasyon polimerlerini sentezlemek için triptofandan faydalandıklarını, 10^{-7} M derişimindeki Phosmet (OPs) tespiti için iyi bir analitik performans gösterdiğini ifade etmişlerdir [37].

Diklorvos (DDVP: 2,2-diklorovinil dimetil fosfat) ve klorpirifos (O,O-Dietil O-3,5,6-trikloropiridin-2-il fosforotiyoat) pestisitlerini tespit etmek için asetilkolinesteraz (AChE) enzimi immobilize edilmiş polimerik mikroküreler hazırlayan Yetim NK ve diğerleri kürelerin hazırlanmasında tris(2-aminoetil)amin-polistirenden faydalandıklarını ifade etmişlerdir (Şekil 2.8). İmmobilize AChE kullanıldığında, DDVP ve klorpirifos için tespit limit değerlerin sırasıyla 0,42-0,75 µg L^{-1} ve 0,34-4,23 µg L^{-1} aralığında elde ettiklerini ifade etmişlerdir [38].



Şekil 2.8. Çalışılan pestisit tespitinde en iyi sonucu veren immobilize polimerik mikroküreler

İnsektisitlerin kalitatif tanımlanması için kondenzasyon reaksiyonu ile amid içeren polimerler (TrisPS-Ntaa ve TrisPS-Ntaa-Fc) sentezleyen Nartop ve diğerleri kızılötesi spektroskopisi (IR), taramalı elektron mikroskobu-enerji dağılımlı X-ışını spektrometresi (SEM-EDX) ve jel permeasyon kromatografisi (GPC) ile karakterizasyondan sonra, asetilkolinesteraz enzimini (AChE) polimerlere kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Buna göre, bazı tarımsal ürünlerde zararlı organizmaları önlemek için kullanılan organofosfat (malathion, acephate, chlorpyrifos methyl) ve karbamat (carbofuran, methiocarb, methomyl)'ın AChE üzerindeki inhibitör aktivitelerini enzimatik olarak belirlediklerini ifade etmişlerdir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Amit içeren (TrisPS-Ntaa)-enzim ve (TrisPS-Ntaa-Fc)-enzim immobilize polimerlerin görüntüsü

AChE enzimi ile pestisitler arasındaki etkileşim sonuçlarına göre, en güçlü inhibitör etkiyi sırasıyla karbofuran ve asefatın gösterdiğini belirtmişlerdir [39].

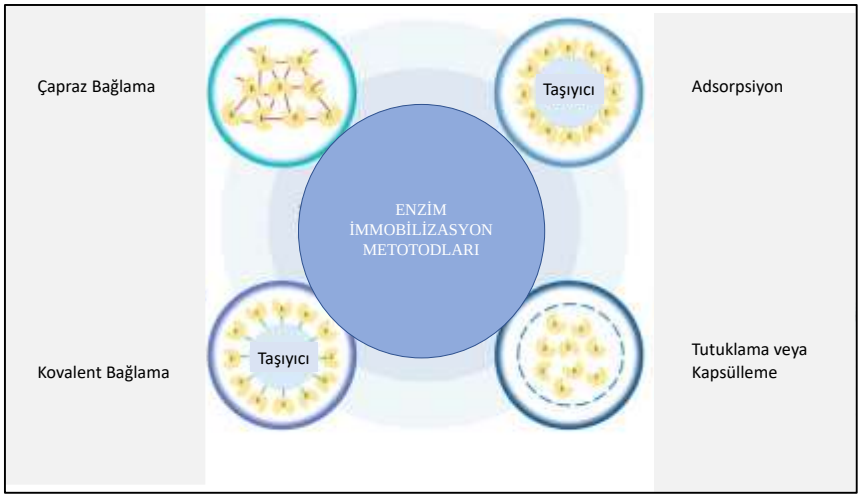
2.3. Enzimi İmmobilize Etme Yöntemleri

Enzimler biyolojik katalizörler olup, canlı organizmalarda biyokimyasal reaksiyonları hızlandırırılar. Enzim tanımı ilk olarak 1878 yılında ifade edilmiş ve Alman fizyolog Wilhelm Kühne tarafından kullanılmışdır. Mayanın şekerlerden alkol üretme kabiliyetini tanımlayan enzim Yunanca en ('içinde' anlamına gelir) ve zume ('maya' anlamına gelir) kelimelerinini biraraya getirilmesi ile türetilmiştir. Enzimler çok düşük konsantrasyonlarda kullanılır ve reaksiyon sırasında kendileri tüketilmeden reaksiyonu hızlandırırlar. Enzimleri genellikle substrat moleküllerinin ürün moleküllerine dönüşümünü katalizleyebilenler olarak aşağıdaki gibi tanımlarız:

Substrat ⇌ Enzim ⇒ Ürün

Enzimler, insanlık tarihinin uzun bir döneminden beri katalizör olarak kullanılmaktadır. Ancak, izole enzimlerin endüstriyel süreçlerde kullanımı ancak on dokuzuncu yüzyılın sonlarında başlamıştır [40].

Farklı desteklerin ve enzimlerin özellikleri nedeniyle, immobilizasyon için genel bir hazırlama yöntemi uygulamak mümkün değildir. Şekil 2.10'da gösterildiği gibi, enzim immobilizasyonunun dört farklı yöntemi vardır (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Enzim immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılan dört farklı yöntem

2.3.1. Çapraz bağlama yöntemi

Enzim moleküllerinin birbiri ile yada başka fonksiyonel gruplarla çapraz bağlanması şeklinde gerçekleşir. Bu bağlanma sonucunda bazen enzim aktivitesinde azalma meydana gelebilir. Çapraz bağlanma ile enzimin aktif bölgesinin yapısı değişebilmektedir.

2.3.2. Adsorpsiyon yöntemi

Adsorpsiyon yönteminde temel olarak van der Waals etkileşimleri, hidrofobik etkileşimler veya elektrostatik etkileşimler mevcuttur. Bu yöntemde, polimerler ve enzimler arasında kimyasal bağ oluşmaz, bu da enzimlerin konfigürasyonunda değişikliğin olmadığı veya önemli ölçüde daha az olduğu anlamına gelir. Enzimlerin van der Waals etkileşimleri, elektrostatik ve hidrofobik adsorpsiyon ile immobilizasyonu, enzimin aktivitesinin maksimum düzeyde korunmasını sağlayabilir. Ayrıca, bu yöntemin uygulanması nispeten daha kolay, basit ve ucuzdur [41].

2.3.3. Kovalent bağlanma

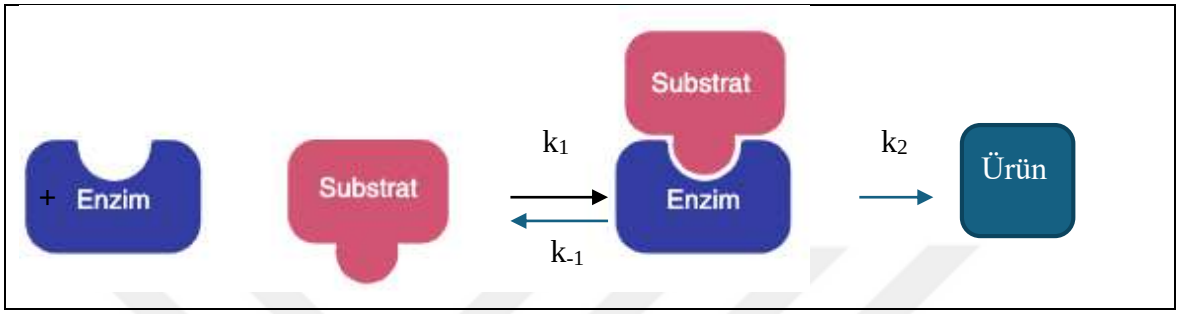
Enzimlerin fonksiyonel grupları ile destek arasında kovalent bağların oluşmasıyla enzimleri immobilize etmek oldukça yaygındır. Bu yöntemde, enzimler kovalent bağlarla yüzeyde sıkıca tutulur, bu yöntemde immobilize edilen enzimlerin reaksiyonlar sırasında ayrılmasının düşük olduğu ve endüstriyel ölçekli reaksiyonlar için daha uygun olduğu anlamına gelir [39,40].

2.3.4. Tutuklama

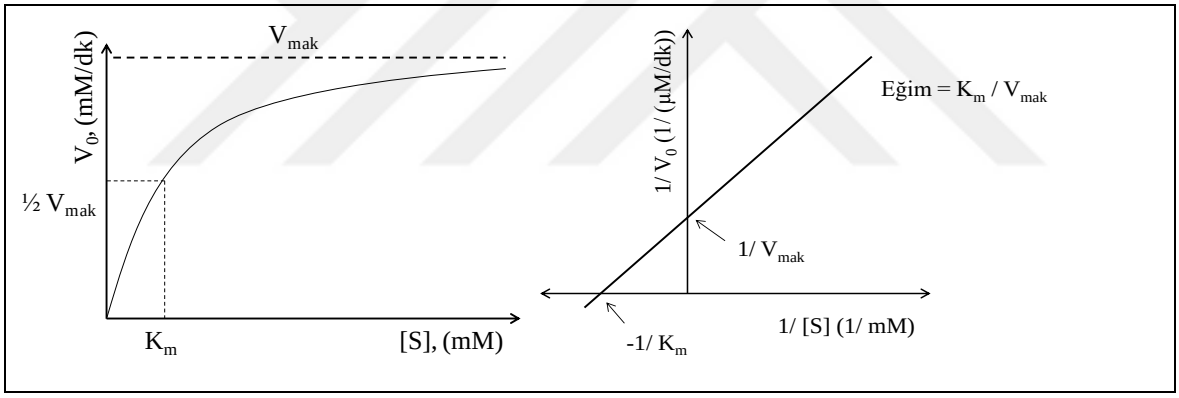
Adsorpsiyon yöntemlerinin aksine, tutuklama yönteminde enzimler destekleyicilerinin yüzeyinde düz bir şekilde bulunmazlar. Bunun yerine, polimerik matris içinde fiziksel olarak hapsedilirler. Bu yöntem enzimleri zorlu ortamlardan koruyabilir ve kararlılığı artırabilir. Bununla birlikte, fiziksel adsorpsiyonda olduğu gibi, enzimler polimer içinde fiziksel olarak hapsedilir [42].

2.4. Enzimin Kinetiği

Enzim ile ilgili olan reaksiyonların hızları ve reaksiyon parametrelerindeki değişimler enzim kinetiği ile incelenir. Şematik gösterimde yer alan k_1 hız sabiti k_2 ye göre yüksektir bu nedenle enzimatik tepkimenin hızı k_2 hız sabitine göre belirlenir.



Şekil 2.11. Enzim-Substrat etkileşimin şematik gösterimi



Şekil 2.12. Michaelis-Menten grafiği ve Lineweaver-Burk grafiği (K_m: Michaelis-Menten sabiti, V_{mak}: maksimum hız)

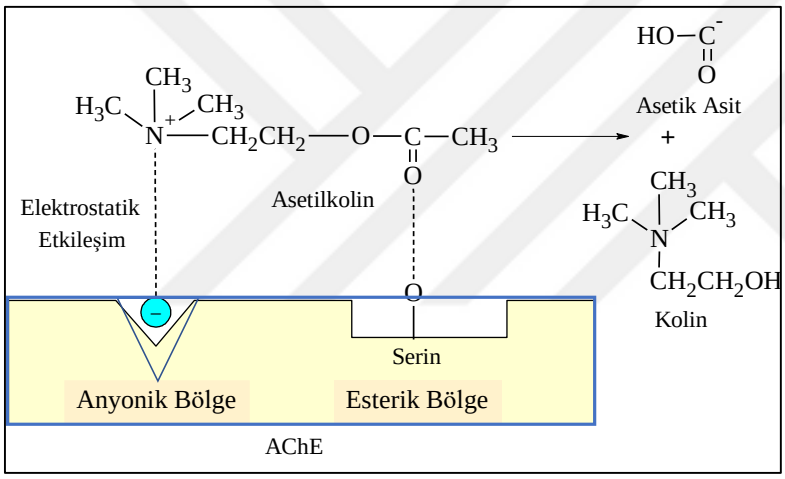
Yukarıda verilen grafiklerde, substrat konsantrasyonun artmasıyla reaksiyon hızı başlangıçta doğrusal artarken, enzim subsrata doymaya başladıkça, reaksiyon hızı substrat konsantrasyonuna paralel olarak artışın olmadığı görülmektedir [43].

$$V_0 = \frac{V_{mak}\, x\, [S]}{K_m + [S]} \qquad K_m = \frac{(k_1 + k_2)}{k_1} \tag{2.1}$$

Michaelis-Menten eşitliği (Eş. 2.1), verilerin daha kolay çizilebilmesi için *Lineweaver-Burk* eşitliği (Eş. 2.2) elde edilir. *Lineweaver-Burk* eşitliğinden faydalanarak elde edilen grafik ile K_m ve V_{mak} değerleri hesaplanır [42].

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{mak}\, x\, [S]} + \frac{1}{V_{mak}} \qquad (2.2)$$

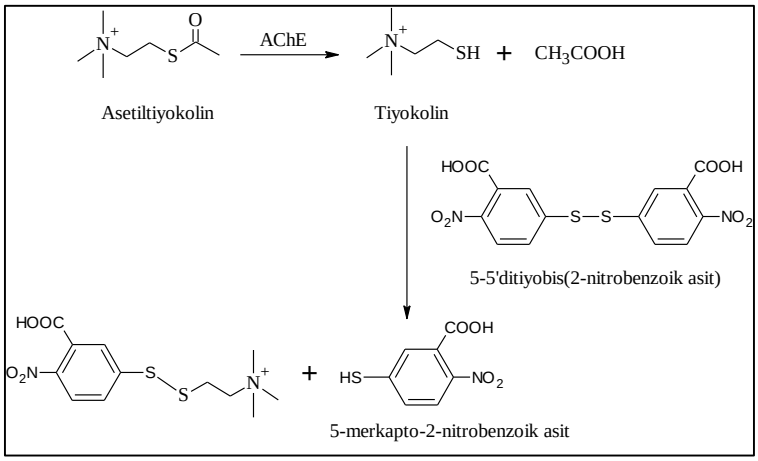
Asetilkolinesteraz (EC 3.1.1.7; AChE; asetilkolin hidrolaz) bir nörotransmitter olan asetilkolinin (ACh) hidrolizini katalize eden bir serin hidrolazdır. Bu nedenle sinapstaki ACh konsantrasyonunu düzenler. Bu enzimin tamamen bloke edilmesi (örneğin sinir gazı sarin ile) ölümcüldür. Asetilkolinesterazın aktif merkezi anyonik ve esteratik olmak üzere iki ana alt birimden oluşur (Şekil 2.13.). Katyon grupların varlığında AChE'a bağlanma hızında önemli olan bir etkileşim türü vardır ki, bu etkileşim türü elektrostatik etkileşimdir. Anyonik bölge asetilkoline bağlandığında asetilkolindeki ester bağı enzimin esteratik bölgesiyle etkileşir ve esterik bölgedeki serin kalıntısına bağlanır [42, 43].



Şekil 2.13. AChE ile asetilkolin arasında gerçekleşen mekanizma

2.5. Ellman Metodu

Asetilkolinesteraz enziminin aktivitesi spektroskopik olarak tayin edilirken Ellman yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Ellman yönteminde substrat olarak asetiltiyokolin kullanılır ve aralarındaki tepkime sonucunda oluşan tiyokolin DTNB [5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)] reaktifi ile tepkimeye girer. Böylece oluşan sarı renkli 5-merkapto-2-nitrobenzoik asitin UV-GB spektrofotometre cihazında 412 nm'deki absorbansın okunması temeline dayanmaktadır.



Şekil 2.14. Ellman reaktifin kullanıması sonucunda gerçekleşen tiyokolinin reaksiyon mekanizması

2.6. Pestisitler

Pestisitler böcekleri, kemirgenleri, mantarları ve yabani otları ortadan kaldırmak için kullanılan kimyasal bileşiklerdir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) pestisitleri, gıda üretimini, depolanmasını ve taşınmasını etkileyen herhangi bir haşere, hayvan veya insan hastalığına neden olan istenmeyen bitki veya hayvan türlerini kontrol etmek, önlemek, yok etmek için katılan madde veya madde karışımı olarak tanımlamaktadır [44].

Pestisitler, fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre iki ana kategoride sınıflandırılır. Biyopestisitler doğal olarak oluşan pestisitler olup bitki, bakteri ve mantarlar gibi canlılar tarafından oluşturulur. Sentetik pestisitlerin çoğunluğunu organik kimyasallar oluşturmaktadır ve bunlar organofosfatlar, organoklorinler, karbamatlar ve piretroidler olarak dört grupta toplanmıştır [44].

Pestisitler, modern tarım teknikleri ve gelişmiş mahsul üretimi için ideal adaylar olsa bile, ciddi sağlık sorunlarına yol açmaktadır. Pestisitlerin doğal hormonları taklit edebilmesi sonucunda hormonal yapıları dengesizleştirebilir, bağışıklığı azaltabilir, kansere ve üreme ile ilgili diğer sorunlara neden olabilir [45].

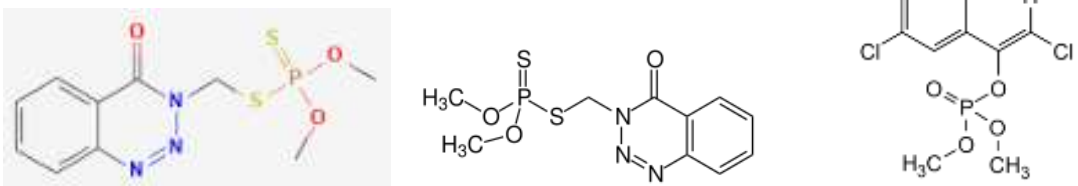
Pestisitlere doğrudan maruz kalan bir kişinin baş, boyun, meme, tiroid, beyin, kolorektal, pankreas, akciğer, lösemi, prostat, lenfoma ve yumurtalık kanseri gibi çeşitli insan

kanserlerine neden olduğu gözlemlenmiştir [45]. DNA, canlı organizmalarda bulunan, kalıtsal bilgileri taşıyan ve proteinlerin ve enzimlerin biyolojik sentezini kontrol eden önemli bir biyomoleküldür. İlaç ve pestisitler gibi kimyasalların DNA ile etkileşime girer ve gen mutasyonlarına neden olabilecek ve karsinogenez gibi olumsuz sağlık sonuçlarına yol açabilecek konformasyonel değişikliklere neden olur [45,46].

Bilim camiası, pestisit kirliliğinin azaltılmasına yönelik yaratıcı yaklaşımlar bulmak için yoğun bir şekilde çalışmaktadır [47,48]. Çevre dostu olabilecek stratejilerle, pestisit sorunlarını çözmek veya alternatif yeşil çözümler geliştirmek için çeşitli yaklaşımları uygulanmaktadır. Bunlardan, enzimatik bozunma ile pestisitleri parçalayabilen veya belirleyebilen araştırmaların giderek daha hayati hale geldiği görülmektedir.

2.6.1. Tez çalışmasında kullanılan pestisitler

Azinfos-etil ve Azinfos-metil emici ve çiğneyici haşereleri kontrol etmek için kullanılan bir organofosfat insektisittir. Sudaki çözünürlüğü düşüktür, nispeten uçucudur. Memeliler için toksiktir. Nörotoksiktir ve bir asetil kolinesteraz inhibitörüdür. Tetraklorvinpos genellikle çiftlik hayvanlarında sinekleri kontrol etmek için yem katkı maddesi olarak ve evcil hayvanlarda kene ve pireleri kontrol etmek için kullanılır. Göz yaşartıcıdır ve bir kolinesteraz inhibitörüdür (Şekil 2.15).



azinfos-etil azinfos-metil tetraklorvinpos

Şekil 2.15. Tez çalışmasında kullanılan pestisitlerinin açık formül yapıları

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Maddeler

Kullanılan kimyasal madde ve üretici firma bilgileri aşağıda belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal madde ve üretici firma bilgileri

Kimyasal Madde	Üretici Firma
(Aminometil)polistiren (3,5-5,0 mmol/g N / 200-400 mesh)	Sigma-Aldrich
N,N-Dimetilformamit, susuz 99,8%	
p-nitrofenil palmitat (N2752)	
Sodyum DihidrojenFosfat(NaH_2PO_4,120g/mol)	
Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4,142 g/mol	
Asetil tiyokolin iyodür, ≥ 98 %	
Sodyum Hidroksit (NaOH,40 g/mol)	
Hidroklorik Asit	
$NaHCO_3$	
5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB)	
AChE (elektrikli yılan balığından izole) (518 units/mg, 10KU)	
Asetonitril	
Ferrosen Karboksaldehit(% 98)	
Etanol (46,070 g/mol, % 99.8)	
Azinfos-metil	
Azinfos-etil	
Tetraklorvinpos	Carlo Erba
Aseton	Emir Kimya

3.2. Kullanılan Cihazlar

pH metre

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

Çalkalamalı, sıcaklık kontrollü su banyosu

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

Ultraviyole – Görünür bölge spektrofotometresi

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

Element analizi

Element analizleri LECO, CHNS-932 elementel analiz cihazı ile Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi araştırma laboratuvarında yapılmıştır

FT-IR (Fourier Transform Infrared) spektrometri cihazı;

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

SEM/EDX (Taramalı Elektron Mikroskobu/Enerji Dağılım X-ışını Kırınımı)

AS-Fc polimerlerinin SEM/EDX'leri QUANTA 400F Field Emission cihazı ile ODTÜ merkez laboratuvarında yapılmıştır.

TGA (Termografik Analiz)

Numunelerin termal bozunmaları ve kütle kayıpları, 25 ^oC - 900 ^oC sıcaklık aralığında 10 ^oC/dakika ısıtma hızında ve $N_2(g)$ atmosferinde Setaram marka Simultaneous TG/DTA cihazı ile ODTÜ merkez laboratuvarlarında incelendi.

4. DENEYSEL YÖNTEM

4.1. Hazırlanan Çözeltiler

4.1.1. Tampon çözeltileri

-pH 4 tamponu 36 numaralı kaynağa göre hazırlandı; 100 mL saf su içerisinde, 6,24 g NaH_2PO_4 çözündü. Üzerine H_3PO_4 çözeltisinden eklendi. Ekleme işlemine pH 4 olana kadar devam edildi.

-pH 5 tamponu 36 numaralı kaynağa göre hazırlandı; 50 m'lik hacimde 0,25 M asetik asit çözeltisi hazırlandı. Çözelti üzerine 0,25 M sodyum asetattan eklendi. Ekleme işlemine pH 5 olana kadar devam edildi.

-pH 6-9 tamponları 36 numaralı kaynağa göre hazırlandı.

4.1.2. Enzim aktiflik tayininde kullanılan çözeltiler

- Asetilkolinesteraz enzim çözeltisi (AChE); kaynaklara göre hazırlanmış [42, 43] 1mL'lik enzim çözeltisinin -20˚C'deki hali oda sıcaklığına getirilerek saf su ile 2mL'ye seyreltildi.

- Asetiltiyokolin iyodür çözeltisi; 0,075 M stok substrat çözeltisi hazırlandı. 0,216 g asetil tiyokolin iyodür 10 mL balon joje ye konularak hacim çizgisine kadar saf su ile tamamlandı.

- 5,5′-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB); 39,6 mg 5,5-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit 10 mL balon jojeye konulduktan sonra pH 7 fosfat tamponu ile çözündü, üzerine 15 mg sodyum bikarbonat ilave edilerek 0,01 M çözeltisini hazırlandı.

4.1.3. Pestisit çözeltilerinin hazırlanması

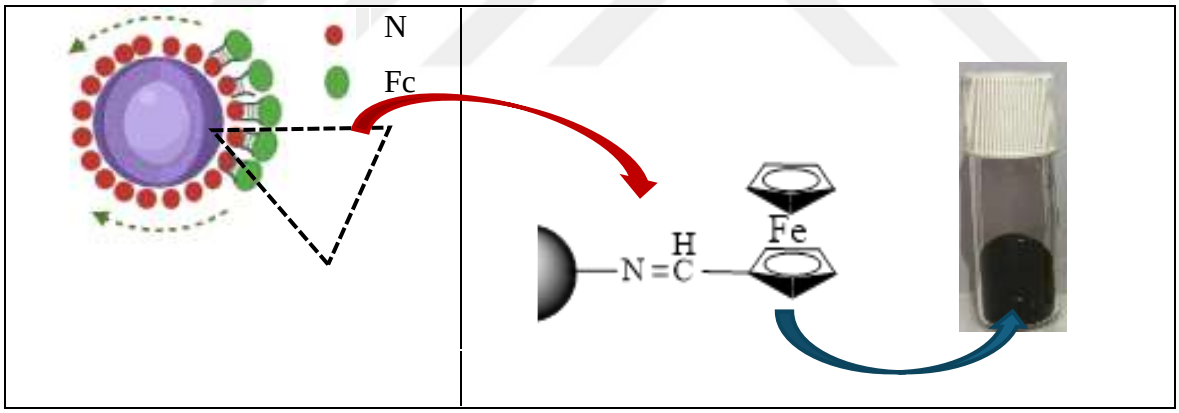
-Azinfos-etil çözeltisini hazırlamak için ($1,57 \times 10^{-6}$ M) 0,54 mg Azinfos-etil tartıldı. Saf su: asetonitril (1:5) çözücü ortamında çözüldü.

-Azinfos-metil çözeltisini hazırlamak için (1,57 x 10^{-6} M) 0,47 mg Azinfos-metil tartıldı. Saf su: asetonitril (1:5) çözücü ortamında çözüldü.

-Tetraklorvinpos çözeltisini hazırlamak için (1,57 x 10^{-6} M) 0,57 mg Tetraklorvinpos tartıldı. Saf su: asetonitril (1:5) çözücü ortamında çözüldü.

4.2. Ferrosen Etiketli Destek Polimerlerinin Sentezi (AS-Fc)

Ferrosen etiketli destek polimeri sentezlemek için küre yapısında olan (aminometil)polistiren ile ferrosen karboksaldehitin katılma-ayrılma tepkimesinden yararlanılmıştır. 25 mL dimetilformamit (DMF)'de çözülmüş 1 g (aminometil)polistiren, geri soğutucuya bağlanmış iki boyunlu cam balona konuldu. 80˚C'de karıştırma işlemi yapılırken etil alkolde çözülmüş 0,6 g ferrosenkarboksaldehit damla damla balondaki (aminometil)polistiren çözeltisi üzerine ilave edildi. 3 saat geri soğutucu altında karıştırma ve ısıtma işlemine devam edildi.



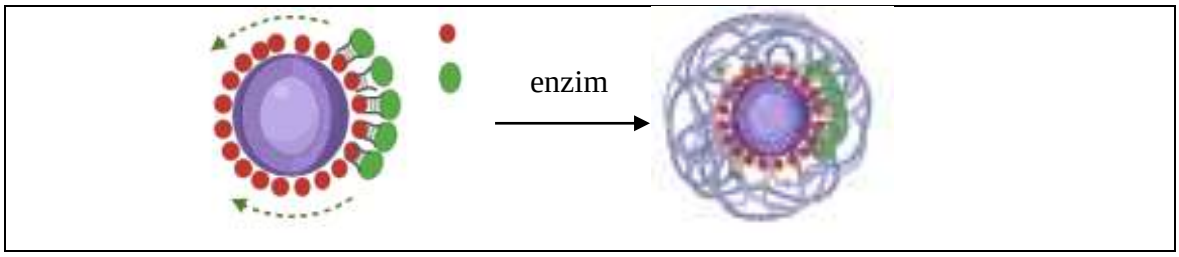
Şekil 4.1. (AS-Fc) nanoküreler için ön görülen yapı

Üç saat sonra temiz 50 mL'lik behere alınan karışım oda sıcaklığında bekletildikten sonra, aseton ile çöktürülerek süzüldü. (AS-Fc) kodlu polimer (şekil 1), 1:1 aseton-su ile 3 defa yıkandı ve 80˚C'deki etüvde 1 gün boyunca kurutuldu (Ürün 1,2203 gram. Verim %76,25).

4.3. Ferrosen Etiketli Destek Polimerlere AChE Enziminin İmmobilizasyonu

Ferrosen etiketli destek polimerinden 1,0 gram tartılarak iki boyunlu hücre kabına konulduktan sonra üzerine 10 mL DMF eklendi. Daha sonra karşımın bulunduğu balon

içerisine Bölüm 3.2.'de belirtildiği şekilde hazırlanan stok enzim çözeltisinden 1 mL eklendi. 3 saat geri soğutucu altında oda sıcaklığında (25 °C) karıştırma işlemine devam edildi. Tepkime sonunda, katı maddeler aseton-su (1:1) ile yıkanarak, tutulmayan enzim uzaklaştırıldı.



Şekil 4.2. (AS-Fc)'nin AChE ile olan tepkimesi sonucunda oluşan etkileşim

4.3.1. İmmobilizasyon üzerine çalışmalar

<u>İmmobilize asetilkolinesteraz enziminin aktifliğine pH etkisi</u>

Altı adet 5 mL'lik balon joje içine ferrosen etiketli polimerden 6'şar mg konuldu. Her balon joje üzerine pH tamponlarının (pH=4-9) her birinden 4'er mL eklendi. Polimer ve tamponların bulunduğu ortama, asetiltiyokolin iyodür çözeltisinden 40 µL eklendi. Oda sıcaklığındaki ultrasonik su banyosunda beş dakika karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra 50 µL DTNB eklenerek 15 dakika daha karıştırma işlemine devam edildi. Farklı tampon ortamlarında hazırlanmış karışımdan spektrofotometre hücresine konularak 412 nm'deki absorbans değişimi UV-GB spektrofotometresi cihazıyla takip edildi. Elde edilen değerler grafiğe çizilerek optimum pH belirlendi. Serbest enzim için de aynı koşullarda deney yapılarak aktifliğine pH'nın etkisi de incelendi.

<u>İmmobilize asetilkolinesteraz enziminin aktifliğine sıcaklık etkisi</u>

Yedi adet 5 mL'lik balon joje içine ferrosen etiketli polimerden 6'şar mg konuldu. Polimerlerin bulunduğu balon jojeye optimum pH'daki tampondan ve 40 µL stok asetiltiyokolin iyodür (substrat) çözeltisinden ilave edildi. 50 µL DTNB eklendiken sonra ultrasonik su banyosunda 15 dakika karıştırıldı. Optimum tampon ortamında hazırlanan karışımdan spektrofotometre hücresine konuldu ve 412 nm'deki absorbans değişimi UV-GB spektrofotometresi cihazıyla takip edildi. Bu işlem 20˚C-80˚C sıcaklık değerleri arasında

10 ˚C artışlarla tekrarlandı. Bu değerler grafiğe geçirilerek immobilize enzim için optimum sıcaklık değerleri belirlendi. Serbest enzim için de aynı şekilde aktifliğe sıcaklığın etkisi incelendi.

İmmobilize asetilkolinesteraz enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Substrat (asetiltiyokolin iyodür) derişiminin etkisini incelemek için immobilize edilmiş ferrosen etiketli polimerden 6'şar mg on adet balon joje içerisine konuldu. Her birinin üzerlerine 0,075 M' stok asetiltiyokolin iyodür çözeltisinden 10-100 µL arasında değişen miktarda ilave edildi. Balon jojedeki toplam hacim (2940-2850) µL olacak şekilde tampon çözeltisinden ilave edildi. Optimum sıcaklığa getirilmiş ultrasonik su banyosunda 15 dakika karıştırıldı. Daha sonra her bir balon jojeye 50 µL DTNB ekleyip 15 dakika daha karıştırma işlemine devam edildi. 0,25–2,50 mM değişen derişime sahip olan balon jojelerdeki çözeltilerinin absorbans değişimleri UV-GB spektrofotometresinde 412 nm de kaydedildi. Serbest enzimin aktifliğine substrat derişiminin etkisi de incelendi**.** Artan substrat derişimine karşı absorbans değerleri grafiğe geçirildi. Lineaweaver-Burk kalibrasyon grafiği çizilerek Km ve Vmak değerleri belirlendi.

İmmobilize asetilkolinesteraz enziminin tekrar kullanılabilirliği

AChE immobilize edilmiş Ferrosen etiketli polimerden 6 mg alınarak 5 mL'lik balon joje içerisine konuldu. 2,5 mL pH 7 tampon çözeltisinden ve 40 µL asetiltiyokolin iyodür çözeltisinden konularak 15 dakika oda sıcaklığında su banyosunda karıştırıldı. Daha sonra 50 µL DTNB balon joje içine eklenerek karıştırmaya devam edildi. Balon jojelerdeki çözeltilerin absorbans değişimleri UV-GB spektrofotometresinde 412 nm de kaydedildi. Balon joje içerisindeki çözücü dekante edilerek uzaklaştırıldı. Geriye kalan AChE immobilize edilmiş ferrosen etiketli polimere aynı işlemler tekrarlandı.

İmmobilize asetilkolinesteraz enziminin depolama kararlılığı

AChE immobilize edilmiş Ferrosen etiketli polimerden 6 mg alnarak 5 mL'lik balonjoje içerisine konuldu. Üzerlerine 2910 µL pH 7 tampon çözeltisi, 40 µL stok asetiltiyokolin iyodür (substrat) ve 50 µL DTNB eklendi ve karışım 15 dakika karıştırıldı. UV-GB spektrofotometresi ile 412 nm'de absorbans değerleri okundu. Yukarıda bahsedilen işlem

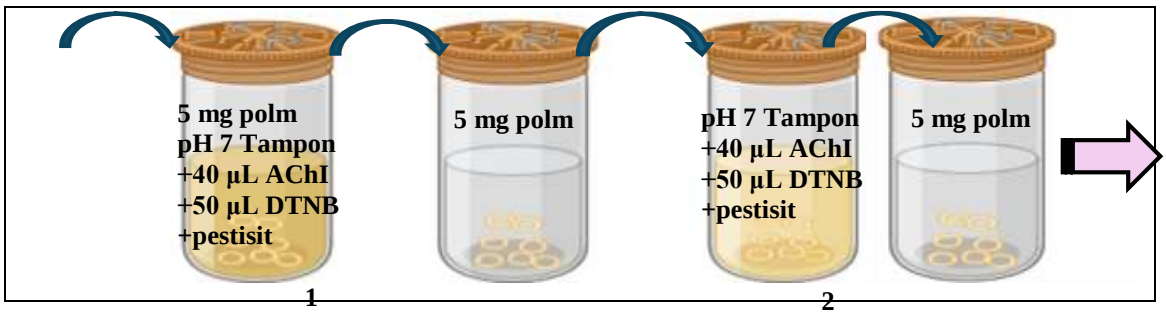
hafta bir defa olmak üzere oda sıcaklığında tekrarlandı. Böylece 8 hafta sonunda immobilize enzimin aktifliğini % kaç koruyabildiği hesaplandı.

4.3.2. İmmobilize AChE enzimi ile pestisit tayini

Üç adet balon joje içine, AChE (Asetilkolinesteraz) enzimi immobilize edilmiş polimerlerden 6'şar mg konuldu. Balon jojelere pH 7 tampon çözeltisi konulduktan sonra 40 µL asetiltiyokolin iyodür çözeltisi eklendi ve su banyosunda 15 dakika karıştırıldı. Bunu takiben karışım üzerine 50 µL DTNB çözeltisi ilave edildi. 10 dakika daha karıştırılarak inkübasyon işleminin olması sağlandı. Daha sonra hazırlanan üç balon joje içerisine, 50 µL stok pestisit çözeltisi eklendi. Pestisit ilavesinden 30 dk sonra, 412 nm dalga boyundaki absorbans değerleri UV-GB spektrofotometre cihazıyla belirlendi.

<u>İmmobilize AChE enzimi ile pestisit tayinindeki tekrar kullanım incelenmesi</u>

Üç adet tüp içine, AChE (Asetilkolinesteraz) enzimi immobilize edilmiş polimerlerden 5'er mg konuldu. Tüplere pH 7 tampon çözeltisi konulduktan sonra 40 µL asetiltiyokolin iyodür çözeltisi eklendi ve su banyosunda 15 dakika karıştırıldı. Bunu takiben karışım üzerine 50 µL DTNB çözeltisi ilave edildi. 10 dakika daha karıştırılarak inkübasyon işleminin olması sağlandı. Daha sonra hazırlanan beş balonjoje içerisine, 50 µL stok pestisit çözeltisi eklendi. Pestisit ilavesinden 30 dk sonra, 412 nm dalga boyundaki absorbans değerleri UV-GB spektrofotometre cihazıyla belirlendi**.** Balon joje içerisindeki çözücü dekante edilerek uzaklaştırıldı. Geriye kalan AChE immobilize edilmiş ferrosen etiketli polimere aynı işlemler 4 kez tekrarlanarak absorbans değerleri kaydedildi.



Şekil 4.3. İmmobilize AChE enzimi ile pestisit tayininin tekrar kullanılabilirliğin deneysel gösterimi

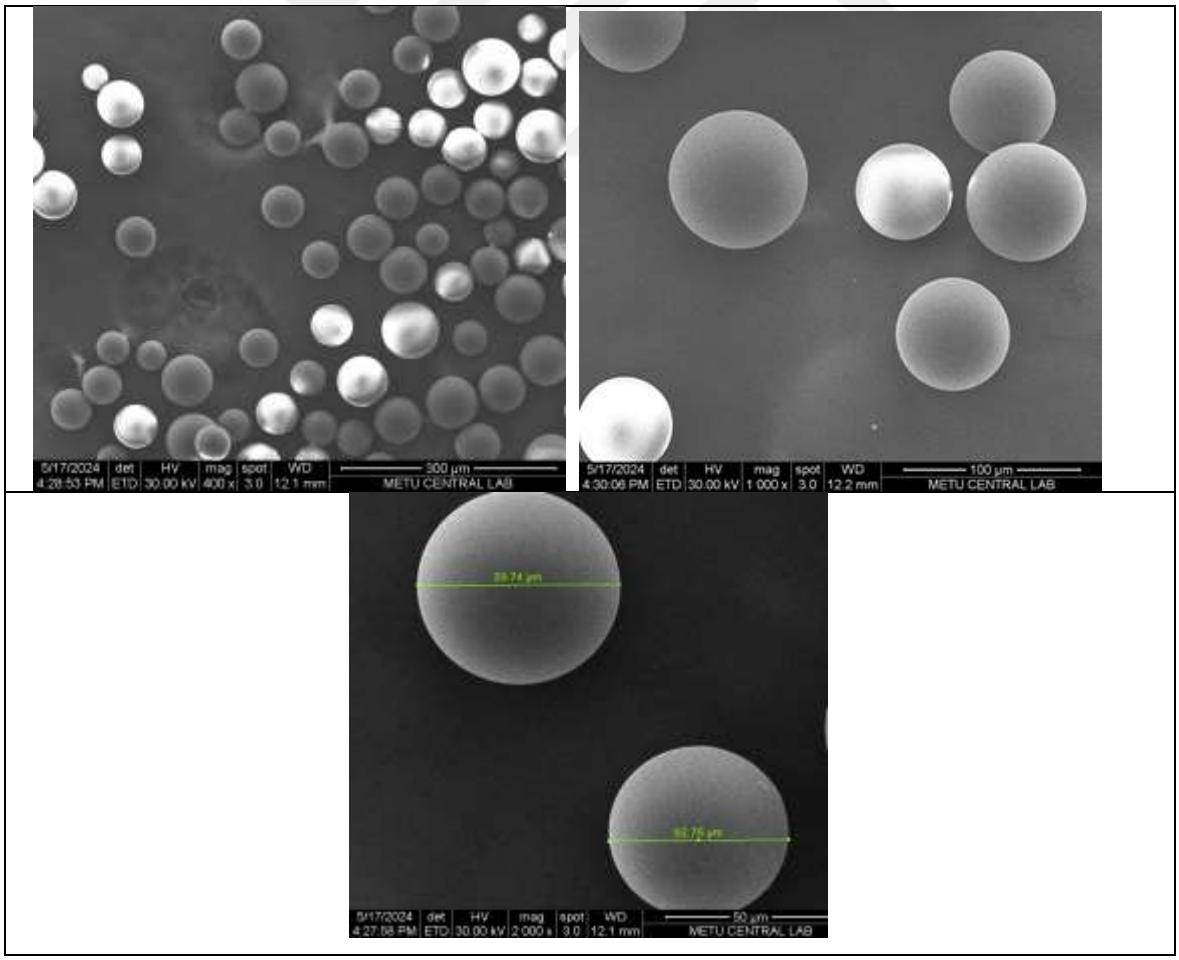
5. SONUÇLAR

5.1. Karakterizasyon

Ferrosen etiketli destek polimerlerin karakterizasyonu için SEM/EDX, element analizi, FTIR ve TGA analizlerinden faydalanıldı.

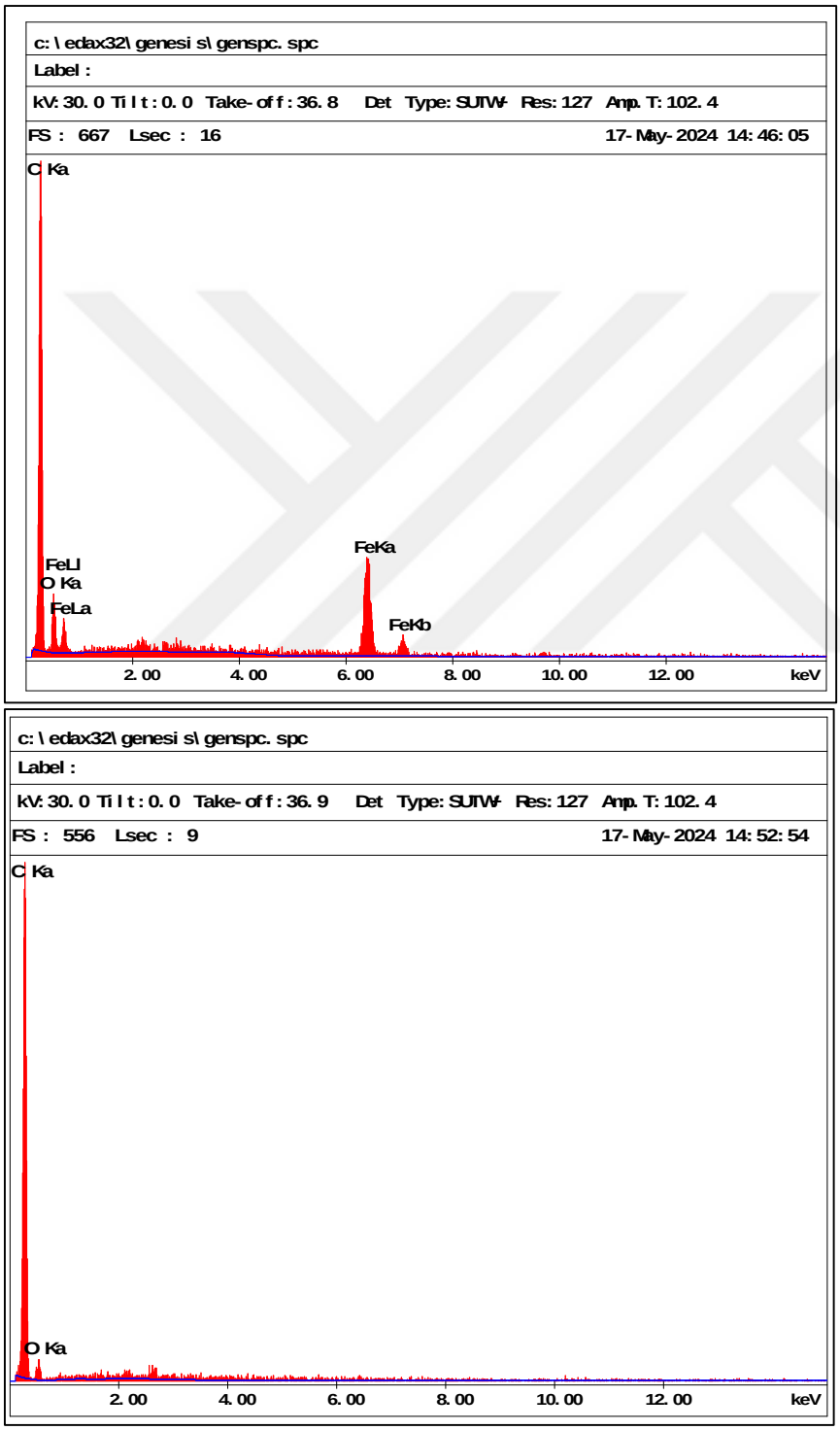
SEM-EDX analizi

Ferrosen etiketli destek (AS-Fc) polimerine ait SEM fotoğraflarına bakıldığında, küre yapısının korunduğu aşağıda verilen resimde görülmektedir. Ayrıca, ferrosen etiketli destek (AS-Fc) polimeri ile ferrosen etiketli olmayan polimere ait EDX spektrumları kıyaslandığında (Resim 5.1), spektrumlar arasında belirgin fark olduğu görüldü [35].



Resim 5.1. Ferrosen etiketli destek (AS-Fc) polimerinin SEM (400, 1000 ve 2000 büyütmeli) görüntüsü

Ferrosen etiketli destek (AS-Fc) polimerinde 6 keV - 7 keV arasında gözlenen demire ait pikin ortaya çıkışı Ferrosen karboksladehit'in katılması sonucunda olduğuna karar verildi (Şekil 5.1). EDX spektrumda görülen oksijen atomunun yapıdaki kristal H_2O'dan kaynaklanabileceğine dair yorum yapıldı.



Şekil 5.1. Ferrosen etiketli ve etiketli olmayan polimerlere ait EDX spektrumları

Element analizi

Element analiz sonuçları Çizelge 5.1'de verilmiş olup, ön görülen yapı ile uyumlu olduğu sonucuna varıldı.

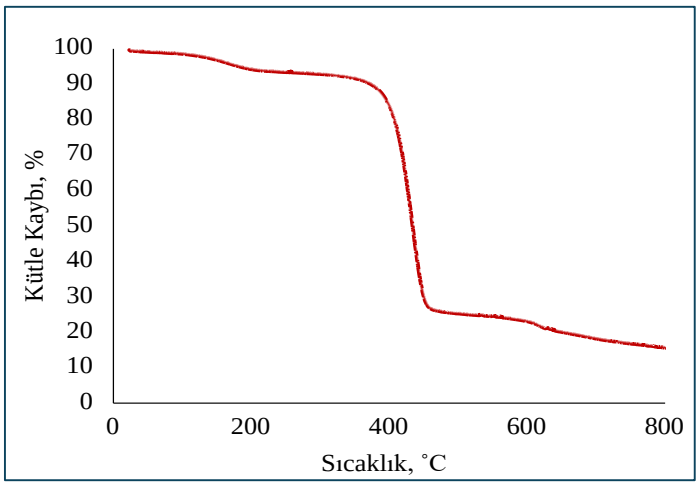
Çizelge 5.1. (AS-Fc) kodlu polimerin M_w ve element analiz yüzdeleri

Bileşik (renk)	Önerilen Birim (M_w)	M_w	Hesaplanan (Bulunan)			
			C	H	N	Fe
(AS-Fc) koyu kahve	$[(C_8H_8)_5(CH=N\text{-}Fe)(C_8H_8)_5]_n$ x $3H_2O$	1305	83,68 (86,81)	6,59 (7,08)	1,07 (1,32)	4,29 (4.03)

Element analiz sonuçlarına göre tekrarlanan birim içinde üç mol kristal H_2O'nun olabileceği yorumu yapıldı. Ayrıca ferrosen etiketli polimerde demir iyonunun belirlenmesi ferrosen karboksaldehitin polimere bağlandığını bir delili olarak yorum yapıldı [32].

TGA eğrisi

Ferrosen etiketli polimerine TGA eğrisi Şekil 5.2.'de, kütle kayıpları ile ilgili ön görülen yapılar Çizelge 5.2'de verildi.



Şekil 5.2. Ferrosen etiketli polimere ait TGA eğrisi

Çizelge 5.2. Ferrosen etiketli polimerin Termal Analiz Sonuçları

Önerilen Birim $[(C_8H_8)_5(CH=N\text{-}Fe)\ (C_8H_8)_5]_nx3H_2O$	Sıcaklık °C	Hesaplanan (Bulunan)	
		Ayrılan grup veya *kalan grup	% kütle
	40 -146	$3H_2O$	4,14 (4,73)
	194 – 550	(C,N,Fe)n	67,64 (*)
	650-800	$*10C+Fe_2O_3$	19,98 (19,33)

(*): Ön görülemedi

Şekil 5.2 ye göre ferrosen etiketli polimerin ısıl işleminde, önce 146 °C'a kadar kristal H_2O'nun ayrıldığı [35,51], daha sonra tek basamakta bozunarak geride %19,93 kütle ile demir ve karbon atomunlarını içeren bir kütlenin kalmış olabileceği önerildi. Şekil 5.2 ye göre, tek basamakta gerçekleşen bozunma sıcaklığının 194 °C'de başladığı 800 C'de ferrosen destekli polimerin %80,67 lik kısmın parçalanarak %19,33 lük kısmının kaldığı görüldü.

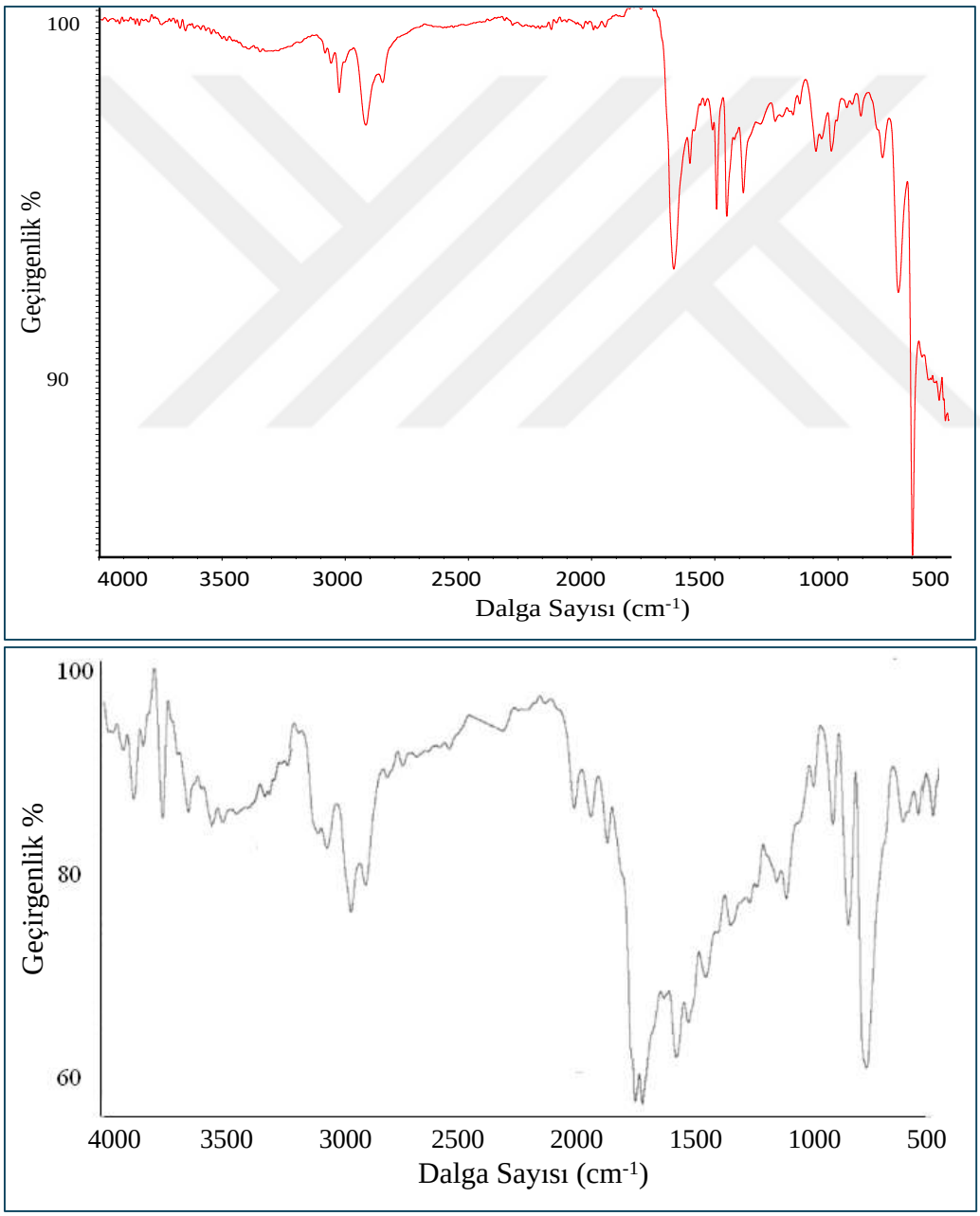
FTIR spektrumu

Ferrosen etiketli ve ferrosen etiketli olmayan polimerlere ait FT-IR spektrumu Şekil 5.3'te verilmiştir. Polimerik yapılar farklı zincir boylarına sahip olduğu için IR spektrumlarında daha geniş bant olarak görülmesi beklenen bir durumdur. Ferrosen etiketli olmayan polimerin $-NH_2$ grubuna ait IR bantların 3200 cm^{-1}-3400 cm^{-1}'de geniş bantlar olarak görülmesi polimerik yapıdan kaynaklandığı söylenebilir. Ayrıca 1800 cm^{-1} civarındaki amid I bandları da geniş bant olarak görülmektedir [49,50].

Ferrosen etiketli polimere ait alifatik $\nu_{C\text{-}H}$ titreşimi 2928 cm^{-1} ve 2864cm^{-1} de, aromatik $\nu_{C\text{-}H}$ titreşimi ise 3061 cm^{-1} ve 3018 cm^{-1} de gözlenmiştir [50]. Ferrosen etiketsiz polimerde 3200 cm^{-1} - 3400 cm^{-1}'de geniş bantlar olarak görülen bantların görülmemesi

ferrosenkarboksladehit katılmasının bir sonucu olarak değerlendirilebilir. Ayrıca amid I bantlarının görülmeyişi de bu sonucu desteklemektedir [49].

1632 cm^{-1}'de görülen yeni bandın $–NH_2$ uçlu polimer ile aldehit arasındaki katılma-ayrılma reaksiyonu sonucunda meydana geldiği ve –CH=N-(imin) grubunun oluşumundan kaynaklandığı düşünüldü [51]. Ferrosene ait olan karakteristik üçlü bantların ferrosen etiketli polimerde 1418-1430 cm^{-1} aralığında görülmesi, yine aldehitin polimere bağlandığının bir delili olarak değerlendirildi.

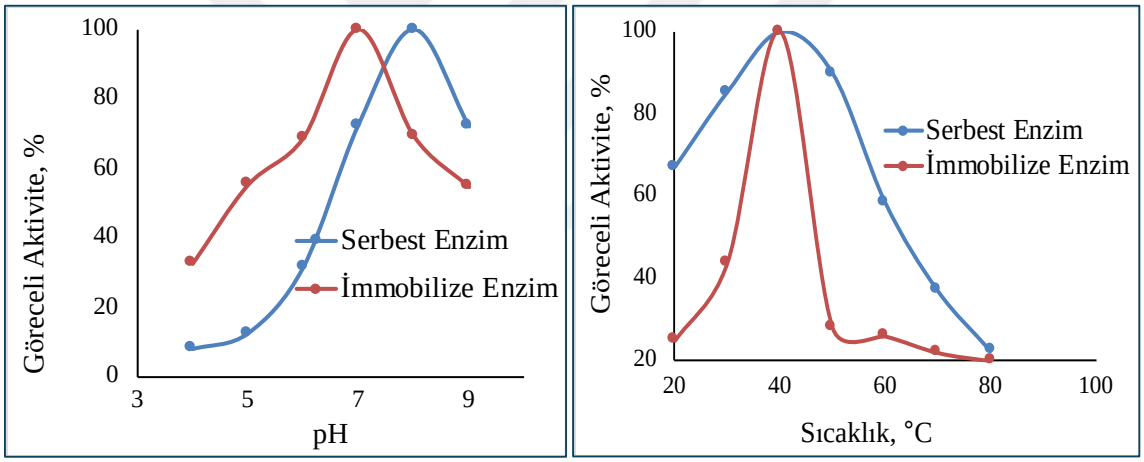


Şekil 5.3. Ferrosen etiketli ve ferrosen etiketli olmayan polimerlere ait FT-IR spektrumu

5.2. Serbest ve İmmobilize AChE Enzimi ile İlgili Sonuçlar

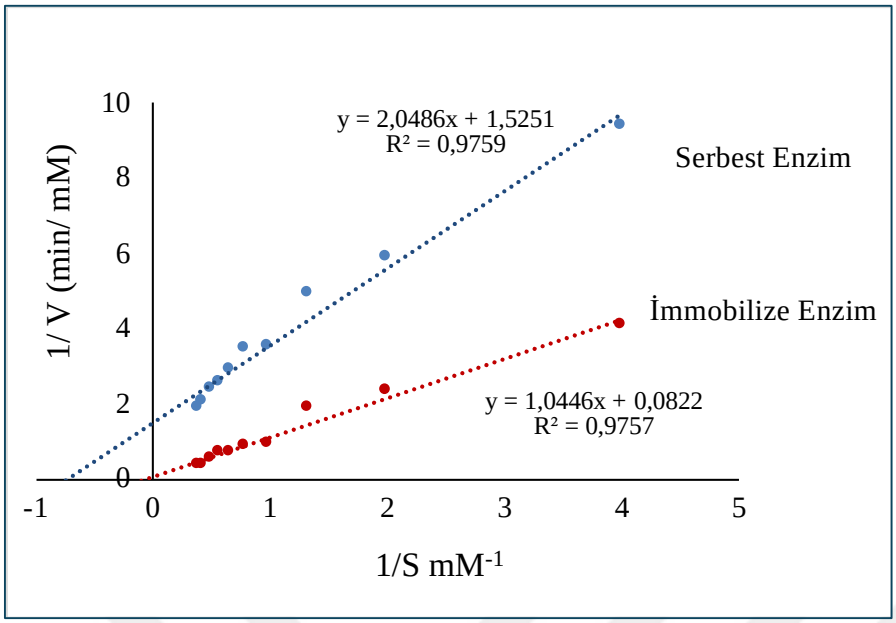
Serbest ve immobilize AChE'ın aktifliğine pH, sıcaklık ve substrat derişiminin etkisi

Serbest ve polimerik desteğe immobilize edilen AChE'ın aktifliğine pH ve sıcaklık etkisi, Bölüm 3.'de açıklanan yöntemin uygulanması sonucunda elde edilen değerler incelenmiş ve Şekil 5.4.'deki grafikler elde edilmiştir. Optimum pH araştırmalarının sonucunda serbest enzim için optimum pH=8 iken immobilize enzim için pH=7 olarak bulunmuştur. Serbest enzim ve immobilize enzim için optimum sıcaklığı 40 °C olarak aynı bulundu. Serbest enzime göre farklı optimum pH göstemesi immobilizasyon sonucunda immobilize enzimin konformasyonal yapının korunarak serbest enzime göre daha nötral koşullarda çalışabileceği düşüncesi oluşmuştur.



Şekil 5.4. Serbest ve immobilize AChE'ın aktifliğine pH ve sıcaklık etkisi

Serbest ve ferrosen etiketli desteğe immobilize edilmiş AChE'nin aktifliğine substrat (asetilkolin iyodür) derişiminin etkisi incelenirken Bölüm 3.'de belirtilen deneysel yöntem uygulanmış böylece elde edilen verilerden yapılan hesaplamalar sonrasında Şekil 5.5'te verilen *Lineweaver-Burk* grafikleri çizildi. Grafiklerdeki verilerden yararlanarak *K*m ve *V*max değerleri bulundu.



Şekil 5.5. Serbest ve immobilize AChE'nin aktifliğine substrat derişiminin etkisi

İmmobilize ve serbest enzime ait doğrunun eğilim çizgisinden sırasıyla y=1,0446x + 0,0822 ve y= 2,0486x + 1,5251 olarak bulunduğu görülmektedir. Bu değerler dikkate alınarak 1/V = Km/Vmax x1/[S] + 1/Vmax ifadeleriyle birlikte hesaplandığında, Çizelge 5.3'te verilen değerler elde edildi.

Çizelge 5.3. Serbest AChE ve (AS-Fc)-AChE'ın optimum şartları ve Km ve Vmak değerleri

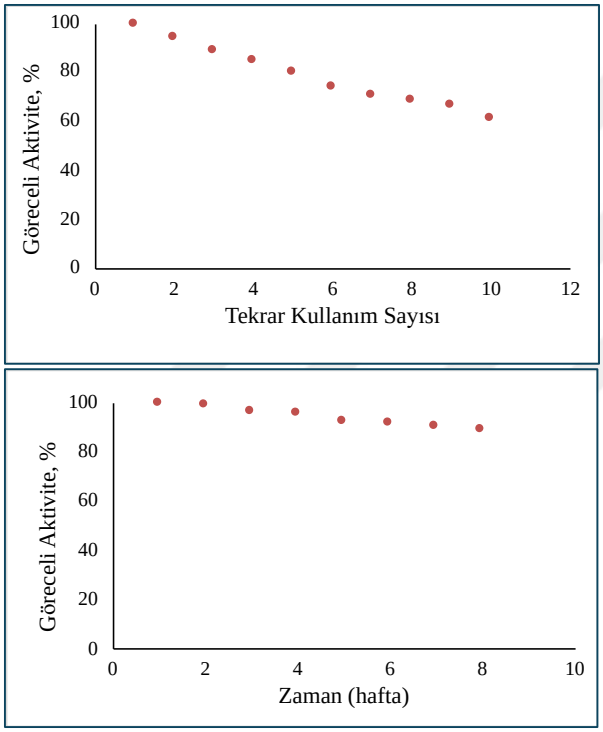
Optimum Koşullar	Enzim halleri	K_m (mM)	V_{mak} (mM/dk)	10. kullanımda Aktiflik %	Depolama (8.hafta, Aktiflik %)
				Oda sıcaklığında (25 °C)	
pH 7, 40˚C	serbest	1,35	0,66	-	-
	İmmobilize	12,70	12,16	61,8	88,8

K_m enzimin substrata olan ilgisidir. V_{mak} ise enzimin substrata doyduğu andaki katalitik hızıdır. *Km* ifadesinin deneysel olarak tanımı olan 'enzim reaksiyon hızının V_{mak} 'ın yarısı olduğu substrat konsantrasyonu' olduğu bilgisi dikkate alındığında, immobilize enzimin substrata olan ilgisinin azaldığı Çizelge 5.3'te verilen değerlerden anlaşılmaktadır. Bu arada, immobilize enzimin V_{mak} yani hızı artmıştır.

İmmobilize AChE enziminin tekrar kullanılabilirliği ve depolama kararlılığı

Ferrosen etiketli desteğe uygulanan immobilize enziminin tekrar kullanılabilirliği ve depolama kararlılığı oda sıcaklığında yapılmıştır.

Ferrosen etiketli desteğe yapılan immobilize enziminin tekrar kullanılabilirliği ile ilgili kullanım sayısı 10 (on) olduktan sonra devam edilmemiştir. Onuncu kullanımdan sonra ferrosen etiketli desteğe immobilize edilen enziminin aktifliğinin %61,8 korunduğu görülmüştür.

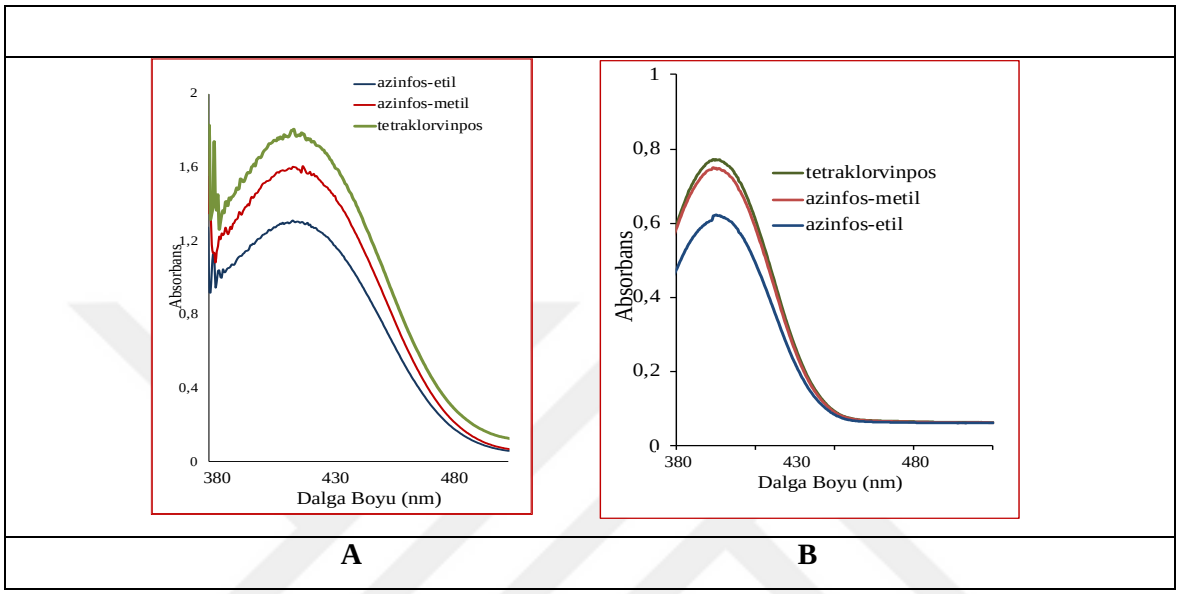


Şekil 5.6. İmmobilize AChE enziminin tekrar kullanılabilirliği ve depolama kararlılığı grafikleri

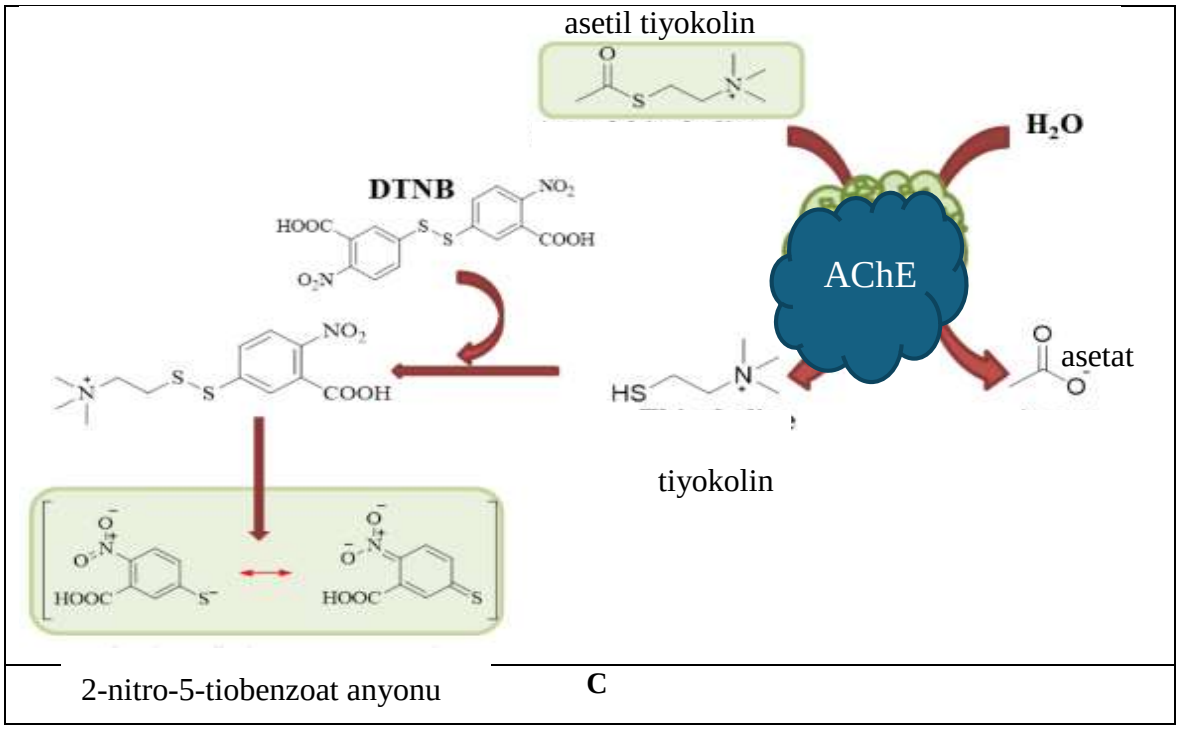
Ferrosen etiketli desteğe yapılan immobilize AChE'ın saklanması/depolanması sonucunda aktifliğinin ne kadar süreyle devam ettirdiğini takip etmek için depolama kararlılığı deneyi yapıldı. Her hafta ölçülen enzim aktivitesi % de göreceli aktivite olarak hesaplanarak Şekil 5.6 de verilen grafik elde edildi. Sekizinci hafta sonunda immobilize enzimin göreceli olarak aktivitesini %88,8 koruduğu belirlendi.

5.3. İmmobilize AChE Enzimi ile Pestisit Değerlendirmesi

Aynı şartlar altında çalışılan üç farklı pestisitin AChE üzerine olan etkisinin incelenmesi sonucunda elde edilen değerlerin grafiğe geçirilmesiyle Şekil 5.7. elde edilmiştir.

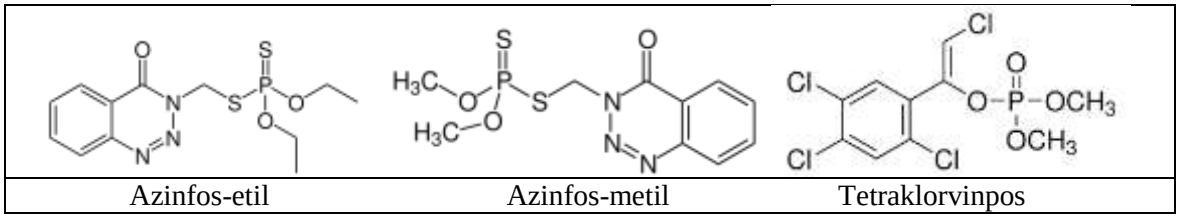


Şekil 5.7. İmmobilize AChE enzimi ile pestisit etkileşimlerinin absorbandaki değişimlerine ait Uv-GB spektrumları (A: ilk ölçümler, B: 2.ölçümler)



Şekil 5.8. Enzimin çalışma şartlarının izlenmesi sırasında uygulanan mekanizma (C)

Azinfos-etil, azinfos-metil ve tetraklorvinpos pestisitler içinde (Şekil 5.9) immobilize AChE enzimini en çok inhibe eden pestisitin Azinfos-etil olduğu görülmektedir.

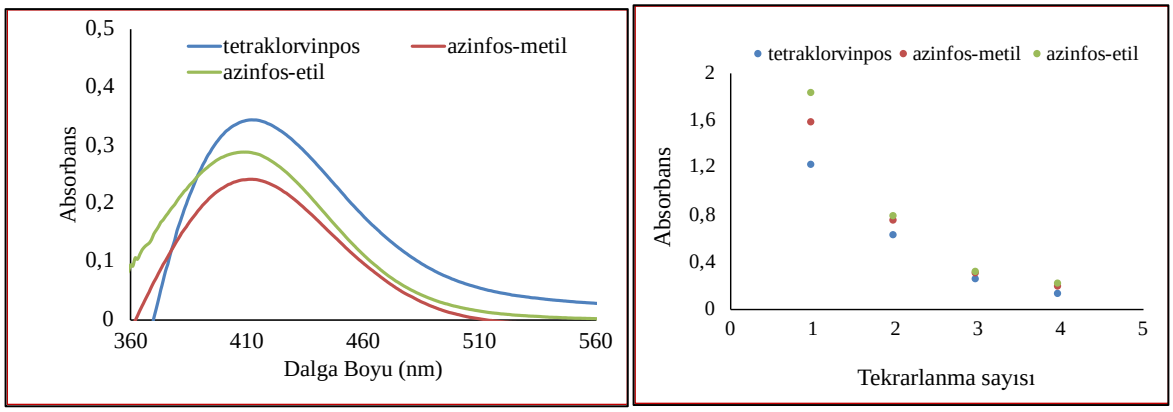


Şekil 5.9. Çalışılan pestisitlerin molekül yapıları

412 nm dalga boyundaki absorbansın Azinfos-etilin daha etkili olmasının nedeni Şekil 5.8.'de verilen enzim-substrat mekanizmanı daha etkili bir şekilde durdurmasından dolayı olduğu söylenebilir.

5.4. İmmobilize AChE Enzimi ile Pestisit Tayinindeki Tekrar Kullanımdaki Değerlendirmeler

İmmobilize enzimin çalışılan tüm pestisitlerin 4 tekrar kullanılabilirliğinde Azinfos-etil için 0,012, Azinfos-metil ve Tetraklorvinpos için sırasıyla 0,18 ve 0,21 olarak absorbans gösterdiği belirlendi.



Şekil 5.10. İmmobilize enzimin çalışılan tüm pestisitler için 4. tekrar kullanılabilirliğindeki absorbans değerleri ve dördüncü tekrarlama ile ilgili verilerin karşılaştırılması

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sentez sonucunda elde edilen Ferrosen etiketli polimerin küre formunda olduğu SEM fotoğraflarına göre karar verilmiştir. Ayrıca organometalik molekül olan ferrosenin kürelere Schiff bazı oluşumuyla bağlandığı FTIR spektrumuna göre karar verildi. Ferrosen etiketli polimerin FTIR spektrumunda, giriş polimerinden FTIR spektrumundan farklı olarak yeni imin pikinin ve ferrosene ait spesifik piklerin gözlenmesi ferrosenin polimerik kürelere bağlandığının bir delili olarak değerlendirildi. Karakterizasyonda elementel analize göre önerilen birim yapının TGA analizi ile birlikte değerlendirildiğinde birim yapının uyumlu olduğu sonuca varıldı.

Optimum pH ve sıcaklık koşullarının araştırılması sonucunda, immobilize enzimin serbest enzim den farklı optimum pH koşulunda daha iyi aktivite gösterebileceği, ancak optimum sıcaklığın serbest enzimle aynı sıcaklık koşulunda (40 °C) iyi aktivite gösterebileceği görüldü. İmmobilize ve serbest enzime ait Km / Vmak değerleri sırasıyla 12,70/12,16 ve 1,35/0,66 olup, immobilize enzimin substrata olan ilgisinin azaldığı ancak, *V*mak yani hızı artdığı görüldü. İmmobilize enziminin tekrar kullanılabilirliğinde kullanım sayısı 10 (on) aktifliğinin %61,8 korunduğu ve immobilize enzimin sekiz hafta sonra göreceli olarak aktivitesini %88,8 koruduğu belirlendi.

Azinfos-etil, azinfos-metil ve tetraklorvinpos pestisitlerin immobilize AChE enzimini en çok inhibe eden pestisitin Azinfos-etil olduğu, enzim-substrat mekanizmanı daha etkili bir şekilde durdurabildiği görüldü.

Çizelge 6.1. İmmobilize edilen ferrosen etiketli polimerin çalışılan pestisitlere karşı göreceli aktivite değişimleri

Pestisit Adı	Göreceli aktiflik (%)			
	1. ölçüm	2. ölçüm	3. ölçüm	4. ölçüm
Azinfos-etil	67	34	13	6
Azinfos-metil	86	41	16	9
Tetraklorvinpos	100	43	19	12

İmmobilize enzimin pestisit ile muamelesi sonucunda, pestisit oratmadan uzaklaşmış olsa bile enzim-substrat etkileşimini çok zayıflattığı ve immobilize enzimin 4.kez pestisitle etkileştirilmesi sonucunda çalışılan pestisitlerin immobilize enzimin çalışabilirliğini Azinfos-etil >Azinfos-metil > Tetraklorvinpos sırasında neredeyse yok ettiği görüldü (Çizelge 6.1).

Tüm sonuçlar, Ferrosen etiketli polimerin pestisit analizlerinde kullanılabileceğini göstermektedir. Pestisit analizine yönelik bir sensör yapılabileceği, hatta tez kapsamında modifiye edilmiş polimerle iki kere yapılacak pestisit analizinin sağlıklı sonuç vermesinin mümkün olabileceğini öneriyoruz. Ferrosen etiketli polimer ile sadece pestisit analizleri değil, biyobelirteç ve terapötik hedefler için kullanılabilir olduğunu öneriyoruz.

KAYNAKLAR

1. Korres, N. E. (2018). *Weed Control: Sustainability, Hazards, and Risks in Cropping Systems Worldwide*. (1. Baskı). Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor Francis Group, 14.

2. Nigam, S. K., Karnik, A.B., Chattopadhyay, P., Lakkad, B.C. (1993). Clinical and biochemical investigations to evolve early diagnosis in workers involved in the manufacture of hexachlorocyclohexane. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 65, 193–196.

3. Coresh, J., Byrd-Holt, D., Astor, B. C., Briggs, J. P., Eggers, P. W., Lacher, D. A., Hostetter, T. H. (2005). Chronic kidney disease awareness, prevalence, and trends among U.S. adults, 1999 to 2000. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16, 180–188.

4. Cserháti T., Szőgyi M. (2012). Chromatographic determination of fungicides in biological and environmental matrices. New achievements. *Biomedical Chromatography*, 26, 276–282.

5. Bruzzoniti, M. C., Checchini, L., De Carlo, R. M., Orlandini, S., Rivoira, L., Del Bubba, M. (2014). QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: A critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 4089–4116.

6. Rojano-Delgado, A. M., Luque de Castro, M. D. (2014). Capillary electrophoresis and herbicide analysis: Present and future perspectives. *Electrophoresis*, 35, 2509–2519.

7. Elbashir, A. A., Aboul-Enein, H. Y. (2015). Separation and analysis of triazine herbicide residues by capillary electrophoresis. *Biomedical Chromatography*, 29, 835–842.

8. Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., Rudzinski, W. E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 70, 1–20.

9. Cano, A., Ettcheto, M., Chang, J. H., Barroso, E., Espina, M., Kuhne, B. A., Barenys, M.,Auladell, C., Folch, J., Souto, E. B. (2019). Dual-drug loaded nanoparticles of EGCG/Ascorbic acid enhance therapeutic efficacy of EGCG in an Alzheimer's disease model. *Journal of Controlled Release*, 301, 62–75.

10. Cano, A., Sánchez-López, E., Ettcheto, M., López-Machado, A., Espina, M., Souto, E. B., Souto, E.B., Galindo, R., Camins, A., García, M.L., Turowski, P. (2020). Current advances in the development of novel polymeric nanoparticles for the treatment of neurodegenerative diseases. *Nanomedicine*, 15(1).

11. Schaffazick, S. R., Pohlmann, A. R., Dalla-Costa, T., Guterres, S. L. S. (2003). Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: Nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 56, 501–505.

12. Owens III, D. E., Peppas, N. A. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 307, 93–102.

13. Guterres, S. S., Alves, M. P., Pohlmann, A. R. (2007). Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. *Drug Target Insights*, 2, 147-157.

14. Christoforidis, J. B., Chang, S., Jiang, A., Wang, J., Cebulla, C. M. (2012). Intravitreal devices for the treatment of vitreous inflammation. *Mediators of Inflammation.* 2, 126463.

15. Szczech, M., Szczepanowicz, K. (2020). Polymeric core-shell nanoparticles prepared by spontaneous emulsification solvent evaporation and functionalized by the layer-by-layer method. *Nanomaterials,*10, 496.

16. Zielińska, A., Carreiro, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Venkatesh, D. N., Durazzo, Alessandra.,Lucarini, M., Eder, P., Silva, A. M., Santini, A., Souto, E. B. (2020). Polymeric nanoparticles: Production, characterization, toxicology and ecotoxicology. *Molecules*, 25, 3731.

17. Truong, N. P., Whittaker, M. R., Mak, C. W., Davis, T. P. (2015). The importance of nanoparticle shape in cancer drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 12(1), 129–142.

18. Banik, B. L., Fattahi, P., Brown, J. L. (2016). Polymeric nanoparticles: the future of nanomedicine. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology,* 8(2), 271–299.

19. Erduran V., Tümtürk H., Aynaci E., Sarı N. (2013). Immobilization of -galactosidase on Polystyrene Microspheres Attached L-Alanine. *Journal of Macromolecular Scıence Part A-Pure And Applıed Chemıstry,* 50(8), 871-878.

20. Li, J., Wang, G., Gou, X., Xiang, J., Huang, Q.-T., Liu, G. (2022). Revealing trace nanoplastics in food packages—An electrochemical approach facilitated by synergistic attraction of electrostatics and hydrophobicity. *Analytical Chemistry*, 94(31), 12657–12663.

21. Kik, K., Bukowska, B., Sicinska, P. (2020). Polystyrene nanoparticles: Sources, occurrence in the environment, distribution in tissues, accumulation and toxicity to various organisms. *Environmental Pollutio*, 262, 114297.

22. Loss, C., Syrovets, T., Musyanovych, A., Mailänder, V., Landfester, K., Nienhaus, U. G., Simmet, T. (2014). Functionalized polystyrene nanoparticles as a platform for studying bio-nano interactions. *Beilstein Journal of Nanotechnology,* 5, 2403–2412.

23. Gurman, J. L., Baier, L., Levin, B. C. (1987). Polystyrenes: A review of the literature on the products of thermal decomposition and toxicity. *International Journal of Toxicology*, 11, 109–130.

24. Midwoud, P. M., Janse, A., Merema, M. T., Groothuis, G. M., Verpoorte, E. (2012). Comparison of biocompatibility and adsorption properties of different plastics for advanced microfluidic cell and tissue culture models. *Analytical Chemistry,* 84(9), 3938–3944

25. Salla, J., Pandey, K. K., Srinivas, K. (2012). Improvement of UV resistance of wood surfaces by using ZnO nanoparticles. *Polymer Degradation and Stability,* 97(4), 592–596.

26. Florence, A. T. (2004). Issues in oral nanoparticle drug carrier uptake and targeting. *Journal of Drug Targeting,* 12(1), 65–70.

27. Xia, T., Kovochich, M., Liong, M., Zink, J. I., Nel, A. E. (2008). Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways. *ACS Nano,* 2, 85–96.

28. Kumar, G. S. V., Mathew, B. (2004). Influence of the nature of crosslinking agents on the catalase-like activity of polystyrene-supported schiff base metal complexes. *Journal of Macromolecular Science, Part A,* 41(9), 1037–1050.

29. Aynaci, E., Sarı, N., Tümtürk, H. (2011). Immobilization of β-galactosidase on novel polymers having Schiff bases. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology,* 39, 259–266.

30. Kayhan, S., Sarı, N., Nartop, D. (2015). Nanoplatforms attached Schiff bases by condensation method; Investigation of glucose oxidase enzyme as biocatalysts. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology,* 43(4), 224–229.

31. Özdem, N., Hasanoglu 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.

32. Antepli, E., Sarı, N. (2016). Spectroscopic analysis and the excellent reusability of sphere-capped ferrocene in the oxidation of glucose oxidase. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology,* 44(5), 1311–1317.

33. Dönmez, S., Arslan, F., Sarı, N., Hasanoğlu Özkan, E., Arslan, H. (2017). Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase on a carbon paste electrode modified with microsphere-attached L-glycine. *Biotechnology and Applied Biochemistry,* 64, 745–753.

34. Yetim, N. K., Hasanoglu Özkan, E., Danıs, B., Tümtürk, H., Sarı, N. (2017). Research on the repeated use of novel ferrocene-tagged nanomaterial for determination of glucose. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials,* 64, 888–893.

35. Karmaz, E., Hasanoglu Özkan, E., Yetim, N. K., Barutçuoğlu Sarı, N. (2021). New nanospheres to use in the determination of Imidan, Phosmet and Vantex pesticides. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*. 31(7). 2915–2924.

36. Karmaz, E. (2018). *Asetilkolinesteraz (AChE) enziminin yeni sentezlenen nanopartiküllere immobilizasyonu ve bazı pestisitlerin belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

37. Hasanoğlu Özkan, E., Kurnaz Yetim, N., Nartop, D., Sarı, N. (2021). Ensuring traceability of organophosphate pesticides (OPs) through enzyme immobilized spheres. *Journal of the Iranian Chemical Society,* 18(7), 1749–1759.

38. Yetim, N. K., Hasanoğlu Özkan, E., Özcan, C., Sarı, N. (2020). Preparation of AChE immobilized microspheres containing thiophene and furan for the determination of pesticides by the HPLC-DAD method. *Journal of Molecular Structure*, 1222, 128758.

39. Nartop, D., Hasanoğlu Özkan, E., Yetim, N. K., Sarı, N. (2020). Qualitative enzymatic detection of organophosphate and carbamate insecticides. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 55, 951–958.

40. Arslan, F. (2004). *Ksantin tayini için polipirol filme ksantin oksidaz enziminin immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

41. Kayhan, S. (2013). *Kondenzasyon metoduyla nanoplatformlara schiff bazı takılması ve glukoz oksidaz enziminin biokatalizör olarak incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

42. Kurnaz Yetim, N. (2016). *Ferrosen içeren yeni Pt(II), Pt(IV) dendrimerlerinin sentezi ve immobilizasyonda kullanımı*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 42-46, 62-63.

43. Hasanoğlu Özkan, E. (2016). *Ferrosen içeren yeni Pd(II), Pt(II) dendronlarının sentezi ve immobilizasyonda kullanımı*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 28-30.

44. Upadhyay, S., Rao, G. R., Sharma, M. K., Bhattacharya, B. K., Rao, V. K., Vijayaraghavan, R. (2009). Immobilization of acetylcholinesterase-choline oxidase on a gold platinum bimetallic nanoparticles modified glassy carbon electrode for the sensitive detection of organophosphate pesticides, carbamates, and nerve agents. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(4), 832–838.

45. Kumar, V., Sharma, N., Sharma, P., Pasrija, R., Kaur, K., Umesh, M., Thazeem, B. (2023). Toxicity analysis of endocrine disrupting pesticides on non-target organisms: A critical analysis on toxicity mechanisms. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 474(1), 116623.

46. Stoker, T. E., Kavlock, R. J. (2010). Pesticides as endocrine-disrupting chemicals. In R. Krieger (Ed.). *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. (3rd edition). 551–569.

47. Chaudhary, V., Kumar, M., Chauhan, C., Sirohi, U., Srivastav, A. L., Rani, L. (2024). Strategies for mitigation of pesticides from the environment through alternative approaches: A review of recent developments and future prospects. *Journal of Environmental Management*, 354, 120326.

48. Saleh, I. A., Zouari, N., Al-Ghouti, M. A. (2020). Removal of pesticides from water and wastewater: Chemical, physical and biological treatment approaches. *Environmental Technology & Innovation*, 19, 101026.

49. Ji, Y., Yang, X., Ji, Z., Zhu, L., Ma, N., Chen, D., Jia, X., Cao, Y.T.J. (2020). DFT-calculated IR spectrum amide I, II, and III band contributions of N-methylacetamide fine components. *ACS Omega*, 5(15), 8572–8578.

50. Silverstein, R. M., Bassler, G. C., Morrill, T. C. (1981). *Spectrometric Identification of Organic Compounds* (4th edition). New York: John Wiley & Sons.

51. Sarı, N. (1999). *Bazı heterosiklik aldehitler ile amino asitlerden yeni Schiff bazlarının ve Cu(II), Ni(II) komplekslerinin sentezlenmesi ve yapılarının aydınlatılması*. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.



Gazili olmak ayrıcalıktır