



**FERROSEN İÇEREN YENİ Pt(II), Pt(IV) DENDRİMERLERİNİN SENTEZİ
VE İMMOBİLİZASYONDA KULLANIMI**

Nurda KURNAZ YETİM

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KASIM 2016

Nurdan KURNAZ YETİM tarafından hazırlanan “FERROSEN İÇEREN YENİ Pt(II), Pt(IV) DENDRİMERLERİNİN SENTEZİ VE İMMOBİLİZASYONDA KULLANIMI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Kimya 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.

Nurdan KURNAZ YETİM

22/11/2016

FERROSEN İÇEREN YENİ Pt(II), Pt(IV) DENDRİMERLERİNİN SENTEZİ VE İMMOBİLİZASYONDA KULLANIMI

(Doktora Tezi)

Nurdan KURNAZ YETİM

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kasım 2016

ÖZET

Bu çalışmada, önce ferrosen çekirdekli birinci (1G) ve ikinci jenerasyon (2G) dendrimerler sentezlenmiş, daha sonra aminofenol türevleri, Pt(II) veya Pt(IV) katyonları ile “kalıp” yöntemi kullanılarak genişletilmiş ikinci jenerasyon dendrimerler [2G-X-Pt(II) ve 2G-X-Pt(IV)], X: -H, -NO₂, -CH₃] elde edilmiştir. Sentezlenen dendrimerlerin yapıları, FTIR, UV-Vis, ¹H-NMR, AAS, LC-MS, MALDI-TOF MS, termal analiz, molar iletkenlik ve magnetik susceptibilite ölçümleriyle aydınlatılmıştır. 2G, 2G-X-Pt(II) ve 2G-X-Pt(IV) dendrimerlerine glukoz oksidaz (GOx) ve asetilkolinesteraz (AChE) enzimleri immobilize edilmiş ve optimizasyon parametreleri (pH, sıcaklık, tekrar kullanım, depolama kararlılığı, substrat derişimi) belirlenmiştir. *Michaelis-Menten* eşitliği ile K_m (mM) ve V_{mak} (mM.dk.⁻¹) değerleri hesaplanmıştır. Immobilize glukoz oksidaz enziminin yapay idrar ortamında tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. Immobilize asetilkolinesteraz enziminin pestisit (fosmet, karbaril, diklofop-metil) tayininde kullanılabilirlikleri araştırılmıştır.

Bilim Kodu : 20103

Anahtar Kelimeler : Dendrimer, Ferrosen, Enzim immobilizasyonu, GOx enzimi, AChE enzimi

Sayfa Adedi : 161

Danışman : Prof. Dr. Nurşen SARI

SYNTHESIS OF NEW Pt (II), Pt (IV) DENDRIMERS CONTAINING FERROCENE
AND IMMOBILIZATION USAGE

(Ph. D. Thesis)

Nurdan KURNAZ YETİM

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

November 2016

ABSTRACT

In this study, firstly, the first (1G) and second generation (2G) dendrimers involving ferrocene were synthesized, and then the expanded second generation dendrimers, [2G-X-Pt(II) and 2G-X-Pt(IV), X: -H, -NO₂, -CH₃], were obtained using “template method” with aminophenol derivatives, Pt (II) or Pt (IV) cations. Their structures were characterized by molar conductivity, magnetic susceptibility thermal analyses (TGA), FTIR, UV-Vis, ¹H-NMR, AAS, LC-MS, MALDI-TOF-MS methods. Glucose oxidase (GOx) and acetylcholinesterase (AChE) enzymes were immobilized on the 2G, 2G-X-Pt(II) and 2G-X-Pt(IV) dendrimers, and their optimization parameters (substrate concentration, temperature, pH, 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, diclofop-methyl) has been investigated.

Science Code : 20103

Key Words : Dendrimer, Ferrocene, Enzyme immobilization, GOx enzyme, AChE enzyme

Page Number : 161

Supervisor : Prof. Dr. Nurşen SARI

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının hazırlanması ve yürütülmesi esnasında, değerli bilgileri ve önerilerinden sürekli yararlandığım değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Nurşen SARI'ya teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, fikirleriyle bana yol gösteren değerli hocam Sayın Nurcan KARACAN'a teşekkürlerimi sunarım. Yardımlarını ve tecrübelerini esirgemeyen sayın hocalarım Prof. Dr. Bekir SARI, Doç. Dr. Fatma ARSLAN, Doç. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK ve Prof. Dr. Ali DİŞLİ'ye teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım boyunca bana destek olan arkadaşım Elvan HASANOĞLU ÖZKAN'a teşekkür ederim. Tez süresi boyunca bana her zaman destek olan, mutluluğumu, hüznümü paylaşan ve bundan sonraki hayatımda da hep yanımda olmasını istediğim eşim Kadir YETİM'e teşekkürlerimi sunarım. Aldığım her kararda yanımda olan, çalışmalarımı başından sonuna kadar destekleyen, maddi ve manevi katkılarını benden hiçbir zaman esirgemeyen değerli aileme en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Müdürlüğü'ne doktora tezime sağladıkları katkılardan dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xx
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Dendrimerler	3
2.1.1. Dendrimerlerin yapısı.....	6
2.1.2. Dendrimerlerin özellikleri.....	8
2.1.4. Dendrimerlerin sentez yöntemleri	10
2.1.5. Dendrimer çeşitleri.....	11
2.1.6. Dendrimerlerin uygulamaları	16
2.2. Ferrosenler.....	21
2.3. Enzim İmmobilizasyonu	26
2.3.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri	28
2.3.2. İmmobilizasyon işleminde kullanılan destek materyaller.....	31
2.4. Glukoz Oksidaz Enzimi (GOx).....	33
2.5. Asetilkolinesteraz Enzimi (AChE).....	35
2.5.1. AChE enziminin pestisit tayininde kullanımı	37

2.6. Glukoz Oksidaz (GOx) ve Asetilkolinesteraz (AChE) Enzimleri Üzerine Yapılmış Çalışmalar.....	39
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	47
3.1. Kullanılan Cihazlar	47
3.2. Kullanılan Maddeler.....	48
3.3. Hazırlanan Çözeltiler	49
4. DENEYSEL YÖNTEM.....	51
4.1. Birinci Jenerasyon 1G Dendrimerinin Sentezi.....	51
4.2. İkinci Jenerasyon 2G Dendrimerinin Sentezi	51
4.3. Genişletilmiş 2. Jenerasyon 2G-H-Pt(II) Dendrimerinin Sentezi	52
4.4. Genişletilmiş 2. Jenerasyon 2G-H-Pt(IV) Dendrimerinin Sentezi.....	53
4.5. Genişletilmiş 2. Jenerasyon 2G-NO ₂ -Pt(II) Dendrimerinin Sentezi	54
4.6. Genişletilmiş 2. Jenerasyon 2G-NO ₂ -Pt(IV) Dendrimerinin Sentezi	55
4.7. Genişletilmiş 2. Jenerasyon 2G-CH ₃ -Pt(II) Dendrimerinin Sentezi	56
4.8. Genişletilmiş 2. Jenerasyon 2G-CH ₃ -Pt(IV) Dendrimerinin Sentezi.....	57
4.9. Dendrimerlerin Element Analizi ve Fiziksel Özellikleri	58
4.10. Dendrimerlerin İletkenlik ve Manyetik Duyarlılık Ölçümleri	58
4.11. β -Glukoz oksidaz (GOx) Enziminin İmmobilizasyonu ve Optimizasyonu	60
4.11.1. İmmobilize GOx enziminin aktifliğine pH etkisi	61
4.11.2. İmmobilize GOx enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi	61
4.11.3. İmmobilize GOx enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi	61
4.11.4. İmmobilize GOx enziminin tekrar kullanılabilirliği.....	64
4.11.5. İmmobilize GOx enziminin depolama kararlılığı.....	64
4.12. Asetilkolinesteraz (AChE) Enziminin İmmobilizasyonu ve Optimizasyonu ...	64

Sayfa

4.12.1. İmmobilize AChE enziminin aktifliğine pH etkisi	65
4.12.2. İmmobilize AChE enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi	66
4.12.3. İmmobilize AChE enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi	66
4.12.4. İmmobilize AChE enziminin tekrar kullanılabilirliği.....	67
4.12.5. İmmobilize AChE enziminin depolama kararlılığı.....	67
4.12.6. Pestisitlerin immobilize AChE enzimi ile kalitatif tayini.....	67
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	69
5.1. Dendrimerlerin Yapı Analizi.....	69
5.1.1. Birinci jenerasyon 1G dendrimerinin yapı analizi	69
5.1.2. İkinci jenerasyon 2G dendrimerinin yapı analizi	72
5.1.3. Genişletilmiş ikinci jenerasyon dendrimerlerin yapı analizi.....	76
5.2. İmmobilize β -Glukoz Oksidaz (GOx) Enziminin Optimizasyon Çalışmaları	87
5.2.1. İmmobilize β -Glukoz oksidaz enziminin aktifliğine pH etkisi	87
5.2.2. İmmobilize β -Glukoz oksidaz enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi	89
5.2.3. İmmobilize β -Glukoz oksidaz enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi	91
5.2.4. İmmobilize β -Glukoz oksidaz enziminin tekrar kullanılabilirliği ve depo kararlılığı.....	93
5.2.5. İmmobilize β -Glukoz oksidaz enziminin yapay idrar çözeltisindeki tekrar kullanılabilirliğinin tayini	96
5.3. İmmobilize Asetilkolinesteraz (AChE) Enziminin Optimizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi	98
5.3.1. İmmobilize asetilkolinesteraz enziminin aktifliğine pH etkisi.....	98
5.3.2. İmmobilize asetilkolinesteraz enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi.....	100
5.3.3. İmmobilize asetilkolinesteraz enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi	101

Sayfa

5.3.4. İmmobilize asetilkolinesteraz enziminin tekrar kullanılabilirliği ve depolama kararlılığı	103
5.4. Pestisitlerin İmmobilize Asetilkolinesteraz Enzimine Etkisi	106
5.4.1. İmmobilize dendrimerlerin fosmet ile olan inhibisyon sonuçlarının değerlendirilmesi	106
5.4.2. İmmobilize dendrimerlerin karbaril ile olan inhibisyon sonuçlarının değerlendirilmesi	111
5.4.3. İmmobilize dendrimerlerin diklofop-metil ile olan inhibisyon sonuçlarının değerlendirilmesi	115
6. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ	119
6.1. Karakterizasyona Ait Değerlendirmeler	119
6.2. İmmobilizasyon Çalışmalarına Ait Değerlendirmeler	121
6.3. Öneriler	124
KAYNAKLAR	125
EKLER.....	139
EK-1. 2G-H-Pt(II) dendrimerinin TGA eğrisi.	140
EK-2. 2G-H-Pt(IV) dendrimerinin TGA eğrisi.....	141
EK-3. 2G-NO ₂ -Pt(II) dendrimerinin TGA eğrisi.	142
EK-4. 2G-NO ₂ -Pt(IV) dendrimerinin TGA eğrisi.	143
EK-5. 2G-CH ₃ -Pt(II) dendrimerinin TGA eğrisi	144
EK-6. 2G- CH ₃ -Pt(IV) dendrimerinin TGA eğrisi.....	145
EK-7. 2012 yılında yayımlanan makalemizin ilk sayfası.	146
EK-8. 2012 yılında yayımlanan makalemizin ilk sayfası.	147
EK-9. 2013 Yılında Yayımlanan Makalemizin İlk Sayfası.	148
EK-10. 2014 yılında yayımlanan makalemizin ilk sayfası.	149
EK-11. 2015 yılında yayımlanan makalemizin ilk sayfası	150

Sayfa

EK-12. 2015 yılında yayımlanan makalemizin ilk sayfası	151
EK-13. V. Biyoteknoloji kongresi kitapçık kapak sayfası görüntüsü.....	152
EK-14. V. Biyoteknoloji kongresi sözel sunum özeti.....	153
EK-15. VI. Ulusal polimer bilim ve teknolojisi kongresi kitapçık kapak sayfası görüntüsü	154
EK-16. VI. Ulusal polimer bilim ve teknolojisi kongresi sözel sunum özeti.	155
ÖZGEÇMİŞ	156



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler	48
Çizelge 3.2. Kullanılan enzimler, substratları ve pestisitler	49
Çizelge 4.1. Sentezlenen bileşiklerin element analiz, iletkenlik, manyetik duyarlılık sonuçları ve fiziksel özellikleri	59
Çizelge 5.1. 1G ve 2G dendrimerleri için ¹ H-NMR spektrumları	75
Çizelge 5.2. Sentezlenen dendrimerlerin UV-GB spektrum değerleri (nm).....	79
Çizelge 5.3. Sentezlenen dendrimerlerin önemli IR titreşim frekansları (cm ⁻¹).....	86
Çizelge 5.4. GOx enzimi immobilize edilmiş dendrimerler için bulunan optimum şartlar ve kinetik parametreler	93
Çizelge 5.5. GOx enzimi immobilize edilmiş dendrimerler için tekrarlanabilirlik değerleri (% aktiflik).....	94
Çizelge 5.6. GOx enzimi immobilize dendrimerler için depolama değerleri (% aktiflik).....	95
Çizelge 5.7. GOx enzimi immobilize edilmiş dendrimerlerin yapay idrar çözeltisindeki tekrarlanabilirlik değerleri (% aktiflik).....	98
Çizelge 5.8. AChE enzimi immobilize edilmiş dendrimerler için bulunan optimum şartlar ve kinetik parametreler	102
Çizelge 5.9 AChE enzimi immobilize edilmiş dendrimerler için tekrarlanabilirlik değerleri (% aktiflik).....	104
Çizelge 5.10. AChE enzimi immobilize edilmiş dendrimerler için depolama değerleri (% aktiflik, pH 8)	105
Çizelge 5.11. İmmobilize enzimlerin absorbands değerlerinin % 50'ye düşmesi için gereken pestisit miktarları (µL)	106
Çizelge 5.12. İmmobilize dendrimerlere eklenen pestisit (fosmet) hacimleri (µL) ve ölçülen absorbands değerleri.....	108
Çizelge 5.13. İmmobilize dendrimerlere eklenen pestisit (karbaril) hacimleri (µL) ve ölçülen absorbands değerleri.....	112
Çizelge 5.14. İmmobilize dendrimerlere eklenen pestisit (diklofop-metil) hacimleri (µL) ve ölçülen absorbands değerleri	116

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Doğal olarak meydana gelmiş dendritik yapı (sinir hücresi) [2]	1
Şekil 2.1. Ahtapot molekülü (solda): metal iyonları ile konak-konuk etkileşimi [17] ...	3
Şekil 2.2. Substrat-seçici katalizör özelliğindeki dört-kollu 'ahtapot' bileşikler.....	4
Şekil 2.3. Vöğtle ve diğerleri tarafından geliştirilen dendrimer sentezi [19].....	4
Şekil 2.4. Tomalia ve diğerleri tarafından sentezlenen PAMAM dendrimeri [21]	5
Şekil 2.5. Newkome ve diğerleri tarafından sentezlenen dendrimer	6
Şekil 2.6. Dendrimerlerin şematik gösterimi	7
Şekil 2.7. Dendron yapısının şematik gösterimi	7
Şekil 2.8. Dendrimerlerde jenerasyon sayısının tespit edilişi	8
Şekil 2.9. Dendrimerler ve doğrusal polimerler için viskozitenin mol kütlesi ile değişimi.....	9
Şekil 2.10. Dendrimerlerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanımı [32]	9
Şekil 2.11. Diverjent metot ile dendrimer sentezinin şematik gösterimi	10
Şekil 2.12. Konverjent metot ile dendrimer sentezinin şematik gösterimi	11
Şekil 2.13. İkinci jenerasyon PAMAM sentezi için genel rota.....	12
Şekil 2.14. Bütan-1 ,4-diamin çekirdekli 3. jenerasyon PPI dendrimerinin sentezi	13
Şekil 2.15. Farklı boyuttaki peptit dendrimerlerin şematik gösterimi	13
Şekil 2.16. Tekto dendrimerin şematik gösterimi [38]	14
Şekil 2.17. Silisyum içeren PAMAMOS dendrimerinin oluşumu.....	15
Şekil 2.18. Frechet tipi 3. Jenerasyon dendrimerler sentezi [43].....	16
Şekil 2.19. Elektrokataliz için hazırlanan PAMAM dendrimerine Pt(II) iyonlarının yerleştirilmesi.....	17
Şekil 2.20. PBP2a imünoşansörünün şematik gösterimi	17
Şekil 2.21. LED olarak kullanılabilecek dendritik yapının dizaynı.....	18

Şekil	Sayfa
Şekil 2.22. Aminoasit kullanılarak elde edilen dendrimerin şematik gösterimi [51]	19
Şekil 2.23. Biyoanot ve biyokatot yüzeylerinin hazırlanmasının şematik görüntüsü..	19
Şekil 2.24. GOx enziminin immobilizasyonunda kullanılan membranın hazırlanışının şematik gösterimi [55]	20
Şekil 2.25. Enzimsiz imünosensörün tasarımı (camsı karbon elektrot (CKE), birincil monoklonal antikorlar (Ab1), sıgır serum albumini (BSA) prokalsitonin (PCT))	20
Şekil 2.26. Ferrosenin iki farklı yapısı.....	21
Şekil 2.27. GMA'nın kopolimerleşmesi ve immobilizasyon şeması.....	22
Şekil 2.28. 1-(2-metilbenzoyl)-3-(3-ferrosenilfenil)selenoüre'nin indirgenme-yükseltgenme mekanizması	23
Şekil 2.29. Poliprol temelli biyosensörün yapısı ve enzim merkezinde gerçekleşen kimyasal reaksiyon.....	24
Şekil 2.30. Floroglusinol-ferrosen içerikli bir polimerin (FBHP) sentez rotası	24
Şekil 2.31. Ferrosen çekirdekli suda-çözünebilen dendrimerlerin sentez rotası.....	25
Şekil 2.32. Tetrakis(ferrosenil-vinil sülfid)'in yapısı	25
Şekil 2.33. Tiyol-vinilsilan reaksiyonunun şematik gösterimi	26
Şekil 2.34. DAB-G1-PPI-(NH ₂) ₄ dendrimerine bağlı rutenyum ve ferrosen içerikli yapı.....	26
Şekil 2.35. Enzim substrat bileşiğinin oluşumunun şematik gösterimi	27
Şekil 2.36. Enzimin desteğe adsorpsiyonu	28
Şekil 2.37. Enzimin desteğe kovalent bağlanması.....	29
Şekil 2.38. Enzimin desteğe iyonik olarak bağlanması	29
Şekil 2.39. Enzimin desteğe çapraz bağlanması	30
Şekil 2.40. Enzimin matriks (kafes) içine hapsedilmesi	30
Şekil 2.41. Enzimin yarı geçirgen mikrokapsüller içinde tutulması (hapsetme)	31
Şekil 2.42. <i>Aspergillus</i> (A), <i>Penicillium</i> (B) ve <i>Talaromyces flavus</i> (C) küfleri.....	33

Şekil	Sayfa
Şekil 2.43. β -D-glukozun yükseltgenme mekanizması	34
Şekil 2.44. GOx'nin monomerindeki aktif rol oynayan aminoasit kalıntıları [106].....	34
Şekil 2.45. AChE enziminin üç boyutlu yapısı.....	35
Şekil 2.46. Asetilkolinesterazın aktif bölgeleri (Torpedo californica asetilkolinesteraz (TcAChE); (protein data bank kodu: 1eve) [111]).....	36
Şekil 2.47. Asetilkolinin (ACh) açık yapısı	36
Şekil 2.48. Asetilkolinin hidroliz mekanizmasının şematik gösterimi	37
Şekil 2.49. Organik fosforlu (OP) bileşiklerin genel yapısı.....	37
Şekil 2.50. AChE enzimin 'Yaşlanma' (aging) mekanizması	38
Şekil 2.51. Karbamatlı bileşiklerin genel yapısı	38
Şekil 2.52. Karbarilin AChE enzimi ile verdiği tepkime.....	39
Şekil 2.53. Ferrosen takılı çitosan molekül yapısı ve GOx enziminin immobilizasyonun şematik gösterimi	40
Şekil 2.54. Modifiye elektrot GOx/TEOS–APTES–Fc/CS/GO 'nun şematik hazırlanışı ve glukozun yükseltgenme mekanizması.....	41
Şekil 2.55. Ru-RP polimerinin sentez rotası	42
Şekil 2.56. Glukoz biyosensörünün çalışma prensibinin şematik gösterimi.....	42
Şekil 2.57. AChE aktivitesinin belirlenmesi için CdSe QDS'nin enzimatik sentez rotası.....	43
Şekil 2.58. Organofosfat ve karbamatların belirlenmesinde renk değişimini sağlayan H_2O_2 'in oluşumu	44
Şekil 2.59. H_2O_2 tayininde AChE ve ChOx enzimlerinin etkisinin şematik gösterimi ..	44
Şekil 2.60. (A) AChE'in substratı ACh ile tepkimesi ve OP bileşiklerle inhibisyonunun şematik gösterimi (B) ChOx tarafından gerçekleştirilen biyoelektrokatalitik sinyal mekanizması.....	45
Şekil 4.1. 1G dendrimerinin sentezi için öngörülen tepkime.....	51
Şekil 4.2. 2G dendrimerinin sentezi için öngörülen tepkime.....	52

Şekil	Sayfa
Şekil 4.3. 2G-H-Pt(II) dendrimerinin sentezi için öngörülen tepkime	53
Şekil 4.4. 2G-H-Pt(IV) dendrimerinin sentezi için öngörülen tepkime.....	54
Şekil 4.5. 2G-NO ₂ -Pt(II) dendrimerinin sentezi için öngörülen tepkime	55
Şekil 4.6. 2G-NO ₂ -Pt(IV) dendrimerinin sentezi için öngörülen tepkime.....	56
Şekil 4.7. 2G-CH ₃ -Pt(II) dendrimerinin sentezi için öngörülen tepkime	57
Şekil 4.8. 2G-CH ₃ -Pt(IV) dendrimerinin sentezi için öngörülen tepkime.....	58
Şekil 4.9. Trinder metoduna göre meydana gelen mekanizmanın şematik gösterimi	60
Şekil 4.10. Michaelis-Menten grafiği	62
Şekil 4.11. Lineweaver-Burk grafiği	63
Şekil 4.12. Ellman metoduna göre meydana gelen mekanizmanın şematik gösterimi...	65
Şekil 4.13. Çalışılan pestisitlerin açık yapısı ve adlandırılmaları	68
Şekil 5.1. Birinci jenerasyon dendrimere (1G) ait FTIR spektrumu.....	70
Şekil 5.2. Birinci jenerasyon dendrimere (1G) ait UV-GB spektrumu.....	71
Şekil 5.3. Birinci jenerasyon dendrimere (1G) ait ¹ H-NMR spektrumu.....	71
Şekil 5.4. Birinci jenerasyon dendrimere (1G) ait LC-MS spektrumu	72
Şekil 5.5. İkinci jenerasyon dendrimere (2G) ait FT-IR spektrumu	73
Şekil 5.6. İkinci jenerasyon dendrimere (2G) ait UV-GB spektrumu	74
Şekil 5.7. İkinci jenerasyon dendrimere (2G) ait ¹ H-NMR spektrumu	75
Şekil 5.8. İkinci jenerasyon dendrimere (2G) ait LC-MS spektrumu.....	76
Şekil 5.9. 2G-CH ₃ -Pt(IV) dendrimerinin şematik fragmentasyonu.....	78
Şekil 5.10. 2G-CH ₃ -Pt(IV) dendrimerinin MALDI-TOF MS spektrumu	79
Şekil 5.11. Genişletilmiş 2. jenerasyon dendrimerlere ait UV-GB spektrumları	81
Şekil 5.12. 2G-H-Pt(II) dendrimerine ait FT-IR spektrumu	83
Şekil 5.13. 2G-H-Pt(IV) dendrimerine ait FT-IR spektrumu	83

Şekil	Sayfa
Şekil 5.14. 2G-NO ₂ -Pt(II) dendrimerine ait FT-IR spektrumu.....	84
Şekil 5.15. 2G-NO ₂ -Pt(IV) dendrimerine ait FT-IR spektrumu	84
Şekil 5.16. 2G-CH ₃ -Pt(II) dendrimerine ait FT-IR spektrumu	85
Şekil 5.17. 2G-CH ₃ -Pt(IV) dendrimerine ait FT-IR spektrumu	85
Şekil 5.18. GOx enziminin aktifliği üzerine pH'nın etkisi	88
Şekil 5.19. GOx enziminin aktifliği üzerine sıcaklığın etkisi.....	90
Şekil 5.20. GOx enzimi immobilize edilmiş dendrimerler için Lineaweaver-Burk grafikleri.....	92
Şekil 5.21. GOx enzimi immobilize edilmiş dendrimerler için tekrar kullanılabilirlik grafiği.....	94
Şekil 5.22. GOx enzimi immobilize edilmiş dendrimerler için depolama kararlılığı grafiği.....	96
Şekil 5.23. GOx enzimi immobilize edilmiş dendrimerler için yapay idrar ortamında tekrar kullanılabilirlik grafiği.....	97
Şekil 5.24. AChE enziminin aktifliği üzerine pH'nın etkisi.....	99
Şekil 5.25. AChE enziminin aktifliği üzerine sıcaklığın etkisi.....	100
Şekil 5.26. AChE enzimi immobilize edilmiş dendrimerler için Lineaweaver-Burk grafikleri.....	102
Şekil 5.27. AChE enzimi immobilize edilmiş dendrimerler için tekrar kullanılabilirlik grafiği.....	103
Şekil 5.28. AChE enzimi immobilize edilmiş dendrimerler için depolama kararlılığı grafiği.....	105
Şekil 5.29. AChE enzimi ve fosmet arasında gerçekleşen inhibisyon mekanizması.....	107
Şekil 5.30. Çalışılan immobilize dendrimerlerin fosmet eklenmesi sonucunda değişen absorbans grafikleri.....	109
Şekil 5.31. İmmobilize dendrimerler üzerine ilave edilen fosmet miktarlarına karşı okunan absorbans değerleri.....	110
Şekil 5.32. AChE ile karbaril (1-naftil-N-metilkarbammat) arasında gerçekleşen inhibisyon mekanizması.....	111

Şekil	Sayfa
Şekil 5.33. Çalışılan immobilize dendrimerlerin karbaril eklenmesi sonucunda değişen absorbens grafikleri	113
Şekil 5.34. İmmobilize dendrimerler üzerine ilave edilen karbaril miktarlarına karşı okunan absorbens değerleri.....	114
Şekil 5.35. AChE ile diklofop-metil arasında gerçekleşen inhibisyon tepkimesi.....	115
Şekil 5.36. Çalışılan immobilize dendrimerlerin diklofop-metil eklenmesi sonucunda değişen absorbens grafikleri	117
Şekil 5.37. İmmobilize dendrimerler üzerine ilave edilen diklofop-metil miktarlarına karşı okunan absorbens değerleri.....	118
Şekil 6.1. 1G ve 2G dendrimeri için önerilen yapı	120
Şekil 6.2. Pt(II) içeren genişletilmiş ikinci jenerasyon dendrimer için önerilen yapı.....	120
Şekil 6.3. Pt(IV) içeren genişletilmiş ikinci jenerasyon dendrimer için önerilen yapı ...	121
Şekil 6.4. İmmobilize dendrimerlerin şematik gösterimi.....	121

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. (A) indirgenmiş grafen oksit (B) ferrosen katkılı indirgenmiş grafen oksitin SEM görüntüleri.....	23
Resim 2.2. Böbrekteki dokular arasında glukoz ölçümü için mikrosensör yerleştirilmesi.....	40
Resim 2.3. Fc-polipirol filminin SEM görüntüsü	41
Resim 6.1. (A) Enzim-substrat etkileşimi baskın, (B) Enzim-substrat etkileşimi zayıf, (C) Enzim-pestisit etkileşimi baskın.....	123

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklamalar

K_m	Michaelis-Menten sabiti
V_{mak}	Maksimum hız
ν (cm^{-1})	Gerilme titreşimi
μL	Mikrolitre

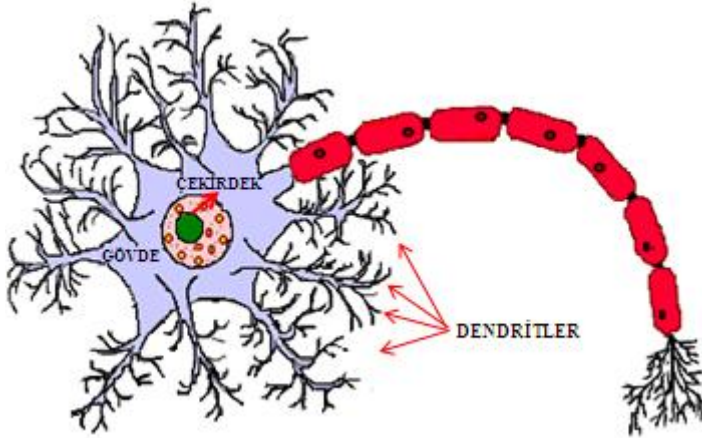
Kısaltmalar

Açıklamalar

1G	Ferrosen çekirdekli birinci jenerasyon dendrimer
2G	Ferrosen çekirdekli ikinci jenerasyon dendrimer
AAS	Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi
AChE	Asetilkolinesteraz enzimi
DTNB	5,5-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit
Fc	Ferrosen
FTIR	Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GOx (GOD)	β -Glukoz oksidaz enzimi
1H -NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans
LC-MS	Sıvı Kromatografisi - Kütle Spektrometresi
MALDI-TOF MS	Matriks Yardımlı Lazer İyonizasyon Kütle Spektrometresi
TGA/DTA	Termogravimetrik Analiz/Diferansiyel Termal Analiz
UV-GB	Ultra Viyole-Görünür Bölge

1. GİRİŞ

Dendrimerler, polimerlerin yeni bir sınıfıdır. Bu oldukça dallanmış ve iyi tanımlanmış makromoleküller, kovalent bağlı nanopartiküllerden oluşan, genel olarak küresel ve orijinal tipli üç boyutlu yapılardır. Dendrimer, Yunanca “dendron” (ağaç) ve “meros” (kısım) kelimelerinden türeyerek ağaç benzeri dallanmış bileşikler ifade etmektedir [1]. Dendritik (çok dallanmış) yapılar, doğada yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bu yapılara, belirli bir fonksiyonu yerine getirmek ya da geliştirmek için ihtiyaç duyulmaktadır. Ağaçların dalları ve kökleri, sinir hücreleri, hayvan ve bitkilerin damarlanma sistemleri doğal olarak meydana gelmiş canlı dendritik yapılara örnek verilebilir. Bunun yanı sıra cansız sistemlerde de dendritik yapıları görmek mümkündür. Kar taneleri bu yapılara verilebilecek en güzel örneklerdendir.



Şekil 1.1. Doğal olarak meydana gelmiş dendritik yapı (sinir hücresi) [2]

Dendrimerler, klasik polimerlere göre, daha çok dallanmış yapıda olmaları, reaktif özelliğe sahip uç gruplarla sonlanmaları ve dalların arasında misafir molekülleri kapsülleyebilme yeteneklerinden dolayı ilgi odağı olmuşlardır. Özellikle, 1990’lı yılların başında dikkat çeken dendrimerler üzerine olan çalışmaların giderek arttığı kaynaklarca görülmektedir [3].

Enzimler, canlılar tarafından üretildiklerinden, endüstriyel veya analitik amaçlı kullanımları için doku, kan, mikroorganizma gibi canlı veya canlı kökenli kaynaklardan saflaştırılırlar. Bu saflaştırma işlemlerinin maliyeti yüksektir. Endüstriyel ve analitik işlemlerin çoğu, sulu ortamda gerçekleşir. Bu prosesler de enzimler, substrat çözeltisi ile karıştırılır ve böylece ürün elde edilir. Ancak bu proses sırasında enzimler ekonomik

olarak geri kazanılamazlar. Bu nedenle enzimler suda çözünmeyen bir desteğe immobilize edilmekte ve geri kazanılmaktadır.

Dendrimerler üzerine olan enzim immobilizasyonu ile ilgili araştırmaların 1998 yılında *Liu ve diğerleri* tarafından proteinlerin parçalanmasından sorumlu olan proteaz enzimi ile başladığı görülmektedir [4].

Glukoz oksidaz (GOx) enzimi, gıda sanayisi, klinik kimya ve biyoteknolojideki kullanımları nedeni ile ticari önem taşımaktadır. Bunun dışında GOx hem ucuz olması hem de dayanıklı olması sebebiyle analitik bir reaktif olarak kanda glukoz tayininde kullanılmaktadır. Literatürler incelendiğinde, glukoz oksidaz enzimin, dendrimerler üzerine olan immobilizasyonunun genellikle poli(amidoamin) türevli dendrimerlerin üzerine olduğu görülmektedir [5]. Oldukça az sayıda sentezlenen ferrosen içeren dendrimerlerin enzim uygulamaları üzerine olan çalışmaların, genellikle biyosensör amaçlı olduğu görülmektedir [6-8].

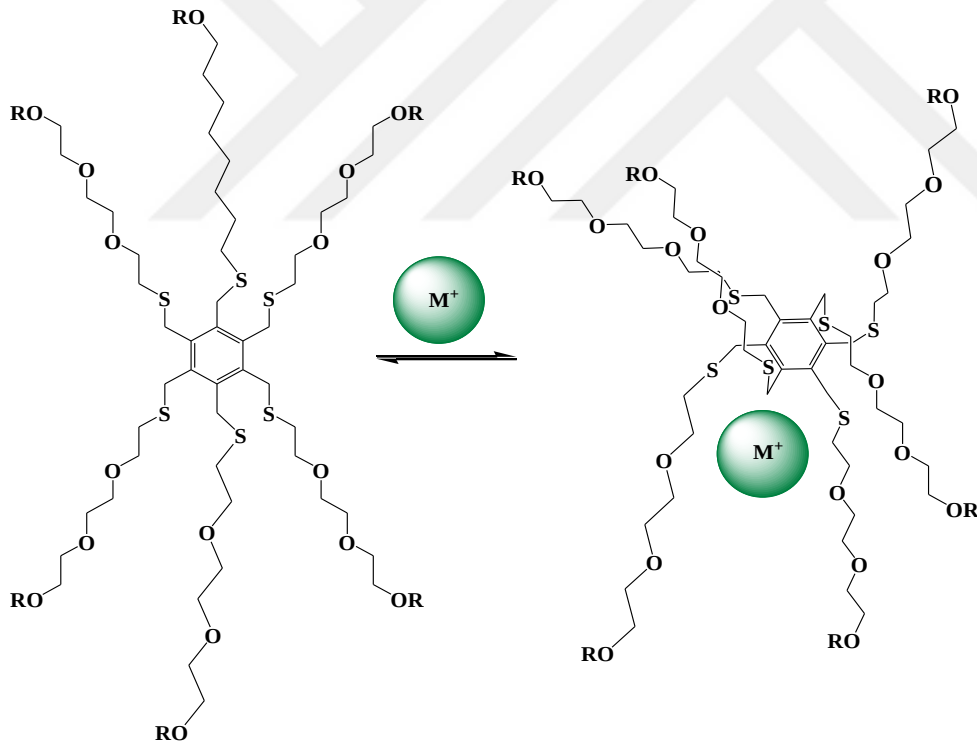
Organik fosforlu (OP), klorlu ve karbamatlı pestisitler sinir sistemini etkileyen bileşiklerdir. Sinir uyarılarının iletilmesinde önemli rol oynayan asetilkolinesteraz (AChE) enziminin özellikle organik fosforlu (OP) ve karbamatlı pestisitler varlığında inhibe olarak enzim aktivitesinin azalmasına neden olduğu bilinmektedir. Bu nedenle aktivitedeki azalmanın izlenmesi için AChE-biyosensörlerin geliştirilmesi üzerine çalışmaların çeşitlenerek arttığı görülmektedir [9]. Pestisitlerin, amperometrik ve potansiyometrik tayinine yönelik çalışmaların amacı, daha duyarlı ve maliyeti daha ucuz olabilecek yöntemlerin geliştirilmesi üzerine olduğu görülmektedir. Asetilkolinesteraz enziminin (AChE) biyosensör üzerine olan çalışmaların çok yaygın olduğu, ancak immobilizasyon ile ilgili çalışmaların yaygın olmadığı görülmektedir [10].

Sunulan tez kapsamında, sağlık, endüstri ve fen bilimi alanlara uygulanabileceği düşünülen ve medyatör olarak önemli bir role sahip olan ferrosen çekirdekli birinci, ikinci ve genişletilmiş ikinci jenerasyonlu dendrimelerin sentezlenmesi hedeflendi. Sentezlenen dendrimerlerin yapıları spektral yöntemlerle aydınlatıldıktan sonra glukoz oksidaz (GOx) ve asetilkolinesteraz (AChE) enzimlerinin immobilizasyonunun yapılması ile aktifliğinin araştırılması sayesinde biyokataliz araştırmalarında da dikkat çekebileceği düşünüldü.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

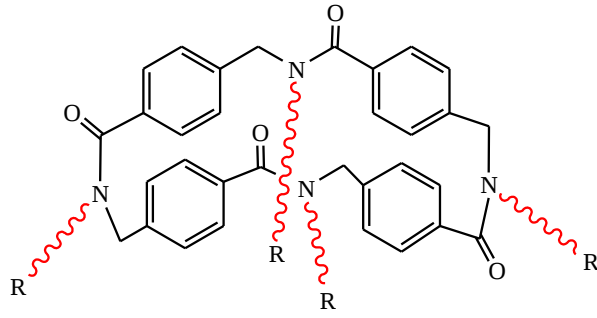
2.1. Dendrimerler

Supramoleküler kimya, moleküller arasındaki ve molekül içindeki etkileşimleri inceleyen bilim dalıdır. 1970’li yılların sonlarına doğru, supramoleküler kimyasında yer alan konuk-konak bileşikler ile ilgili çalışmalar, yeni alanlara zemin oluşturması nedeniyle ilgi odağı olmaya başlamıştır [11-16]. Ahtapot ‘octopus’ ve dokunaç ‘tentacle’ yapılarına benzeterek bir makrosiklik moleküllerinin sentezi üzerine olan çalışmaların dikkat çekici olmasının nedeni, bu tür moleküllerin substrata karşı seçici olmasından kaynaklanmaktadır [17,18]. 1974 yılında *Vögtle ve diğerleri* tarafından ilk kez sentezlenen ahtapot molekülünün yapısı Şekil 2.1.’de verilmiştir.



Şekil 2.1. Ahtapot molekülü (solda): metal iyonları ile konak-konuk etkileşimi [17]

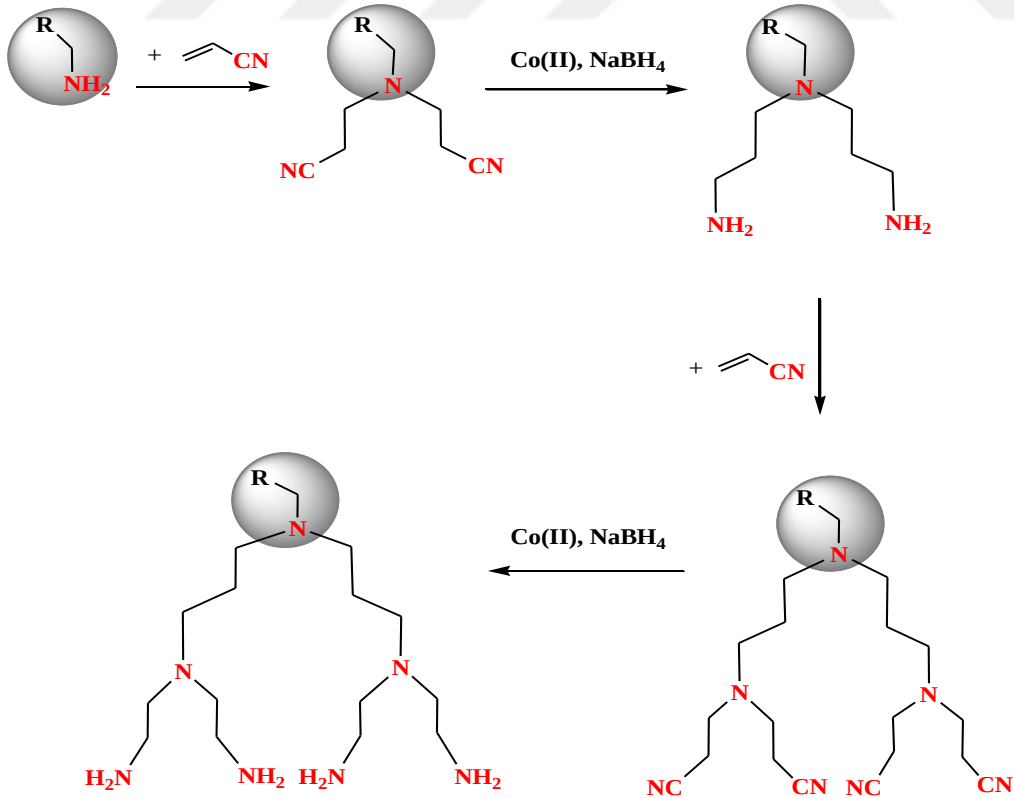
Daha sonraki yıllarda, *Murakami ve diğerleri* ahtapot yapısına benzer bir makrosiklik bileşik olan ‘azoparasiklofanlar’ı sentezlemişlerdir (Şekil 2.2.) [18]. Bu araştırmacılar sentezledikleri makromolekülün, son derece esnek yapıda olmasına rağmen, substrata karşı etkili bir seçici katalizör olarak davranabileceğini açıklamışlardır.



- 1 $2R = [CH_2]_{10}N^+HMe_2Cl^-$
 $2R = [CH_2]_{10}N^+(CH_2)_mMe_2Cl^-$
 2 $2R = [CH_2]_{10}N^+(CH_2)_mMe_2Cl^-$

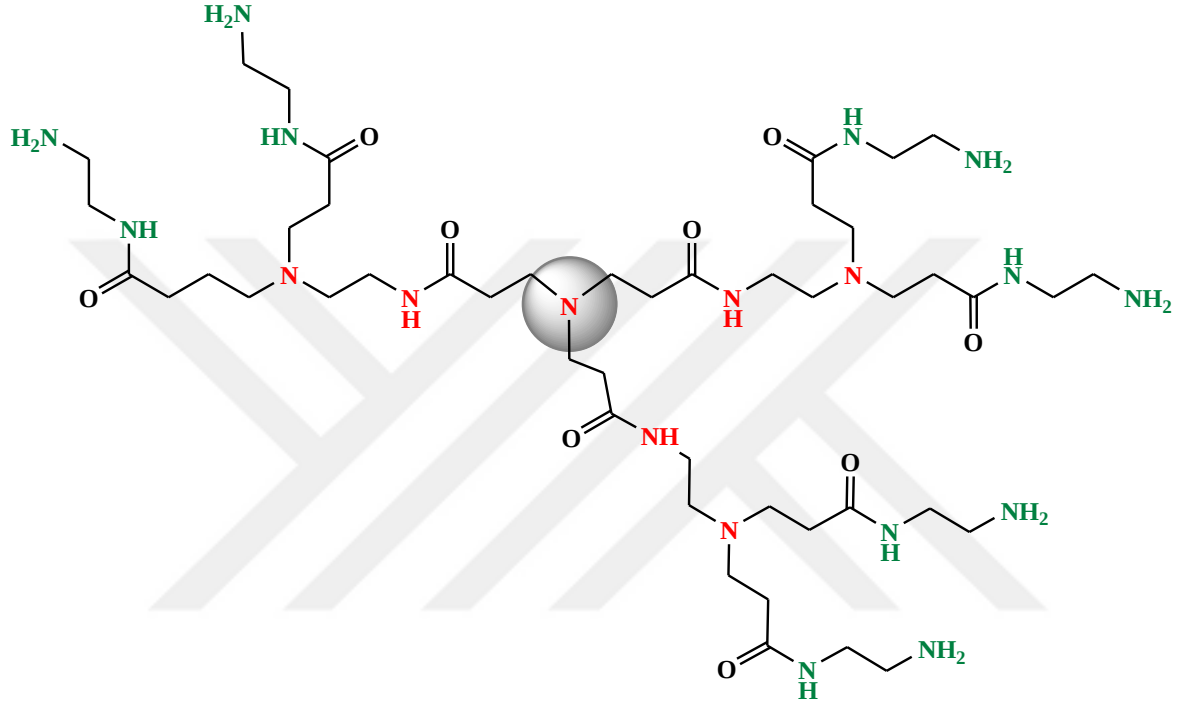
Şekil 2.2. Substrat-seçici katalizör özelliğindeki dört-kollu 'ahtapot' bileşikler

İlk dendrimer sentezi 1978 yılında *Vögtle ve diğerleri* tarafından gerçekleştirilmiştir [19]. Vögtle araştırmasında, amin grubuna akrilonitrilin Micheal-tipi katılması sonucunda oluşan ürünün, birincil amine indirgenmesiyle 'kademeli' (cascade) dendrimerlerin sentezlendiği ve teorik olarak sonsuz kere tekrarlanmasıyla büyük makromolekülerin hazırlanabileceğini ifade etmiştir (Şekil 2.3.)



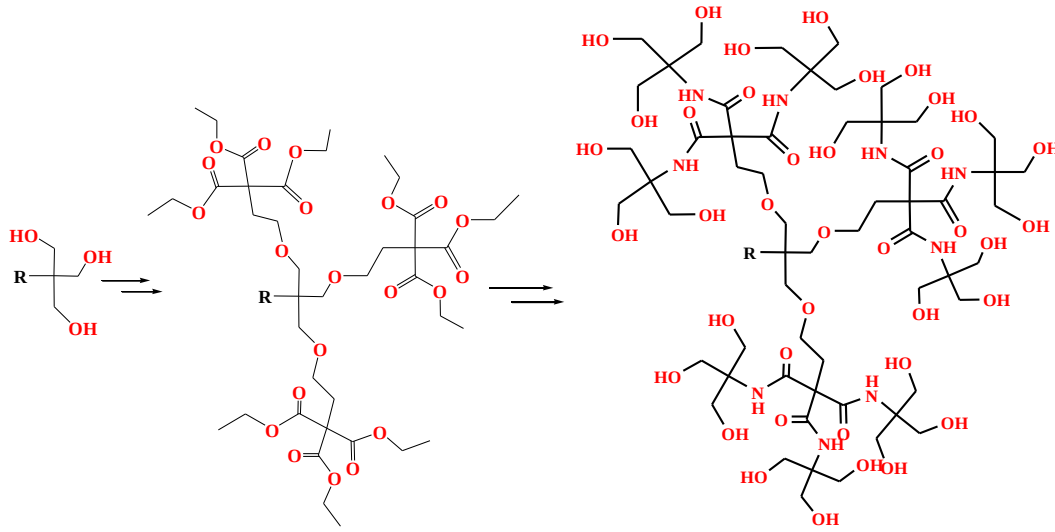
Şekil 2.3. Vögtle ve diğerleri tarafından geliştirilen dendrimer sentezi [19]

1980'li yılların başlarında Denkewalter [20] ve Tomalia [21] ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı (polidispersite) küçük olan, dallanmış polimerleri kondenzasyon yöntemi ile sentezlemişlerdir [22,23]. Özellikle Tomalia ve grubunun, Poliamidoamin (PAMAM) serileri üzerine olan çalışmalarının 'dendrimer' ifadesi olarak literatürlerinde yer alması, günümüze kadar olan çalışmalara örnek teşkil ettiği görülmektedir.



Şekil 2.4. Tomalia ve diğerleri tarafından sentezlenen PAMAM dendrimeri [21]

Dendrimer ifadesi, Yunanca'da 'dendron' (ağaç)'dan ve bunun eş anlamlısı olan Latince 'arboral' (çardak) ile 'cascade' (kademeli) terimlerinden türetilmiştir. Günümüzde 'dendrimer' terimi, çok dallı monodispers (aynı uzunluktaki polimer zincirleri) bileşiklerini tanımlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Kaynaklara bakıldığında dendrimer yerine 'arborol' kelimesinin de kullanıldığı görülmektedir. *Newkome* ve *diğerleri* her bir jenerasyonunda farklı yapılara sahip, dallanmış bir seri makromolekül sentezlemişler (Şekil 2.5.) ve bu makromolekülü 'arborol' olarak tanımlamışlardır [24].

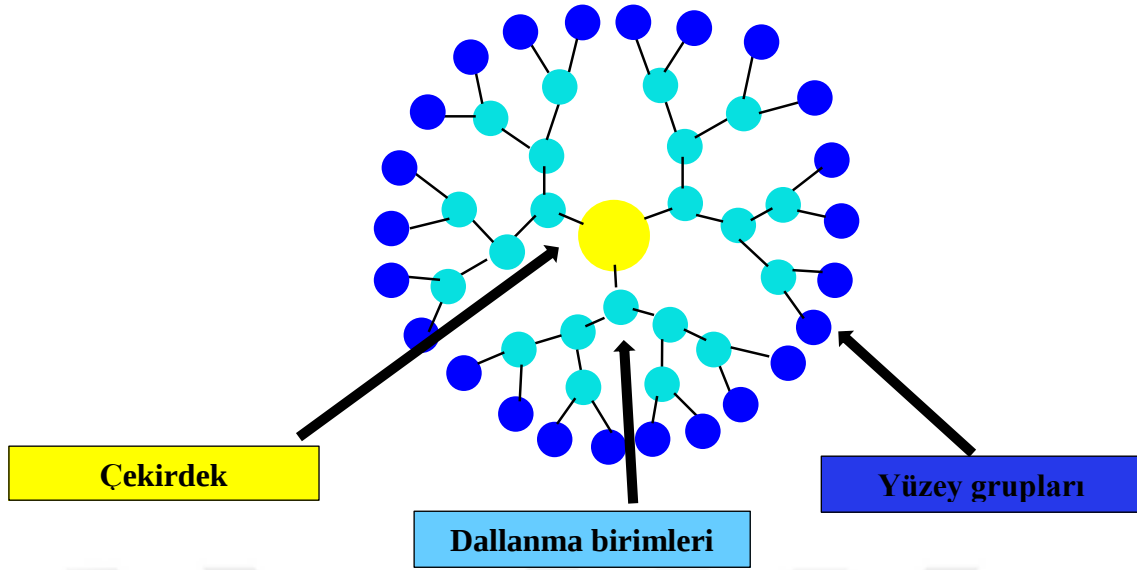


Şekil 2.5. Newkome ve diğerleri tarafından sentezlenen dendrimer

2.1.1. Dendrimerlerin yapısı

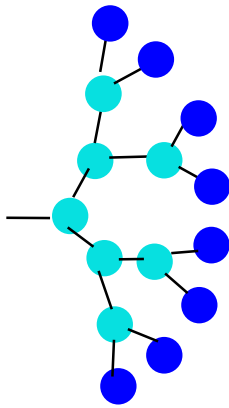
Dendrimerler, azot atomu gibi bir merkez (core) atomdan başlayarak, tekrar eden kimyasal reaksiyonların meydana gelmesi ile oluşan küresel dallanmış bir yapıya sahip monodispers makromoleküllerdir. Birbirini izleyen katmanlar eklenerek dendrimerler istenilen boyuta genişletilebilir [25,26].

Dendrimerler başlıca üç kısımdan oluşur. Bunlar; (a) çok fonksiyonlu bir çekirdek, (b) dallanma birimleri ve (c) yüzey grupları olarak tanımlanmaktadır. Çok fonksiyonlu merkez molekül, örneğin amonyak ya da etilendiaminden sentezlenebilmektedir. Dendrimerlerin çeşitliliği, çekirdek etrafındaki fonksiyonel gruplar tarafından sağlanır. Dallanma birimleri, dendrimerin tekrarlı bir şekilde büyümesini sağlar. Dendrimerlerde bulunan reaktif uç gruplar dentritik büyümenin devamını sağladığı gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklerin geliştirilmesi için de kullanılmaktadır.



Şekil 2.6. Dendrimerlerin şematik gösterimi

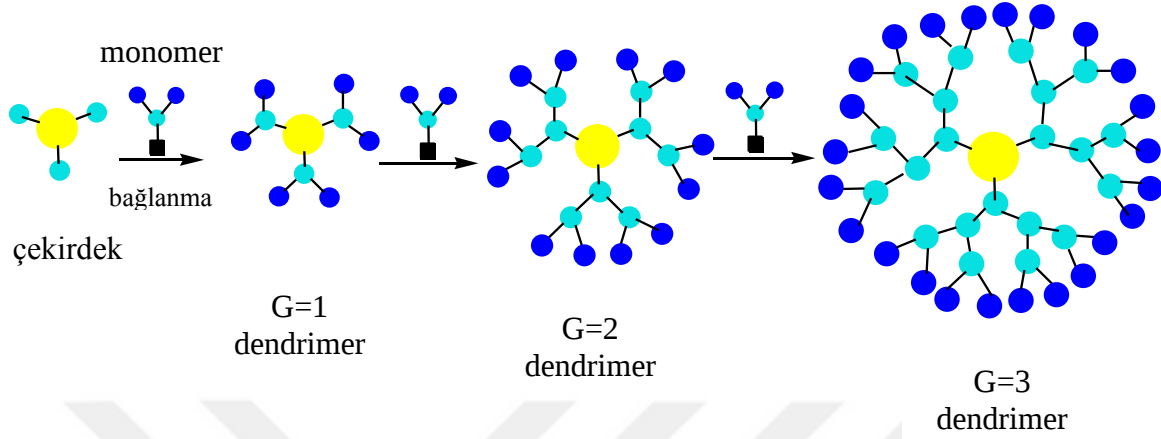
Dendrimerlerin üçgen şeklinde büyüyen parçalarına ‘dendron’ adı verilir. Dendronlar, dendritik parça dilimi olarak da ifade edilmektedir. Dendrimeri oluşturmak için dendronların fonksiyonel gruba sahip olması gerekir (Şekil 2.7.). Dendronlardan konverjent (yakınsak) yöntem ile dendrimerler elde etmek mümkündür. Frénchet tipi dendronlar ticari olarak mevcuttur. Bu dendronlardan kovalent veya nonkovalent bağlanma ile dendrimerler sentezlemek mümkündür [27].



Şekil 2.7. Dendron yapısının şematik gösterimi

Dendrimerlerin büyüklüğü, tekrarlanan döngü sayısı yada jenerasyon sayısı (G) kavramıyla belirtilir. Jenerasyon sayısı, çekirdekten dış yüzeye doğru ilerleyen dallanma noktalarının sayısı ile kolayca tespit edilebilir. Örneğin, bağlanma noktası olmayan bir dendrimer

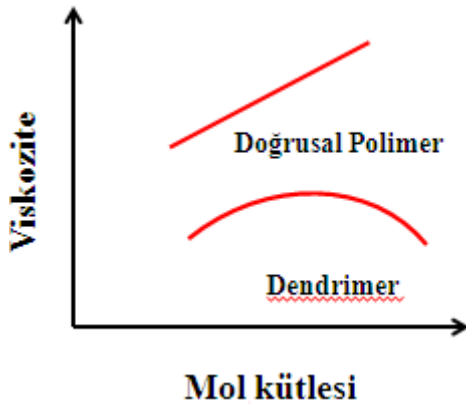
sıfırıncı jenerasyon (G-0) olarak adlandırılır. Aşağıda, bir dendrimerdeki jenerasyon sayısının nasıl tespit edilebileceği şematik olarak verilmektedir.



Şekil 2.8. Dendrimerlerde jenerasyon sayısının tespit edilişi

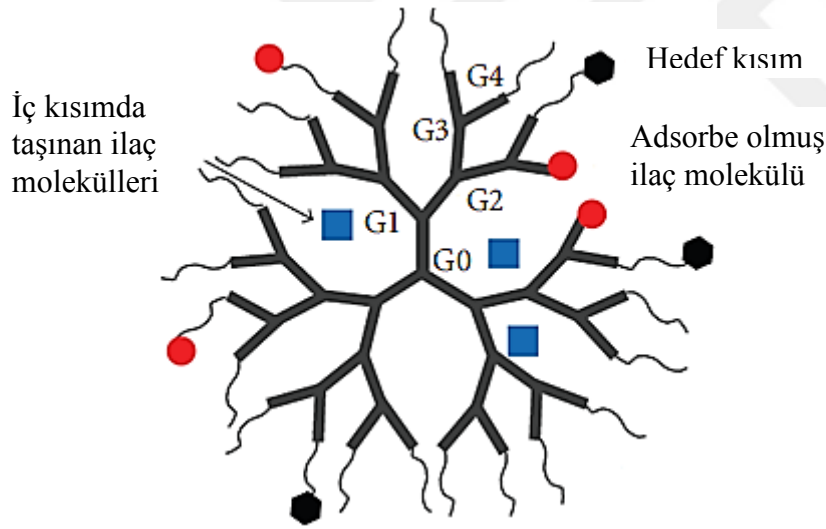
2.1.2. Dendrimerlerin özellikleri

Dendrimerler doğrusal polimerlerin aksine monodispers makromoleküllerdir. Dendrimerlerin boyutu ve molekül ağırlığı sentez sırasında kontrol edilebilmektedir. Klasik polimerizasyon işleminde ise doğrusal ve farklı boyuttaki polimerler sentezlenir. Dendrimerlerin, polimerlerle olan yapıları kıyaslandığında, dendrimerlerin daha iyi fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olduğu görülmektedir [28]. Dendrimerlerin işlevselliği çekirdek molekülüne, kollar arasındaki boşluğa ve yüzey gruplarına bağlıdır. Doğrusal polimerler çözücü ortamında genellikle esnek bobinler halinde bulunurken, dendrimerler sıkı paketlenmiş bir top şeklinde bulunurlar. Ayrıca dendrimerlerin çözeltileri, polimerlerin çözeltilerine göre daha az viskoziteye sahiptir. Dendrimerlerin molekül ağırlığı arttıkça, özellikle 4. jenerasyondan sonra viskozitesi maksimum değere ulaşır daha sonra azalmaya başlar. Polimerlerde ise molekül ağırlığı arttıkça düzenli olarak viskozite artar [29, 30].



Şekil 2.9. Dendrimerler ve doğrusal polimerler için viskozitenin mol kütlesi ile değişimi

Dendrimerlerde bulunan boşluklar, içerisinde bulunan molekülleri veya nanopartikülleri, her türlü ortama transfer etmeye uygun yapıdadır. Böyle bir transferin meydana gelmesinde, konuk-konak arasındaki non-kovalent etkileşim etkili olmaktadır [31].



Şekil 2.10. Dendrimerlerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanımı [32]

Dendrimerlerin uzun zincir ile sonlanması, çözünürlüğün artmasına ve yüksek aktiviteye sahip olmasına sebep olmaktadır. Dendrimerlerin çözünürlükleri yüzey gruplarının özelliklerine bağlıdır. Hidrofobik uç gruplara sahip bir dendrimer, apolar çözücülerde çözünebilirken, hidrofilik gruplar ile sonlanmış bir dendrimer polar çözücülerde çözünebilmektedir. Biyomedikal uygulamalarda kullanılan dendrimerlerin biyoyumlu olması önemlidir. Katyonik dendrimerler genellikle hücreyi öldüren ya da fonksiyonunu durduran (sitotoksik) maddelerdir. Dendrimerlerin toksik özelliği jenerasyon sayısına bağlı

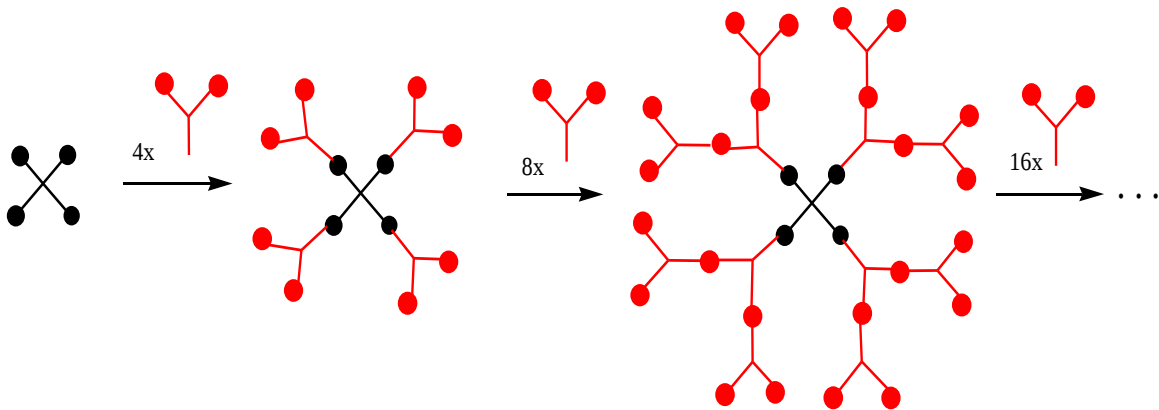
olup, jenerasyon sayısı arttıkça toksik özellik artmaktadır. Anyonik dendrimerlerin toksik özelliğinin katyonik dendrimerler kadar etkin olmadığı belirtilmiştir [33,34].

2.1.3. Dendrimerlerin sentez yöntemleri

Dendrimerler genellikle diverjent (ıraksak) ve konverjent (yakınsak) metotlarına göre sentezlenirler [35]. Dendrimerinlerin sentezinde ilk olarak diverjent metod [19], daha sonra konverjent metod kullanılmaya başlanılmıştır [36]. Kullanılan bu iki metod arasında temel farklılıklar vardır.

Diverjent (İraksak) metod yardımıyla dendrimer sentezi

Bu metotta dendrimer, multifonksiyonel özelliğe sahip bir çekirdek molekülünden dışa doğru büyür. Monomerin aktif grupları ile çekirdeğin yüzeyindeki fonksiyonel grupların reaksiyonu yeni dallanma noktalarının oluşumuna neden olur. Böylece molekülün yeni çevresi daha fazla monomer ile reaksiyona girmek için harekete geçer. Bu işlem ile daha fazla jenerasyonlu dendrimerler sentezlenir. Aşağıda diverjent büyüme metodu kullanılarak bir dendrimerin hazırlanışı şematik olarak görülmektedir.



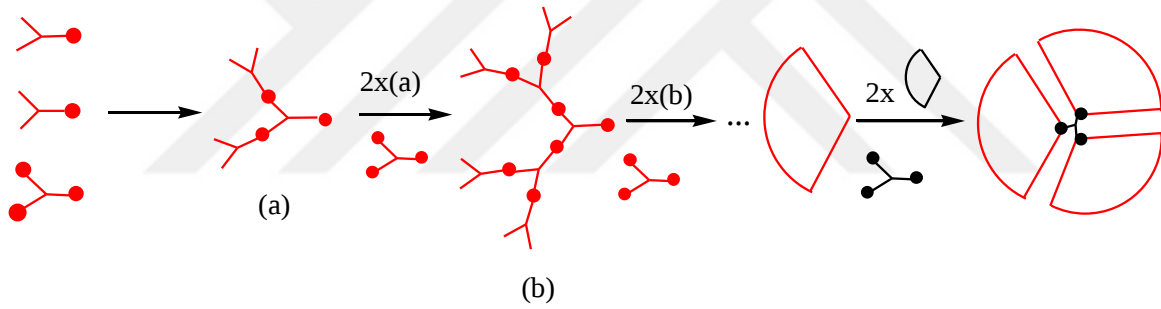
Şekil 2.11. Diverjent metod ile dendrimer sentezinin şematik gösterimi

Dendrimerlerin büyük miktarlarda üretilmesi için diverjent yaklaşımı daha başarılıdır. Ancak bu metodun dezavantajlarından biri, tamamlanmamış reaksiyonların olması sonucunda yapısal bozuklukların ortaya çıkması ve yan ürünlerin görülmesi ile safsızlık gibi problemlerin meydana gelmesidir. Diğer dezavantajı ise, polidispers yapılar oluşması

ve aşırı miktarda monomer tüketilmesidir. Bu durum oluşan ürünün saflaştırılmasını zorlaştırmaktadır [33].

Konverjent (Yakınsak) metot yardımıyla dendrimer sentezi

Konverjent metot, diverjent sentezinin olumsuzluklarına cevap vermek için geliştirilmiştir [36]. Konverjent metotta sentezin başlangıcı dendrimerlerin yüzeyinde gerçekleşir. Yüzey birimlerine monomerin bağlanmasıyla kademeli olarak çekirdeğe doğru ilerler. Dendron olarak adlandırılan böyle dallanmış polimerik kollar, yeterli büyüklüğe ulaştığında çok fonksiyonlu çekirdek molekülüne eklenir. Her bir jenerasyonun büyümesi için iki reaksiyon (aktivasyon ve büyüme) gereklidir. Büyümenin her basamağında orta dereceli bir saflaştırma işlemi yapılır. Böylece elde edilecek hedef üründe meydana gelebilecek yapısal bozuklar en aza indirilir.



Şekil 2.12. Konverjent metot ile dendrimer sentezinin şematik gösterimi

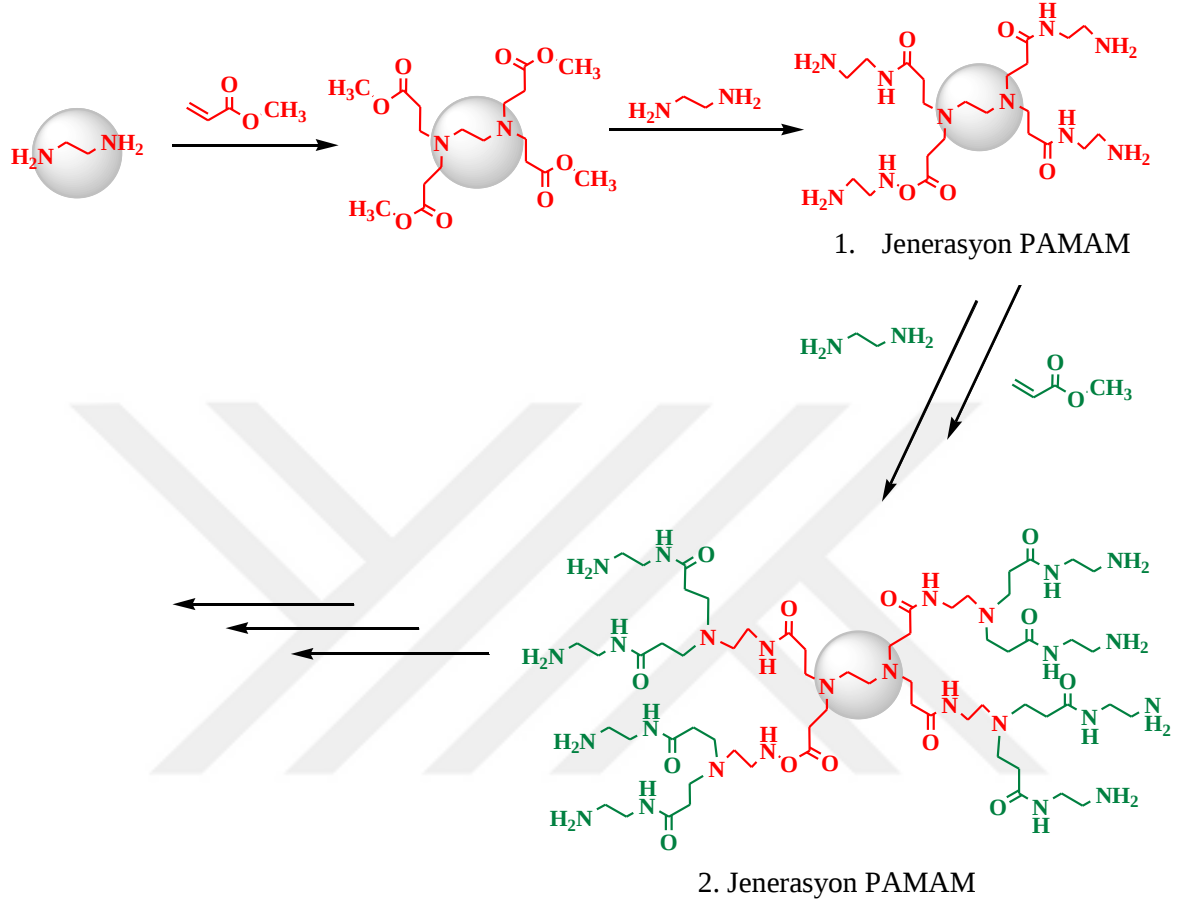
2.1.4. Dendrimer çeşitleri

Dendrimelerin sınıflandırılmasında; yapısı, sahip oldukları iç boşluklar ve fonksiyonel uç grupları temel alınmaktadır. Aşağıda çeşitli dendrimerler verilmektedir.

PAMAM dendrimerleri

PAMAM olarak kısaltılan poliamidoamin dendrimerinin, ilk kez *Tomalia ve diğerleri* tarafından sentezlendiği görülmektedir [15]. Bu dendrimerler diverjent metodu ile sentezlenmiş ve etilendiamin veya amonyak başlatıcı reaktif olarak kullanılmıştır. Etilendiaminin aşırısı ile karbometoksinin amitleşme reaksiyonu sonucu oluşan ara ürünün

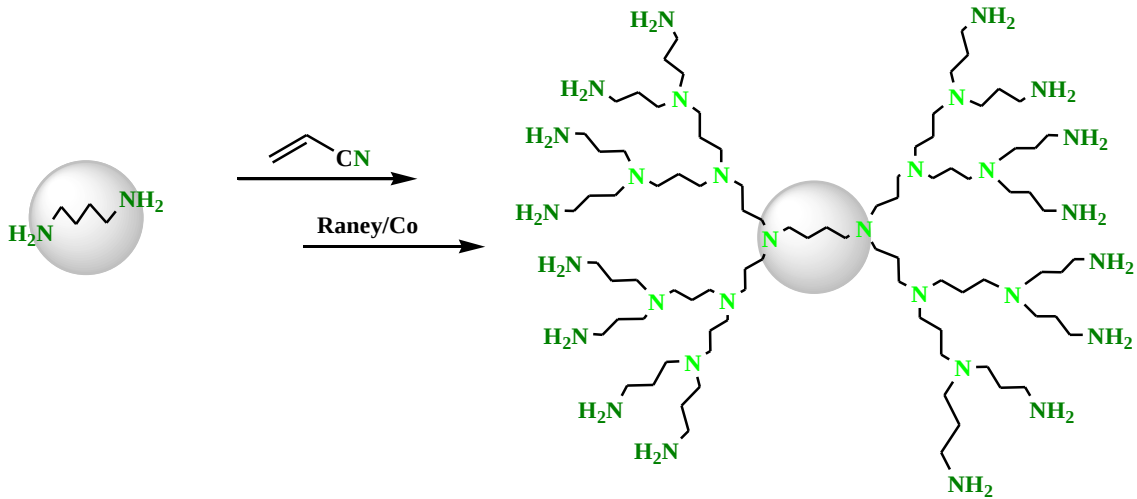
primer amino gruplarına, metil akrilatın bir çift Michael katılmasıyla PAMAM dendrimerlerini sentezlemişlerdir.



Şekil 2.13. İkinci jenerasyon PAMAM sentezi için genel rota

PPI dendrimerleri

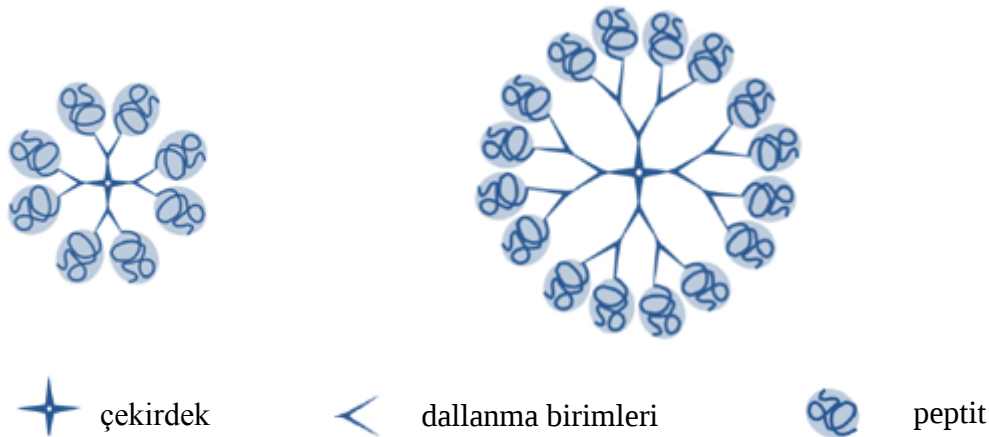
‘Poli(propilen imin)’ olarak bilinen dendrimerler ilk defa *Vögtle* tarafından sentezlenmiştir [19]. Micheal tipi katılma ile aminin akrilonitrile bağlanması, daha sonra nitril gruplarının indirgenerek primer $-NH_2$ gruplarının oluşması sayesinde büyüyen makromolekül ligantları sentezlemiştir.



Şekil 2.14. Bütan-1 ,4-diamin çekirdekli 3. jenerasyon PPI dendrimerinin sentezi

Peptit dendrimeri

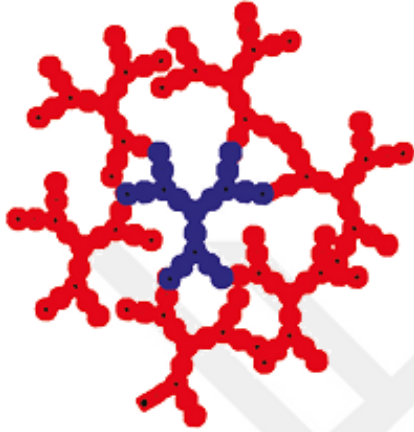
Aminoasitlerden oluşan iki dendrimerin kondenzasyonu sonucu peptit dendrimerlerin sentezi mümkündür. Peptit dendrimerlerinin çekirdeği ve dallanma birimleri amino asitlerden oluşur [37]. Peptid dendrimerler, ilaç salınımında, manyetik rezonans, anjiyografi (MRA), florojenik görüntüleme, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) için kontrast ajan olarak kullanıldığı kaynaklarda görülmektedir.



Şekil 2.15. Farklı boyuttaki peptit dendrimerlerin şematik gösterimi

Tekto dendrimer

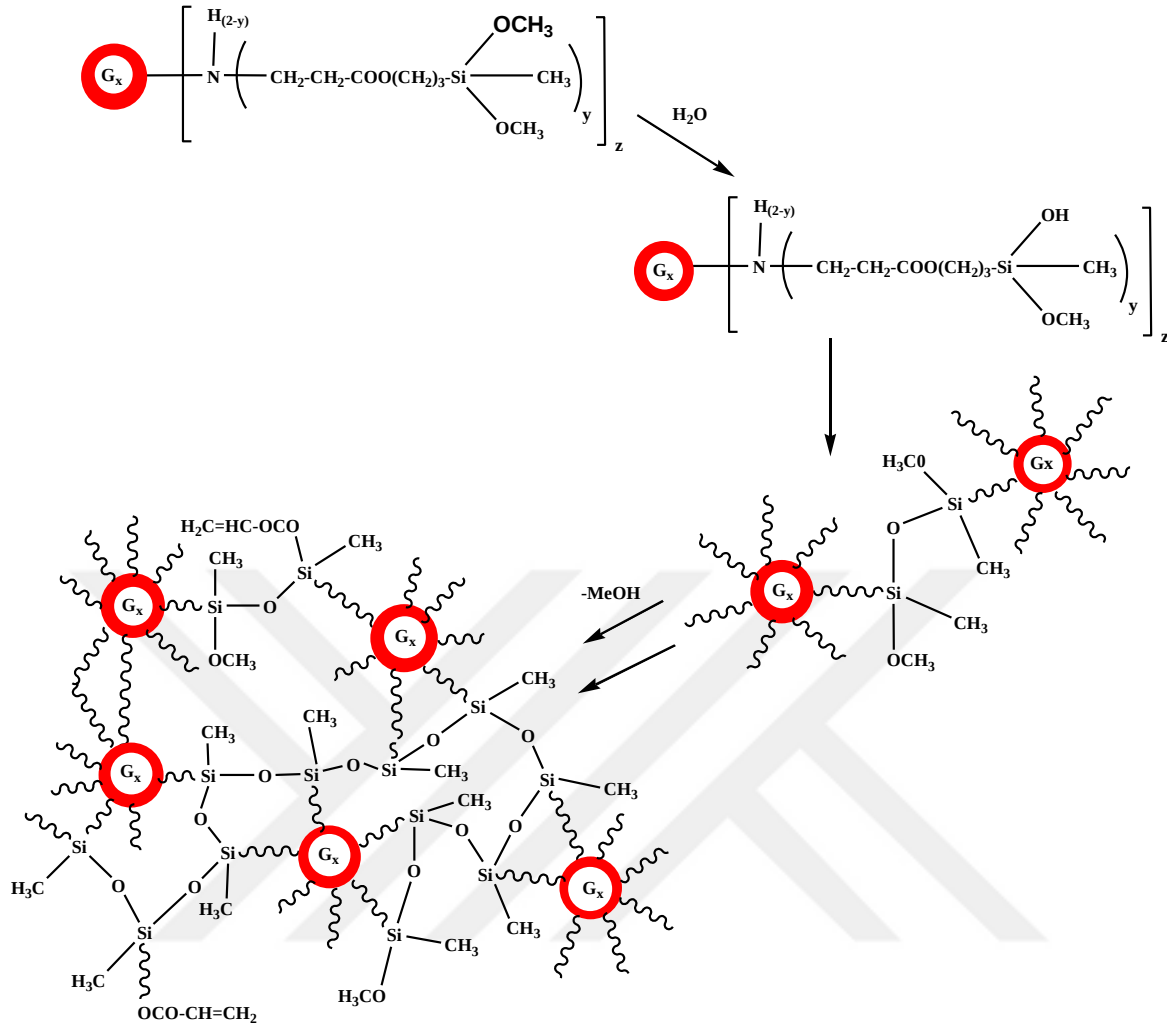
Çoklu ilaç salınımı, hastalıklı hücrenin teşhisi ve tedavisi için umut verici olan tekto dendrimerler, merkezdeki dendrimerin aktif uçlarına birden fazla farklı dendrimerlerin bağlanmasıyla oluşmaktadır.



Şekil 2.16. Tekto dendrimerin şematik gösterimi [38]

Pamamos dendrimerleri

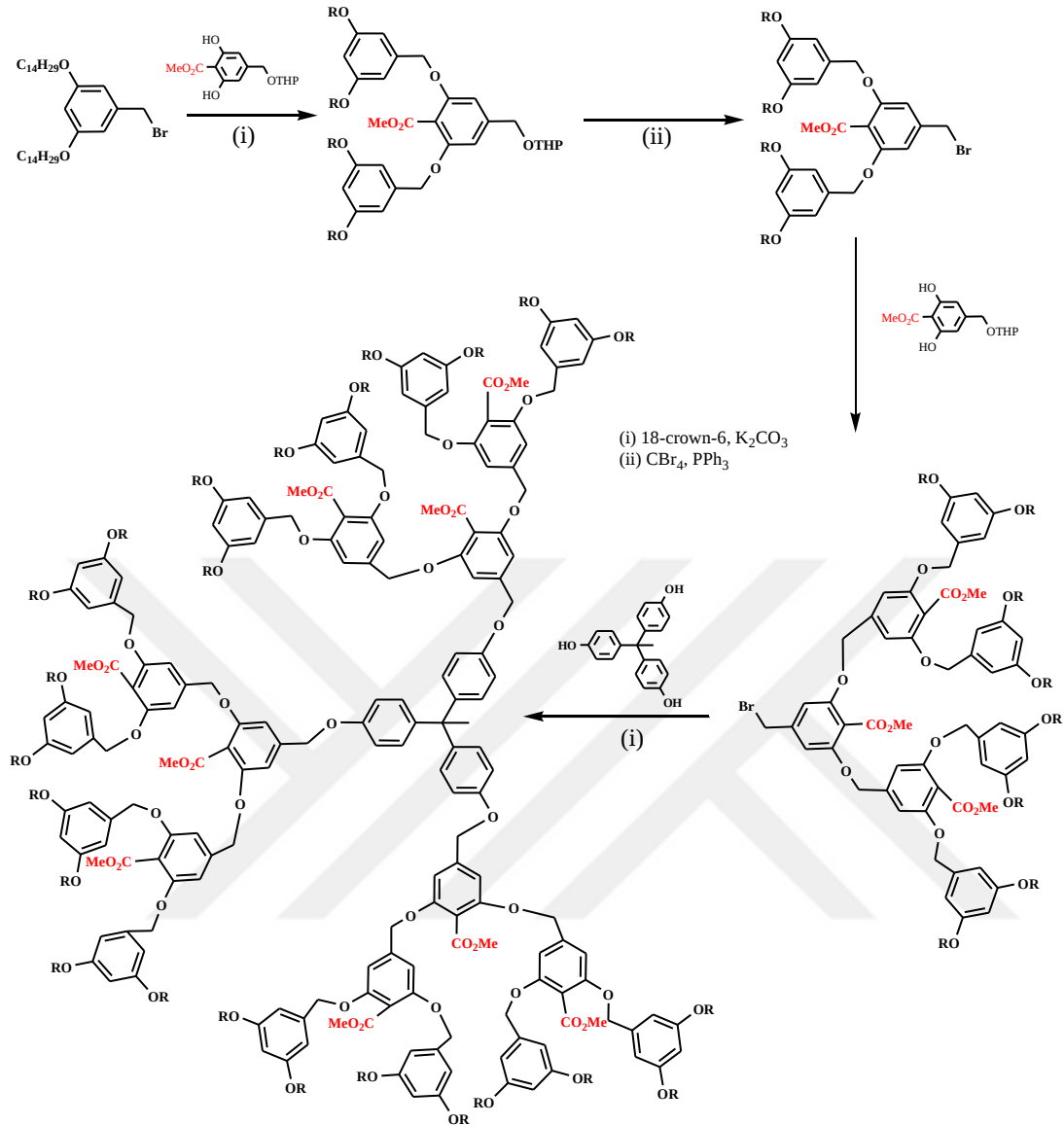
Silisyum içerikli ticari bir dendrimer olan PAMAMOS, *Dvornic ve diğerleri* tarafından 1990'larda Michigan Moleküler Enstitüsü'nde sentezlenmiştir. Diğerlerinden farklı bir özelliğe sahip olan PAMAMOS dendrimerleri hidrofilik ve hidrofobik grupları içermesi nedeniyle önemlidir. Merkezden dışa doğru büyüyen, kopolimerik poli(amidoamin-organosilisyum) (PAMAMOS) dendrimerlerinin iç kısmını hidrofilik poliamidoamin (PAMAM) oluştururken, dış kısmını hidrofobik organosilisyum (OS) oluşturmaktadır [39].



Şekil 2.17. Silisyum içeren PAMAMOS dendrimerinin oluşumu

Fréchet tipi dendrimerler

Poli-benzileter tabanlı olan bu dendrimerler, *Hawker ve Fréchet* tarafından 1990 yılında konverjent metotla geliştirilmiştir [40-42]. Fréchet Tipi dendrimerler de, genellikle yüzey grubu olarak karboksilik asitler kullanılmıştır. Böylece polar çözücülerde hidrofobik özellik gösteren dendrimerin çözünürlüğü arttırılmıştır.

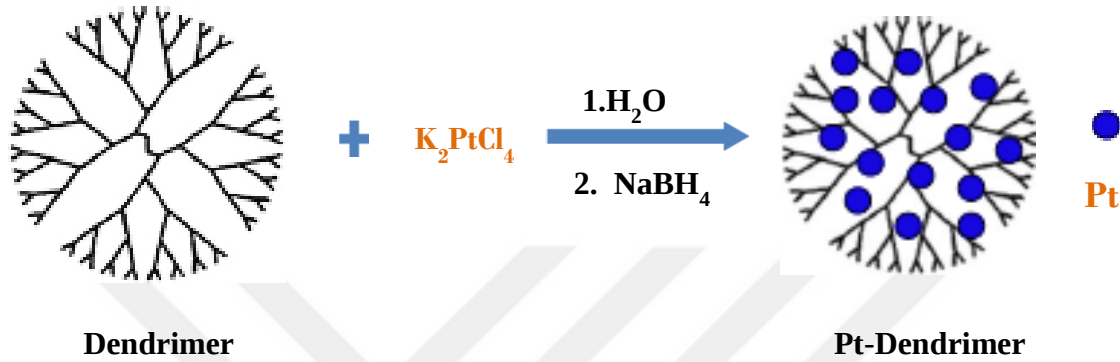


Şekil 2.18. Frechet tipi 3. jenerasyon dendrimer sentezi [43]

2.1.5. Dendrimerlerin uygulamaları

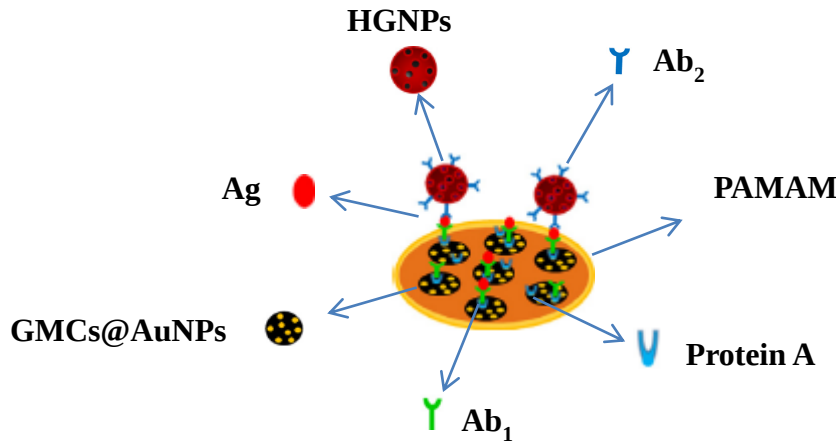
Dendrimerlerin birçok potansiyel alanlara uygulanabileceği çeşitli dergi ve makalelerde belirtilmektedir. Dendrimerlerin etkili bir uygulama alanına sahip olabilmesi için amaca yönelik özelliklere sahip olması gerekir. Dendrimerlerin, sahip olduğu düzenli moleküler yapısı, çok fonksiyonlu yüzeyi ve meydana gelen iç boşlukları sayesinde çeşitli alanlarda uygulanabilmektedir. Örnek olarak, biyomedikal, endüstriyel ve ileri teknoloji alanlarında kullanılmaktadır. Dendrimerlerin uygulamaları üzerine yapılan çalışmaların bir bölümü aşağıda sunulmuştur.

Hidrojen peroksit tayini yapmak için *Deb ve diğerleri*, 4. Jenerasyona sahip PAMAM dendrimerini, K_2PtCl_4 ile etkileştirerek elektrot yüzeyine sodyum-4-striensülfonat aracılığıyla tutturmuşlardır. Hazırlanan bu elektrokataliz kompozit ile hidrojen peroksitin askorbik asit ve asetaminofenin bulunduğu ortamda bile hassas bir şekilde ($50 \mu M$ -8 Mm) tayin edilebileceğini ifade etmişlerdir [44].



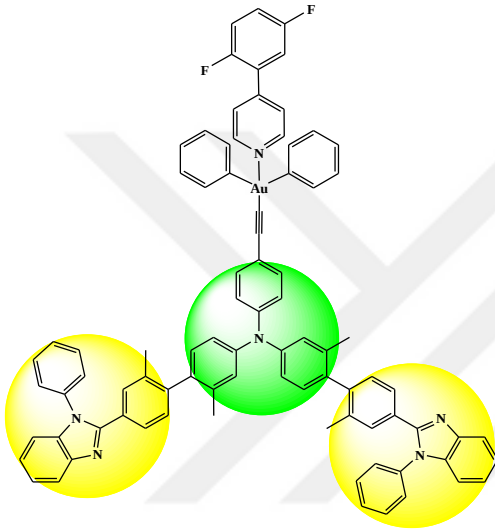
Şekil 2.19. Elektrokataliz için hazırlanan PAMAM dendrimerine Pt(II) iyonlarının yerleştirilmesi

Metisilin'e dirençli *S. aureus* (MRSA) hastanelerde ölümcül enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu nedenle MRSA'nın hızlı tayini, enfeksiyonların kontrol altına alınabilmesi için önemlidir. Klinik teşhislerde MRSA'nın bir geni olan penisiline bağlı protein 2a'dan (PBP2a) faydalanıldığı kaynaklarda bilinmektedir [45]. Bu amaçla *Yang ve diğerleri*, PAMAM dendrimerini ve altın nanoküreleri kullanarak Şekil 2.20.'de verilen PBP2a immünosensörünü hazırladıklarını ifade etmişlerdir [46].



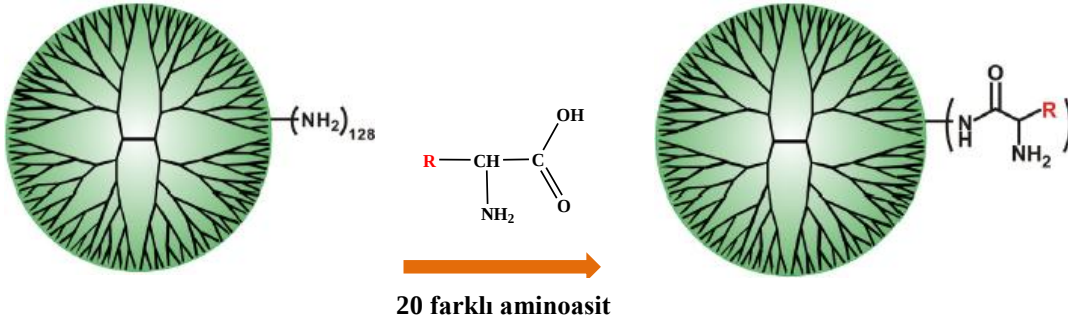
Şekil 2.20. PBP2a immünosensörünün şematik gösterimi

Araştırmacılar, ışın enerjisini absorblayarak daha uzun dalga boylu ışınları yayma özelliği gösteren (fotoluminesans) makromoleküllerin sentezi için değişik stratejiler geliştirmişlerdir. Bu makromoleküller Au(III), Ir(III) gibi geçiş metalleri ile kompleks oluşturarak zengin bir luminesans özelliğe sahip olurlar. *Tang ve diğerleri*, karbazol tabanlı alkinil Au(III) komplekslerini hazırlayarak fotokimyasal özelliklerini incelemişlerdir. Hazırladıkları bu dendrimerin ışık yayan diyot (LED) olarak kullanılabileceğini ifade etmişlerdir [47].



Şekil 2.21. LED olarak kullanılabilecek dendritik yapının dizaynı

Gen salınımı için katyonik dendrimerlerin önemli rol aldığı kaynaklarda belirtilmektedir [48]. Gen salınımında, polimerlerin heterojenlik indeksinin dar, çözünürlük ve kararlılığının iyi olmasına karşın [49] dendrimerlerin performansı kadar etkili olmadığı belirtilmektedir [50]. *Wang ve diğerleri* 20 farklı aminoasiti, beşinci jenerasyon PAMAM dendrimeri ile etkileştirmişlerdir. Böylece hazırlanan dendrimerin, gen transferine ve toksik etkisine aminoasitlerin nasıl bir etki gösterebileceği araştırılmıştır. Dendrimere bağlı olan aminoasitin konjugasyon özellik göstermesi, gen salınımında “sinerjik etkiye” neden olduğu belirtilmiştir [51]. *Wang ve diğerleri* dendrimere bağlı olan histidinin konjugasyon özelliği göstermesi nedeniyle hücre organallerine olan hareketinin daha kolay olduğunu ifade etmişlerdir.



Şekil 2.22. Aminoasit kullanılarak elde edilen dendrimerin şematik gösterimi [51]

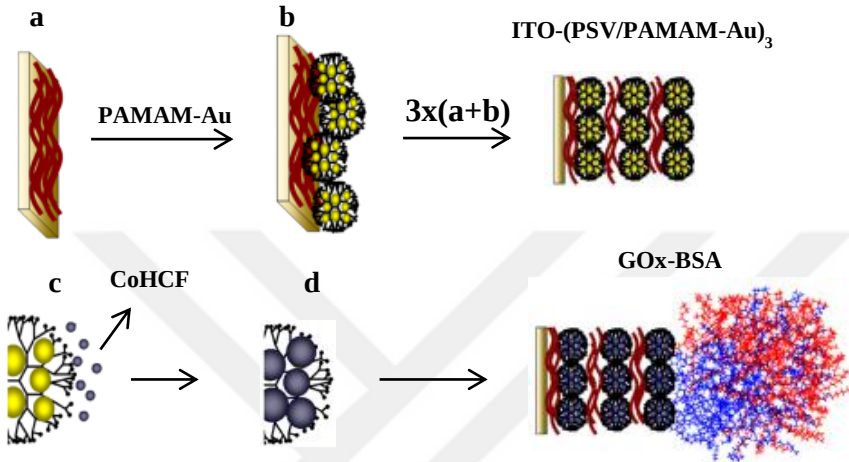
Nieves ve diğerleri, polietilenglikol tabanlı katyonik karbosilan dendrimerlerini hazırlayarak gen terapisinde HIV virüsüne karşı etkili olup olmayacağına yönelik araştırma yapmışlar, kan hücrelerinde bulunan HIV virüsüne karşı iyi etki gösterdiğini gözlemişler, bunun nedenini dendrimerin düşük toksik özelliğine bağlamışlardır [52]. *Kesharwani ve diğerleri*, folik asit (FA), dekstran (polisakkarit) ve galaktoz içeren dendrimerleri hazırlamışlar, bu dendrimerlerin değişik antikanser ilaç salınımınlarını incelemişler, modifiye edilen PPI dendrimerinin daha iyi sonuç verdiğini ifade etmişlerdir [53].

Biyoyakıt hücrelerinin hazırlanmasında, elektron transfer özelliği gösteren enzimlerden faydalanmak son yıllarda önem arz eden araştırmalardan biridir. *Korani ve Salimi*, glukozdehidrogenaz (GDH) enzimi ile biyoanot, bilirubin oksidaz (BOX) enzimi ile biyokatot oluşturarak bir biyoyakıt hücresi hazırlamışlardır. Bu çalışmalarında çok duvarlı amin içeren karbon nanotüpü (MWCNTs-NH₂) karboksille sonlandırılmış PAMAM dendrimerleri ile etkileştirdikten sonra GDH enzimini immobilize etmişler böylece hücrenin biyoanotunu oluşturmuşlardır. Biyokatot için ise çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNTs) yüzeyine BOX enzimini immobilize etmişlerdir (Şekil 2.23.) [54].



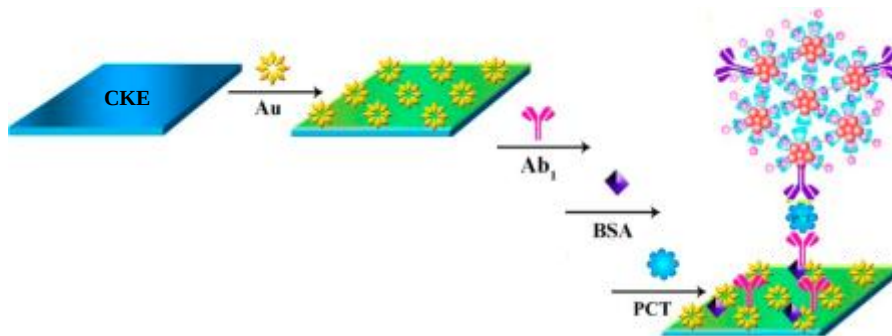
Şekil 2.23. Biyoanot ve biyokatot yüzeylerinin hazırlanmasının şematik görüntüsü

Crespilho ve diğerleri, nanoyapılı elektrokatalitik membran üretmek için PAMAM dendrimerinden faydalanmışlardır. Bunun için, tabaka-tabaka adı verilen tekniği kullanarak PAMAM dendrimerler ile poli(vinilsülfonik asit) katmanlarını oluşturmuşlardır. Enzimin immobilize edilebilmesi için çapraz bağlayıcı olarak sığır serum albümini ve glutaraldehitten faydalanmışlardır [55].



Şekil 2.24. GOx enziminin immobilizasyonunda kullanılan membranın hazırlanışının şematik gösterimi [55]

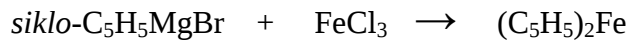
Kana bakteri ya da toksin karışması sonucu “kan zehirlenmesi” oluşur. Kanda bulunan “prokalsitonin”in (PCT) belirlenebilmesi için *Shen ve diğerleri*, PAMAM dendrimerini N,N-bis(ferrosenil)diaminoetan ile tepkimeye sokarak enzimsiz imünosensör tasarlamışlardır. Camsı karbon elektrot yüzeyine hazırlanan bu iminosensörün düşük tayin sınır aralığına ($3,72 \times 10^{-3}$ ng/mL) ve yüksek duyarlılığa sahip olduğunu ifade etmişlerdir [56].



Şekil 2.25. Enzimsiz imünosensörün tasarımı (camsı karbon elektrot (CKE), birincil monoklonal antikorlar (Ab₁), sığır serum albumini (BSA) prokalsitonin (PCT))

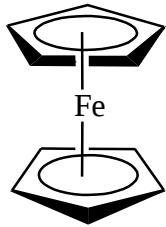
2.2. Ferrosenler

Organometaller kimyası, 1827 yılından Zeise tuzunun ilk keşfiyle başlamıştır. *Kealy ve Pauson*, 1951'de siklopentadienil bromürden yola çıkarak fulvaleni sentezlemeyi hedeflemişlerdir. Bu amaçla araştırmacılar, susuz dietileter ortamında FeCl_3 tuzu ile *siklo*- $\text{C}_5\text{H}_5\text{MgBr}$ reaktifini tepkimeye sokmuşlardır. Bu tepkimede fulvalen yerine formülü $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{Fe}$ olan turuncu renkli, kararlı, havada bozunmadan süblimleşen, katalitik hidrojenlenmeye karşı dayanıklı olan bir katı elde edilmiştir [57].



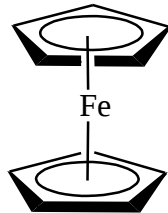
ferrosen

Ürünün yapısı, 1956 yılında x-ışınları kırınım yöntemi ile belirlenmiştir. Ferrosenin, birbirine paralel C_5H_5 halkaları arasında bir demir atomunun bulunduğu ve yapının bir sandviçe benzediğini ifade etmişlerdir. Ferrosenin iki izomeri mevcuttur. Bunlardan biri, halkaların çapraz biçimde (D_{5d}) olduğu, diğeri ise halkaların çakışık (D_{5h}) veya çakışığa çok yakın olduğu yapılardır (Şekil 2.26.) [57].



D_{5d}

Çapraz halkalar



D_{5h}

Çakışık halkalar

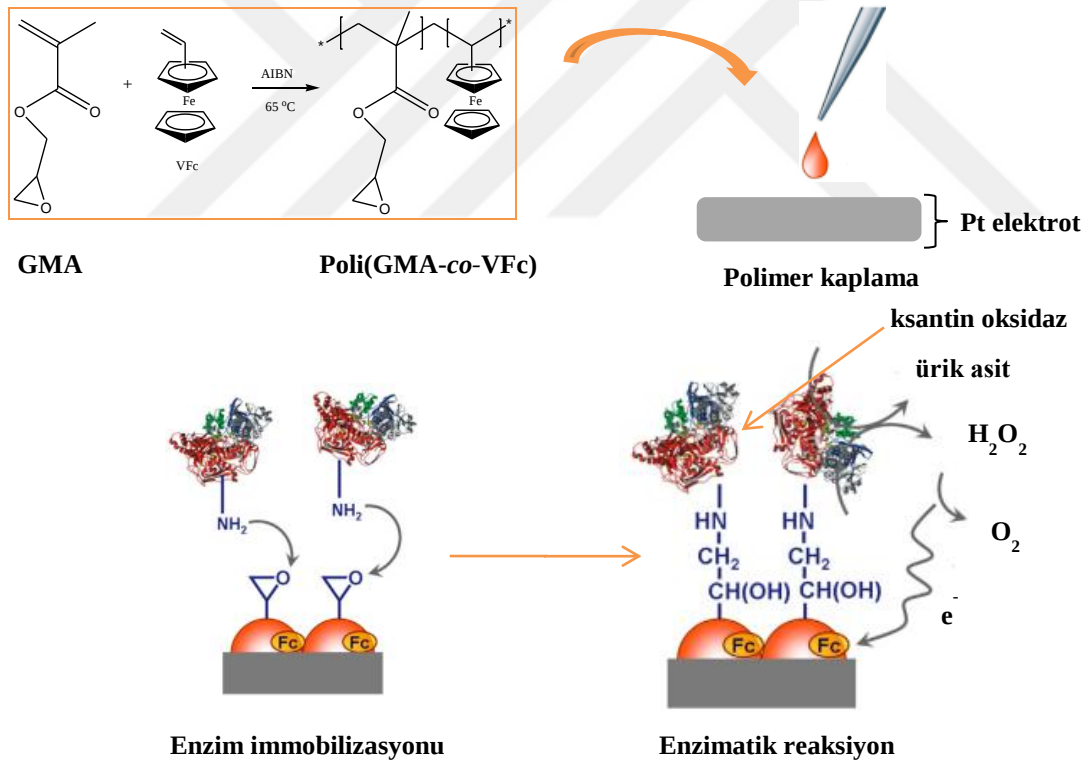
Şekil 2.26. Ferrosenin iki farklı yapısı

Ferrosen, sahip olduğu siklopentadienil halkaları sayesinde aromatik bir bileşiktir, ayrıca Fe(II) iyonlarından aldığı elektron desteği ile benzen halkasına göre elektronca daha zengindir ve bu da ona aromatik katılma tepkimelerine kolayca girmesini sağlamaktadır. Ferrosen bileşikler genelde kırmızı ve turuncumsu bir renkte olup iğne şeklinde kristallere sahiptir. Erime noktası $173\text{-}174\text{ }^\circ\text{C}$, kaynama noktası $249\text{ }^\circ\text{C}$ 'dır. Suda çözünmeyip fakat birçok organik çözücünde kolaylıkla çözünmektedir. Ferrosen bileşiklerinin hem organik

hem de anorganik özelliklerinin olması, yüksek termal kararlılıkları, organik çözücülerde iyi çözünmeleri, kolay sentezlenmeleri, tersinir redoks özellikleri, demir merkezinden dolayı kimyasal ve elektrokimyasal olarak incelenebilmesi gibi özellikleri bakımından bu bileşiğe olan ilgi artmıştır [58].

1956 yılından günümüze kadar ferrosen içeren makromoleküllerin sentezi ve uygulamaları üzerine yapılan seçilmiş araştırmaların özeti aşağıda sunulmuştur.

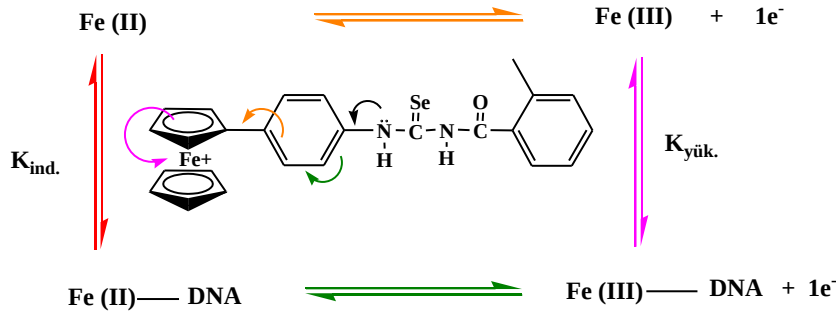
α,α -Azobisisobutironitril (AIBN, 98%) ortamında, vinilferrosen(VFc) ile glisidilmetakrilat (GMA) dan faydalanarak, Poli (glisidil metakrilat-ko-vinilferrosen)i sentezleyen *Baş ve diğerleri*, bu kopolimerin üzerine ksantin oksidaz enzimini immobilize etmişlerdir (Şekil 2.27.) [59].



Şekil 2.27. GMA'nın kopolimerleşmesi ve immobilizasyon şeması

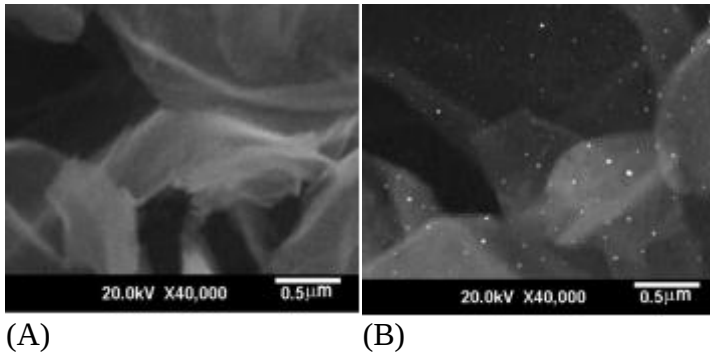
1937 yılında Douglass'ın [60] selenoüreyi sentezlemesinden sonra biyolojik uygulamalarda kullanılması nedeniyle, bu bileşiğin çeşitli türevleri sentezlenmiş, DNA bağlama ve antioksidan çalışmaları yapılmıştır. *Hussain ve diğerleri* selenoüreyi ferrosen ile türevlendirerek 1-(2-metilbenzoi)-3-(3-ferrosenilfenil)selenoüre molekülünü

sentezlemişlerdir. Ferrosenin indirgenme-yükseltgenme özelliğinden faydalanarak kanser hücrelerindeki DNA'ya bağlanma özelliğini dönüşümlü voltametri ile incelemişler ve aşağıdaki gibi bir mekanizmanın mümkün olabileceğini ifade etmişlerdir (Şekil 2.28.) [61].



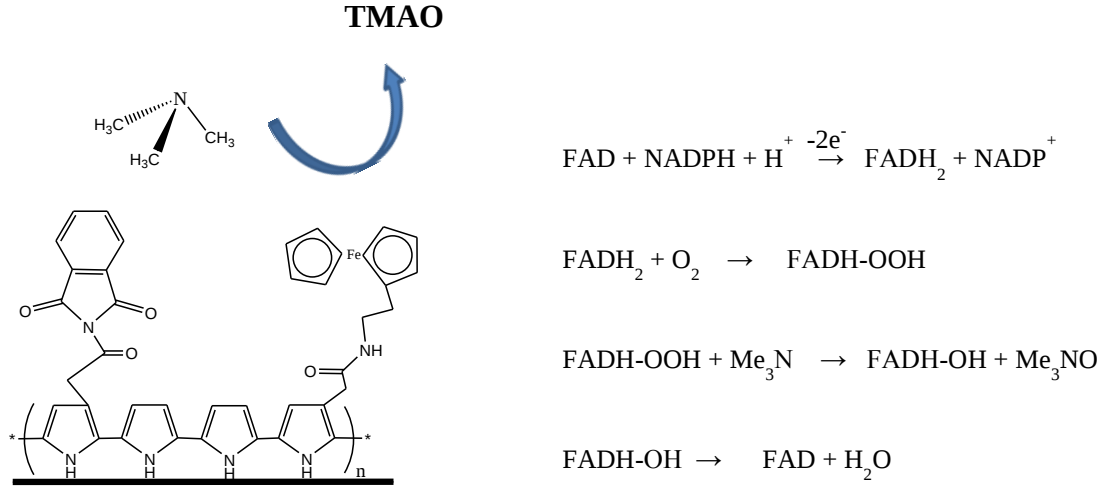
Şekil 2.28. 1-(2-metilbenzoil)-3-(3-ferrosenilfenil)selenoüre'nin indirgenme-yükseltgenme mekanizması

Deng ve diğerleri, indirgenmiş grafen oksit ile ferrosen arasında meydana gelen π - π etkileşiminden faydalanarak bir hibrit hazırlamışlardır. Bu hibritin, FT-IR, Raman Spektroskopisi ve Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile karakterizasyonunu yaptıktan sonra, bir elektrod yüzeyi hazırlamışlar, üzerine kolin oksidaz enzimini (ChOx) immobilize etmişler ve bunu H₂O₂ ve kolin tayininde kullanmışlardır [62].



Resim 2.1. (A) indirgenmiş grafen oksit (B) ferrosen katkılı indirgenmiş grafen oksitin SEM görüntüleri

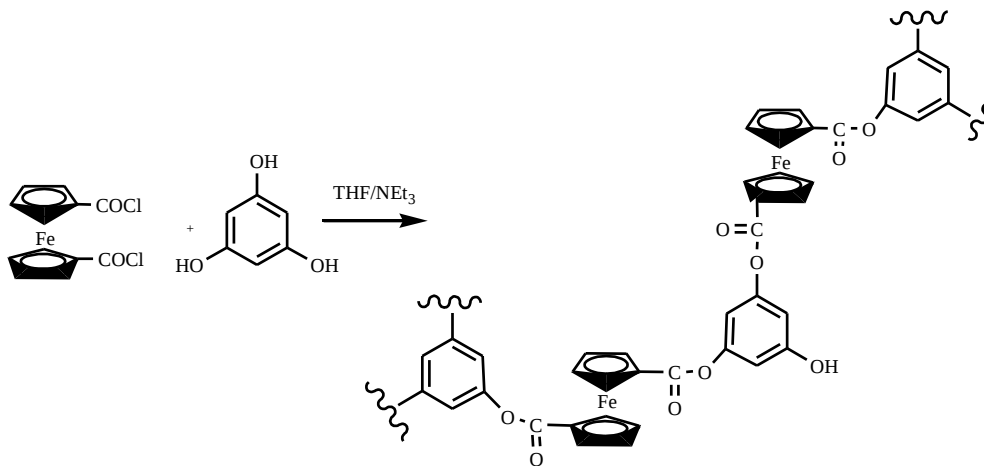
Balıkta bozunmanın olup olmadığının belirlenebilmesinde trimetilamin (TMA) tayini yapılır. *Bourigua ve diğerleri* trimetilamin tayini için biyosensör geliştirirken polipirol ve ferrosenden faydalanmışlardır.



Şekil 2.29. Poliprol temelli biyosensörün yapısı ve enzim merkezinde gerçekleşen kimyasal reaksiyon

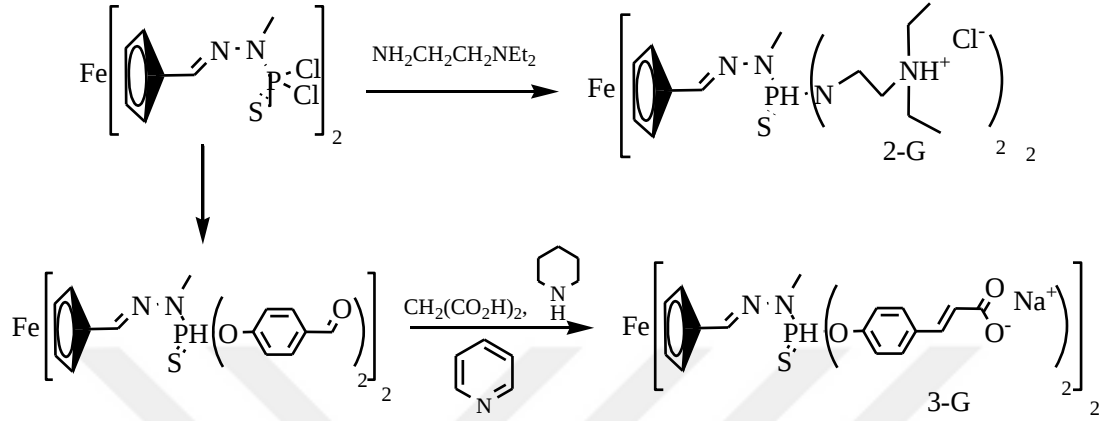
Sadece deniz balıklarında bulunan trimetilamin oksit (TMAO), bakterilerin etkisi ile TMA'ya dönüşür. Balığın bayatlığı arttıkça TMA miktarı artar. Araştırmacılar, TMA tayini için ferrosenil grubunun redoks özelliğinden faydalanmış, aşağıda oluşan mekanizmalar üzerinden TMA'nın yükseltgenerek TMAO'ya dönüştüğünü belirtmişlerdir [63].

Libo Deng ve diğerleri Şekil 2.30.'da verilen hiperdallanmış floroglusinol-ferrosen içerikli bir polimer (FBHP) hazırlayarak bazı anyonlara olan seçiciliğini voltametrik olarak belirlemişlerdir. Hazırlanan bu ferrosenil dendrimerin, yeni bir redoks dalgasına sahip olması nedeniyle $\text{H}_2\text{PO}_4^{4-}$ gibi anyonlara karşı seçici olabileceğini belirtmişlerdir [64].



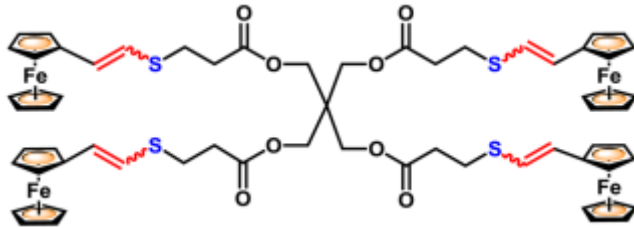
Şekil 2.30. Floroglusinol-ferrosen içerikli bir polimerin (FBHP) sentez rotası

De Jong ve diğerleri suda çözünen ferrosen takılı fosfor dendrimerlerini sentezlenmişlerdir. Bu dendrimerleri amonyum ve karboksilat gurpları ile sonlandırarak suda çözünürlüğünün mümkün olabileceğini ifade etmişlerdir [65].



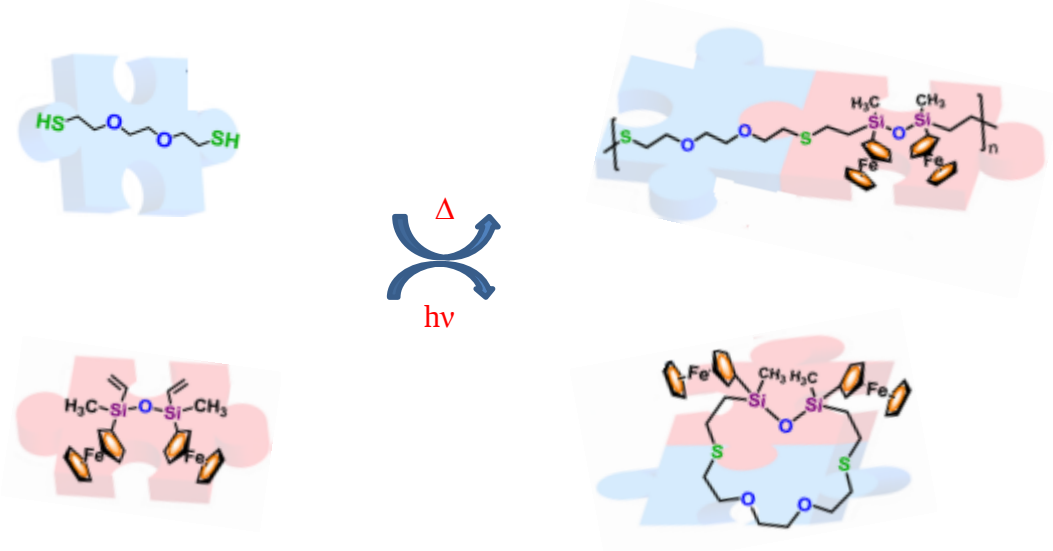
Şekil 2.31. Ferrosen çekirdekli suda-çözünebilen dendrimerlerin sentez rotası

Enriquez ve diğerleri, yeni bir yaklaşım olan klik (çıtçıt) reaksiyonu ile tetrakis(ferrosenil–vinil sülfid) ürünün metalik Au veya Pt yüzeyine kemisorpsiyon yoluyla tutunmasını sağlamışlardır [66].



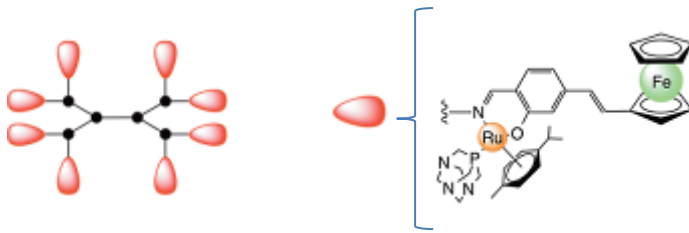
Şekil 2.32. Tetrakis(ferrosenil–vinil sülfid) in yapısı

Buna benzer bir çalışma *Bruno ve diğerleri* tarafından yapılmış, silisyum içerikli taç eterin, vinilferrosen ile olan klik reaksiyonu sonucunda oluşan ürünün elektrokimyasal özelliğini incelemişlerdir [67].



Şekil 2.33. Tiyol-vinilsilan reaksiyonunun şematik gösterimi

Platin tabanlı antikanser ilaçların yan etkilerinden dolayı, daha az toksit etki gösteren rutenyum tabanlı ilaç tasarımları üzerine çalışmaların yaygınlaştığı görülmektedir. Ayrıca kanser tedavisine yönelik ilaç tasarımı yapılırken, ikinci bir metal grubunun (özellikle ferrosen) yapıda bulunmasının, tedaviye olumlu katkı verdiği araştırmalar sonucunda görülmüştür [68]. Böyle bir araştırmayı değerlendiren *Govender ve diğerleri*, rutenyum ve ferrosen içeren heterometalik kompleksini hazırlayıp karakterize ettikten sonra DAB-G1-PPI-(NH₂)₄ dendrimeri ile etkileştirmişlerdir (Şekil 2.34.). Yumurtalık kanseri (A2780 ve A2780cisR), rahim ağzı kanseri (SISO), akciğer kanseri (LCLC-103H) ve mesane kanseri (5637) gibi kanser türlerine olan etkilerini araştırmışlardır. Buna göre, yumurtalık kanser hücrelerinin (A2780 ve A2780cisR) çoğalmasını engellediğini belirtmişlerdir [69].



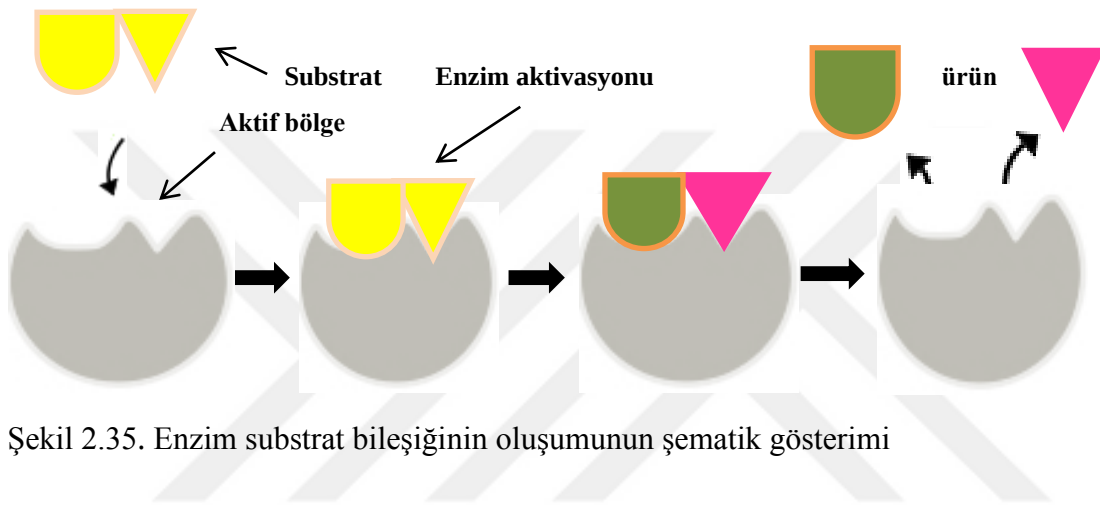
Şekil 2.34. DAB-G1-PPI-(NH₂)₄ dendrimerine bağlı rutenyum ve ferrosen içerikli yapı

2.3. Enzim İmmobilizasyonu

Hücredeki kimyasal reaksiyonları katalizleyen ve protein yapısında olan enzimler, çeşitli amaçlarda kullanılmak üzere hem sağlık hem de endüstri alanında kullanılmaktadırlar [70].

Enzimler, spesifik kimyasal reaksiyonları hızlandıran, sulu çözeltilerde optimum pH ve sıcaklıkta aktivite gösteren katalizörlerdir.

Enzimlerin etki ettiği moleküllere substrat adı verilir. Enzim ve substrat arasında anahtar-kilit (yüzey-kalıp) ilişkisi vardır. Enzim substratına geçici olarak aktif bölgeden bağlanır. Böylece enzim-substrat bileşiği (ES) oluşur. Şekil 2.35.'de substratın enzimle ürüne dönüşümünün şematik gösterimi verilmektedir.



Şekil 2.35. Enzim substrat bileşiğinin oluşumunun şematik gösterimi

Enzimler kimya, biyoteknoloji ve besin endüstri gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Kullanılan enzimlerin pahalı olması ve ürün elde edildikten sonra ekonomik olarak geri kazanılmaması maliyeti yükseltmektedir. Bu nedenle enzimlerin ekonomik açıdan kullanılabilirliğini sağlamak için immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir.

İmmobilizasyonun kelime anlamı, “tutuklanmış, hareketi sınırlandırılmış” demektir. İmmobilizasyon, enzimlerin ya da mikroorganizmaların fiziksel ve/veya kimyasal yöntemlerle katalitik aktifliğini koruyarak, tekrar ve sürekli kullanımını sağlamak amacıyla organik veya inorganik taşıyıcılara tutulmasıdır [71]. Bir taşıyıcıya bağlanan enzimin dayanıklılığı arttırdığı gibi tepkime ortamından ayrılması da kolaylaşacaktır. Bu nedenle enzimlerin immobilizasyonu endüstri ve sağlık alanında önemli bir yer tutmaktadır. İmmobilizasyondan sonra enzimin aktivitesi, optimum pH’sı ve sıcaklığı, substrata ilgisi ve kararlılığı değişmektedir. Genellikle enzimin aktivitesi ve substrata ilgisi immobilizasyondan olumsuz etkilenirken, optimum sıcaklığı ve kararlılığı olumlu etkilenmektedir. Enzimdeki bu değişiklikler enzimin yapısına, taşıyıcının tipine, immobilizasyon yöntemine ve şartlarına göre değişmektedir [72].

2.3.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri

Enzim immobilizasyon işlemi genel olarak aşağıda verilen yöntemlerle yapılmaktadır:

1. Organik veya anorganik desteklere adsorpsiyon, kovalent yada iyonik bağlanma,
2. Organik veya anorganik desteklere çapraz bağlanması,
3. Jel matrisler veya yarı geçirgen mikrokapsüller içinde tutulma (hapsetme) [73].

Adsorpsiyon, kovalent ve iyonik bağlanma ile olan immobilizasyonda, enzimin yapısı önemlidir. Enzimin yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler immobilizasyonda önemli bir rol oynar. Jel matris veya yarı geçirgen mikrokapsüller içine tutulan enzimin hareketi kısıtlıdır. Taşıyıcı rol oynayan matrisin ve membranın, hem substratın hem de ürünün hareketine engel olmaması istenir [74].

Adsorpsiyon yöntemi

Enzimin suda çözünmeyen bir taşıyıcı yüzeyine fiziksel olarak adsorpsiyonuna dayanmaktadır. Enzim ile taşıyıcı arasında tersinir bir yüzey etkileşimi gerçekleşmektedir. Fiziksel adsorpsiyon, basit ve uygun taşıyıcı kullanıldığında ucuz bir immobilizasyon yöntemidir. Bu yöntemde non-kovalent etkileşimler önemlidir. Bu yöntem ilk olarak beta-D-frukto-furanosidaz enziminin alüminyum hidroksit üzerine immobilizasyonunda kullanılmıştır [75, 76].



Şekil 2.36. Enzimin desteğe adsorpsiyonu

Kovalent bağlanma

Enzimin suda çözünmeyen bir taşıyıcıya kovalent olarak bağlanmasına dayanmaktadır. Genellikle bağlanma, enzimin nükleofilik grubuyla taşıyıcının fonksiyonel grubu arasında gerçekleşmektedir. Bağlanmada rol alan fonksiyonel gruplar genellikle, amin (NH_2),

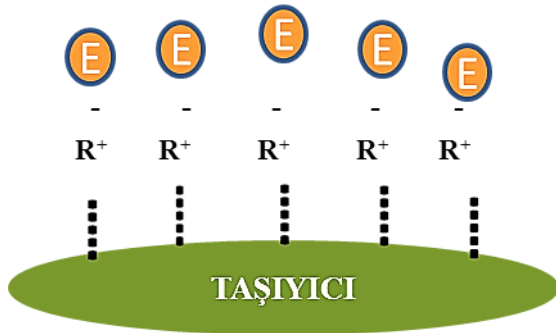
karboksil (CO_2H), sülfhidril (SH^-), hidroksil (OH) gruplarıdır, ayrıca fenolik, tiyol, treonin ve indol grupları da bağlanmada rol oynamaktadır [77,78].



Şekil 2.37. Enzimin desteğe kovalent bağlanması

İyonik bağlanma

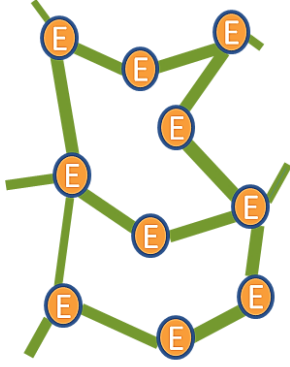
Enzimin suda çözünmeyen, iyon değiştirici grupları içeren bir taşıyıcıya iyonik olarak bağlanması esasına dayanır. Bu yöntemin uygulanması kolaydır, taşıyıcısı yenilenebilir ve enzim yapısı korunabilir. Bu nedenle iyonik bağlanma önemli bir avantaja sahiptir. Bu yöntemde kullanılan başlıca taşıyıcılar, organik (selüloz, dekstran), anorganik (silika) destek maddeler ve iyon değiştirici reçinelerdir [79].



Şekil 2.38. Enzimin desteğe iyonik olarak bağlanması

Çapraz bağlanma

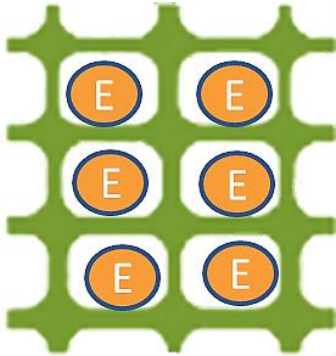
İki ya da çok fonksiyonlu reaktifler aracılığıyla enzim veya aktif moleküller arasındaki kovalent bağ oluşumuna dayanmaktadır [80,81]. Enzim kaybını önleyen çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehit, klorformat ve karbonilimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsülfonlar, p-benzokinon, geçiş metal iyonları ve epiklorohidrinlerdir [82-84].



Şekil 2.39. Enzimin desteğe çapraz bağlanması

Matriks (kafes) içine hapsetme

Polimerizasyonun gerçekleştiği ortamda, çapraz bağlı taşıyıcılara tutulan enzimin hapsedilmesi esasına dayanır. Böylece enzimin kaçışı engellenmiş olur. Hapsetme yöntemi ile, enzimin organik, asidik yada bazik özelliğe sahip, iyonik şiddeti yüksek olan çözücülerde dayanıklı olması sağlanır. Jel hapsetme yönteminde en yaygın olarak kullanılan matriksler poliakrilamit, polivinil alkol ve silika jellerdir [85].

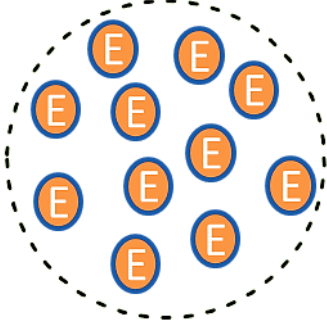


Şekil 2.40. Enzimin matriks (kafes) içine hapsedilmesi

Mikrokapsül içine hapsetme

Enzimin yarı geçirgen polimer membran içerisinde tutuklanmasıdır. Bu yöntem, substrat ve enzimin bir arada bulunmasına geniş bir alan sağlamaktadır. Bu nedenle sadece tek tür enzimin değil farklı türdeki enzimlerin de hapsedilmesi mümkündür. Ancak bu metot, yüksek molekül ağırlıklı substratlara uygulanmadığı gibi, enzimin inaktive eden bazı

durumlarda da uygulanmaz. Enzimin membran duvarına yapışması veya mikrokapsül içinden akması bir dezavantajdır [86].



Şekil 2.41. Enzimin yarı geçirgen mikrokapsüller içinde tutulması (hapsetme)

2.3.2. İmmobilizasyon işleminde kullanılan destek materyaller

Enzim immobilizasyonunda çeşitli destek materyaller kullanılmaktadır. Bunlar jel matriks, membran formunda polimerik veya inorganik katı, partikül veya mikroküre formunda bulunan materyallerdir [87]. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak olan taşıyıcıda aranan özellikler; hidrofilik karakter, suda çözünmeme, gözenekli yapı, mekanik kararlılık ve uygun gözenek büyüklüğü, kimyasal ve termal kararlılık, mikroorganizmalara karşı dirençlilik, ucuzluk, rejenere olabilme, zehirsizlik, kovalent bağlamada kullanılacak olan taşıyıcılar ılımlı koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplar taşıma şeklinde sıralanabilir [88].

Destek olarak kullanılan doğal polimerler

Aljinat, mannuronik ve guluronik asit birimlerinden meydana gelen doğal bir polimerdir. Kolay ulaşılabilir oluşu ve düşük maliyeti nedeniyle immobilizasyon matriksi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca aljinatın enzimlere inert ve sulu bir ortam sağlaması, geniş gözenekleri sayesinde moleküllerin hızlı difüzyonuna izin vermesi nedeniyle tercih edilen bir enzim immobilizasyon destek materyalidir [89].

Çitin ile çitosan gibi doğal polimerler immobilizasyon işlemi için destek materyali olarak kullanılmaktadır [90,91]. Enzimin, protein ya da karbohidrat kısımları çitosana bağlanır [92]. Çitosanın amin ve hidroksil gruplarını bulundurması nedeniyle enzim

tutuklanmasının daha güvenilir olduğu kanıtlanmıştır. Ancak kemik diş ve deride görülen, doğal bir polimer olan kollajene, enzim immobilizasyonu yapılırken çapraz bağlayıcı ajanların kullanılmasıyla daha güvenilir olduğu belirtilmiştir [93].

Selüloz, penisilin G açılaz, fungal lakkaz, glikoamilaz, α -amilaz, tirosinaz, lipaz ve β -galaktosidaz enzimlerinin immobilize edildiği doğal bir polimerdir. Dietilaminoetil(DEAE)-modifiye selülozik destekler uzun depolama kapasitesine sahiptirler [94].

Destek olarak kullanılan sentetik polimerler

Sentetik polimerlerin, çözünmez olup gözenekli yüzeye sahip olması enzim tutuklanmasında önemlidir. Örneğin, ‘Amberlit’ sentetik bir polimer olup geniş yüzey alanına sahip dayanıklı bir matristir. Ayrıca toksik olmayan, ucuz ve sentetik polivinil alkol (PVA) enzim immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır [95].

Destek olarak kullanılan inorganik materyaller

Zeolitler yada "moleküler elekler" olarak tanımlanmış mikro gözenekli katılardır. Çoğunlukla molekül adsorpsiyonunda kullanılır. Zeolitler, heterojen bir yüzeye sahip olmasından dolayı birden fazla adsorpsiyon bölgelerini içerirler. Bu yüzden enzim immobilizasyonu için oldukça uygundurlar [96].

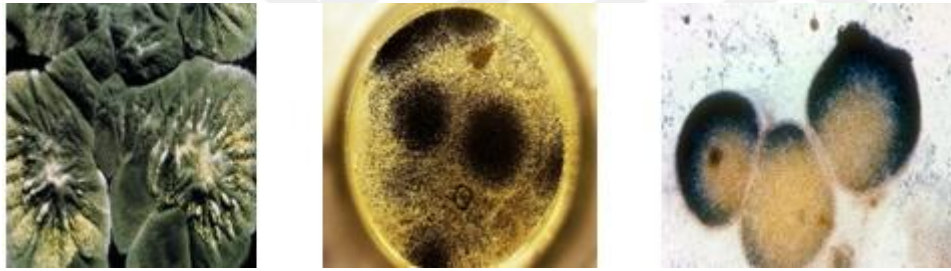
Hem makro hemde mikro gözeneklere sahip olan seramik yapılı destek materyaller enzimin difüze olmasını engellediği gibi spesifik yüzey alanı büyük olduğu için immobilizasyonun etkili olduğu ifade edilmektedir [97].

Nano boyutlu ve geniş yüzey alanına sahip silikaların kimyasal ve mekanik kuvvetlere dayanıklı olması nedeniyle enzim immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Deterjanların temizleme performansını geliştirmek için kullanılan α -amilazın, silika nanopatiküller üzerine immobilizasyonu, endüstriyel uygulama alanı için önemli materyaller arasındadır [98].

Gerek doğal karbon, gerekse hidroklorik asit ile aktif hale gelmiş karbon geniş gözeneklere sahip olduğu için enzim immobilizasyonu için iyi bir destek materyalidir. Özellikle aktif karbonun geniş yüzey alanı ($600-1,000 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) ve gözenek hacminin genişliği ($300-1,000 \text{ Å}$) enzim immobilizasyonu için caziptir [99]. Aktif karbon parçacıkları, asidik proteaz ve asidik lipaz enzimlerini immobilize etmek için bir destek olarak kullanılmıştır. Enzimlerin yirmi tekrardan sonra dahi katalitik etkinliğini önemli ölçüde koruduğu görülmüştür [100,101].

2.4. Glukoz Oksidaz Enzimi (GOx)

Glukoz oksidaz (GOx) *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces flavus* ve *Phanerochaete* gibi maya ve küflerden elde edilen, molekül ağırlıkları 147-180 kDa arasında olan bir enzimdir. Optimum pH'sı 5,0-6,5, optimum sıcaklığı ise 40-50 °C arasındadır [102].

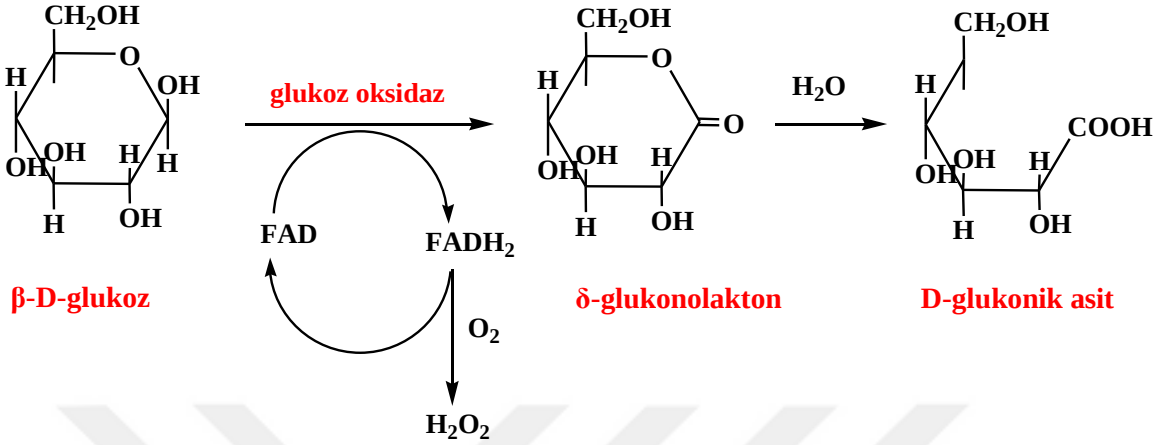


Şekil 2.42. *Aspergillus* (A), *Penicillium* (B) ve *Talaromyces flavus* (C) küfleri

1904 yılında Maksimov tarafından, glukoz oksidaz (GOx) enziminin aktivitesi *Aspergillus Niger*'de saptanmıştır. Enzimin yükseltgeyici (oksidatif) etkisi olduğunu belirleyen Müller, saflaştırılan enzimin sahip olduğu sarı rengin, bünyesindeki prostetik gruptan (flavin adenin dinükleotid, FAD) kaynaklandığını öne sürmüştür. Keilin ve Hartree oksidasyonun FAD tarafından gerçekleştirildiğini; enzimin açığa çıkardığı H_2O_2 ile antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir [103].

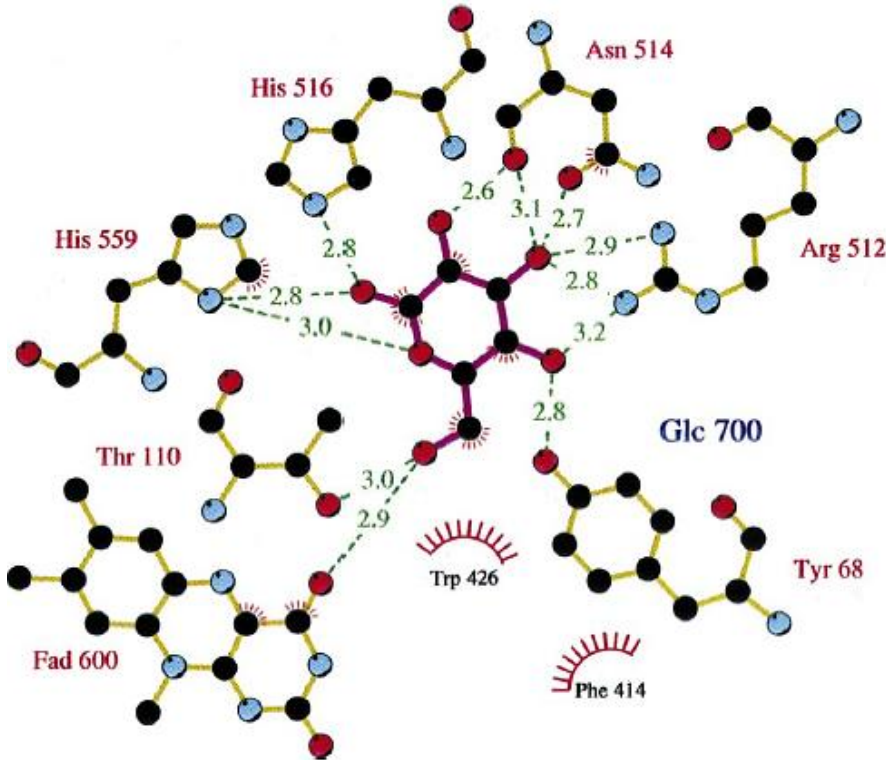
GOx, substratı olan glukozu karşı oldukça spesifikler. Her bir GOx alt ünitesi kofaktör olarak, kovalent olarak bağlı olmayan ve gevşek bir biçimde yapıda bulunan bir mol flavin adenin dinükleotid (FAD) içermektedir [104]. Glukoz oksidaz bir katalizör olarak işlev görebilmesi için sahip olduğu flavin adenin dinükleotid (FAD) koenzimine ihtiyacı duyar. Glukoz oksidaz tarafından katalizlenen indirgeme reaksiyonlarında FAD elektron alıcısı

olarak görev alır ve FADH_2 'ye indirgenir. Daha sonra FADH_2 , moleküler oksijen tarafından tekrar FAD 'a yükseltgenir, böylece oksijen hidrojen peroksitine indirgenir.



Şekil 2.43. β -D-glukozun yükseltgenme mekanizması

GOx'ın aktif bölgesinin Tyr-68, Phe-414, Trp-426, Arg-512, Asn-514, His-516 ve His-559 aminoasitlerden oluştuğu öngörülmüştür [105].



Şekil 2.44. GOx'ın monomerindeki aktif rol oynayan aminoasit kalıntıları [106]

Glukoz oksidaz, glukoz tayininde analitik reaktif olarak, özellikle enzim elektrot uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu elektrotlar, son yıllarda oldukça artış gösteren diyabet hastalığının en önemli tanı materyalidir Bunun yanı sıra içeceklerde ve diğer bazı gıdasal ürünlerde glukoz tayini, glukoz enzim elektrotları kullanılarak yapılmaktadır [107].

2.5. Asetilkolinesteraz Enzimi (AChE)

Elektrik balığından (*torpedo marmoneta*) ekstraksiyon yoluyla saflaştırılan asetilkolinesteraz (AChE), özellikle sinir ve kas dokusunda bulunan bir enzimdir. AChE, kütlesi 70-80 kDa aralığında olan bir glikoproteindir [108].

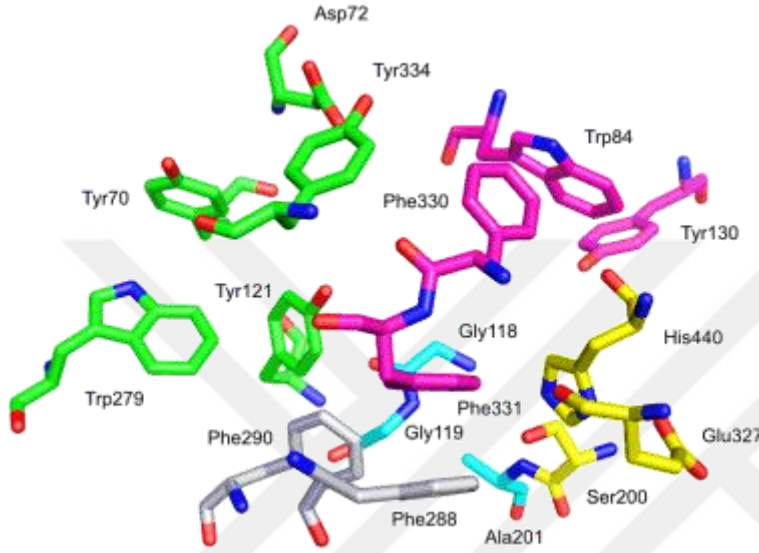


Şekil 2.45. AChE enziminin üç boyutlu yapısı

Asetilkolinesteraz'ın periferik ve aktif bölge olmak üzere iki bağlanma bölgesi vardır [109]. Bu bölgelerde bulunan aminoasit kalıntıları Tyr70, Tyr334, Tyr121, Tyr130, Trp279, Trp84, Phe288, Phe290, Phe330, Phe331, Gly118, Gly119, Ala201, His440 ve Glu327, Asp72, Ser200'dür. Periferik bölge, periferik anyonik bölge olarakta adlandırılmaktadır ve temel olarak Tyr70, Trp279 aromatik aminoasit artığını taşımaktadır [110].

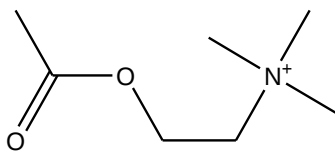
Aktif bölgede beş temel bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Bu bölgeler, oksanyonik çukur, esteratik bölge, anyonik substratın bağlandığı bölge, selektif aromatik bağlanma bölgesi ve açıl bağlanma bölgesinden oluşmaktadır. Oksoanyonik çukur, Gly118, Gly119, Ala201

aminoasit artığını taşımaktadır. Esteratik bölge, ‘katalitik üçlü’ olarak adlandırılan Ser200-His440-Glu327 aminoasit artığının bulunduğu bölgedir. Anyonik substrat bağlanma bölgesi, daha çok aromatik yapıli aminoasit artığının bulunduğu bölge olarak tanımlanmaktadır. Selektif aromatik bağlanma bölgesi aril substratların, açıl bağlanma bölgesi ise asetilkolinin asetil grubunun bağlandığı bölgedir.



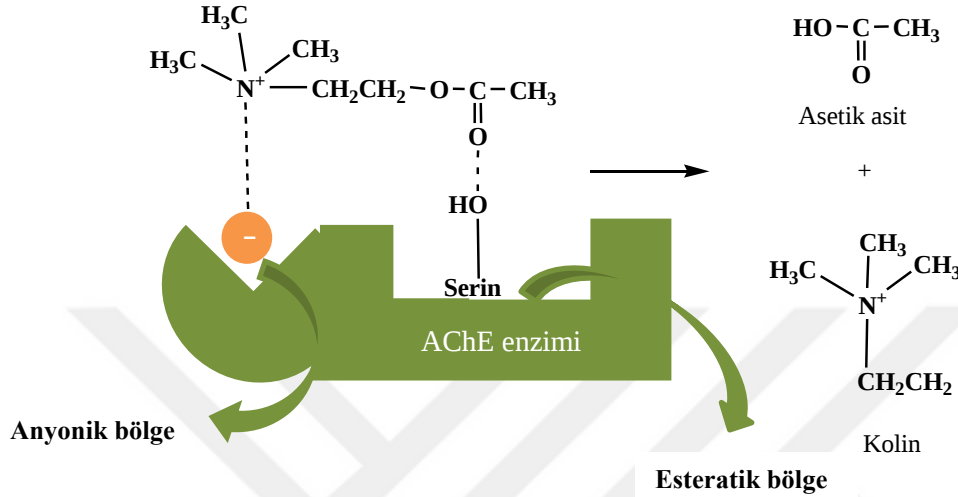
Şekil 2.46. Asetilkolinesterazın aktif bölgeleri (*Torpedo californica* asetilkolinesteraz (TcAChE); (protein data bank kodu: 1eve) [111]

AChE’nin substratı olan asetilkolin (ACh), bir alkaloid olup ilk nörotransmitterdir. Özellikle merkezi sinir sisteminde yer alan formülü $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ olan ACh, asetik asit ile kolinin esteridir. AChE enzimi, asetilkolini (ACh) inaktif olan koline (Ch) hidroliz eder [112]. Asetilkolin esteraz enzimi inhibe edilirse, beyindeki sinir uçlarında asetilkolin birikir. Bu nedenle asetilkolinin parçalanarak bölgeden temizlenmesi önemlidir. Asetilkolinin miktarı Alzhemier ve demans gibi hastalıklarla ilişkili olduğundan asetilkolinin tayini klinik açıdan çok önemlidir [113].



Şekil 2.47. Asetilkolinin (ACh) açık yapısı

Şekil 2.47'deki ACh'in açık yapısında görüldüğü gibi, asetilkolinin pozitif yüklü azot atomu, asetilkolinesteraz enzimindeki iyonik bölge ile elektrostatik olarak etkileşirken, esterik bölgede bulunan serin aminoasitinin -OH grubu ile asetilkolinin karbonil ucundan etkileşir. Böylece asetilkolin, kolin ve asetik asit oluşturmak üzere hidrolize uğrar.

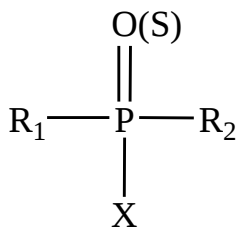


Şekil 2.48. Asetilkolinin hidroliz mekanizmasının şematik gösterimi

2.5.1. AChE enziminin pestisit tayininde kullanımı

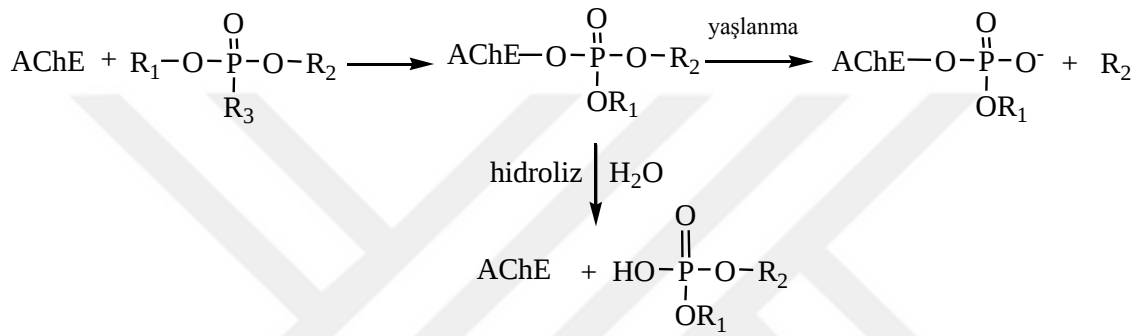
Pestisitler, özellikle zirai mücadelede yaygın bir şekilde kullanılan kimyasal madde olup, zararlı organizmaların oluşumunu engellemek ya da kontrol altına almak amacıyla da kullanılmaktadır. Pestisitlerin faydalı etkilerinin yanı sıra bıraktıkları kalıntılar nedeniyle ekolojik dengeyi bozduğu bilinen bir gerçektir. Günümüzde insan ve hayvanlarda sıklıkla karşılaştığımız zehirlenmelerin pestisit kaynaklı olduğu görülmektedir [114-116].

İnsektisit olarak kullanılan organofosfatlar (OP) ve karbamatlar nörotoksik zehirdir. Şekil 2.49.'da OP bileşiklerin genel kimyasal yapısı verilmektedir.



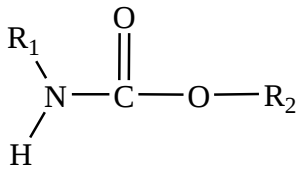
Şekil 2.49. Organik fosforlu (OP) bileşiklerin genel yapısı

Organik fosforlu bileşikler asetilkolinesterazın aktif bölgesindeki serin aminoasidinin hidroksil grubuna kovalent bağ ile bağlanarak enzimi inhibe eder. Bu durum enzimin, asetilkolini hidroliz edememesine neden olur. OP'nin enzime bağlanması sonucu bir geçiş formu oluşur ve aktif merkez dolu hale gelir [117,118]. Bu geçiş formundan bir alkil substitüenti ayrıldığında negatif yüklü hale gelen OP, enzimden uzaklaşamaz. Bu durum “yaşlanma” olarak adlandırılır. Aslında enzimin, oksimler gibi nükleofiller aracılığıyla deaçilasyona uğratarak eski haline getirilebilir, ancak yaşlanmış enzim için bu mümkün değildir [119-121] .



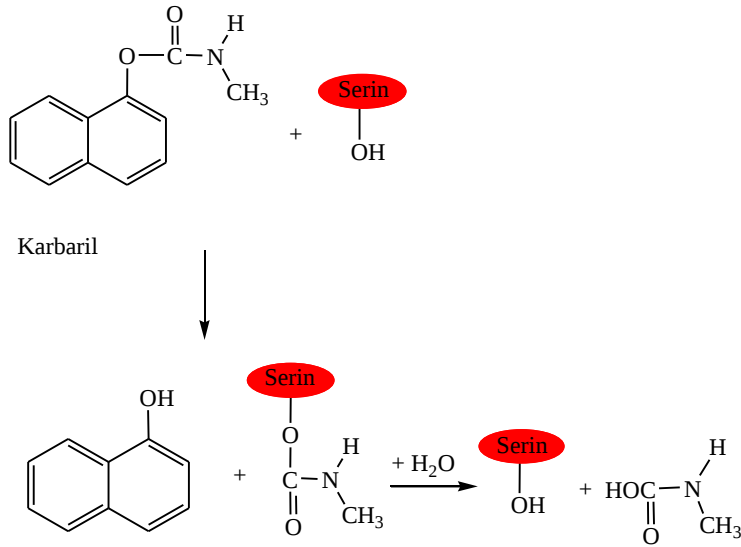
Şekil 2.50. AChE enzimin ‘Yaşlanma’ (aging) mekanizması

Karbamatlı insektisitler, karbamik asit esterleridir. Kimyasal bağlarla asetilkolinesteraz enzimine bağlanır. AChE enziminin işlevini durdurması organik fosforlu insektisitlerden farklı bir şekilde olduğu bilinmektedir. Şekil 2.51.’de karbamatlı bileşiklerin genel kimyasal yapısı verilmektedir.



Şekil 2.51. Karbamatlı bileşiklerin genel yapısı

Karbamat grubu bileşiklerin insan üzerindeki zehirlenme etkisi, organik fosforlu bileşiklerle aynı olmasına karşın, enzim aktivitesinin normale dönmesi daha kısa sürede gerçekleşir. Bir karbamat olan karbarilin AChE enzimi ile verdiği tepkime aşağıda verilmiştir.



Şekil 2.52. Karbarilin AChE enzimi ile verdiği tepkime

AChE aktivitesi, genellikle herbisit toksisitesinin bir biyobelirteçi olarak kullanılmaktadır.

Tez kapsamında GOx enzimi ve AChE enzimi üzerine çalışmalar yapıldığından ilgili enzimler üzerine kaynak araştırması aşağıda özetlenmiştir.

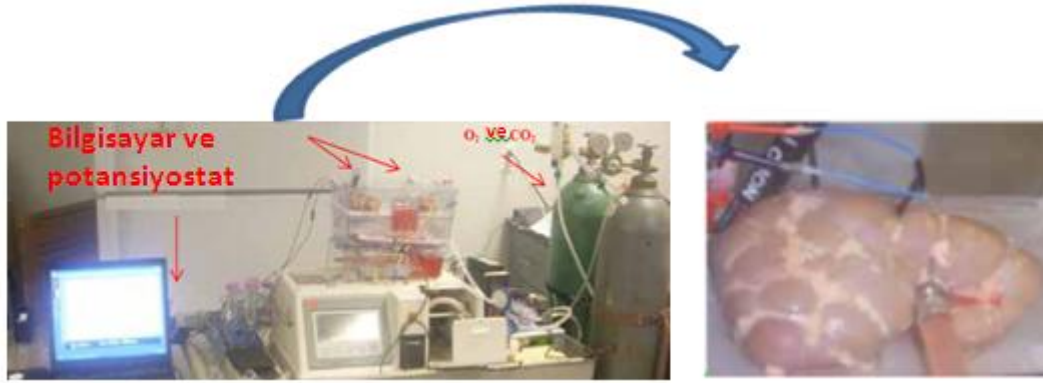
2.6. Glukoz Oksidaz (GOx) ve Asetilkolinesteraz (AChE) Enzimleri Üzerine Yapılmış Çalışmalar

Enzim tabanlı elektrot hazırlanışı ile ilgili ilk çalışmanın *Cass ve diğerleri* tarafından 1984 yılında yapılmasından sonra [122] biyosensör çalışmalarının günümüze kadar çeşitlenerek arttığı görülmektedir [123, 124].

Alonso ve diğerleri, ferrosen-kobaltsenyum karışımı dendrimer ile modifiye edilmiş karbon ve platin elektrotları hazırlayarak, glukoz oksidaz (GOx) enzimini elektrostatik etkileşimle immobilize etmişlerdir. Enzimatik reaksiyonun oksijensiz koşullar altında meydana gelebileceğini söyleyen araştırmacılar yüksek hassasiyete sahip biyosensörü hazırladıklarını ifade etmişlerdir [125].

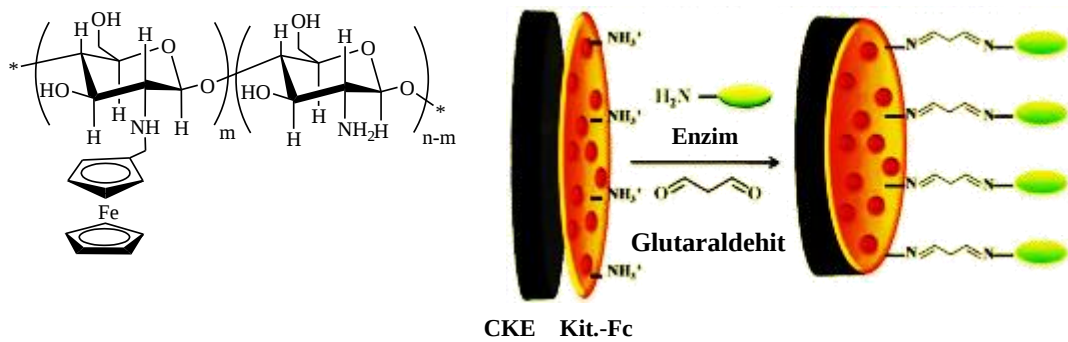
Pesántez ve diğerleri, böbrekteki dokular arasında bulunan glukozu tayin edebilecek bir mikrosensör geliştirmişlerdir. Bu mikrosensörün hazırlanışında, iletken bir polimer olan polipirol (PPy) ile ferrosenden faydalanmışlardır.

Bu matriksin üzerine, *Aspergillus niger*'dan elde edilen glukoz oksidaz enzimini immobilize etmişlerdir. Hazırlanan mikrosensörün hem kimyasal hem de fiziksel olarak biyo uyumlu olduğunu belirtmişlerdir. Bu özellik sayesinde, organizma dışında, ancak organizmanın doğal koşullarına uygun bir ortamda bulunan böbrekteki glukozun tayininin yapılabileceğini ifade etmişlerdir [126].



Resim 2.2. Böbrekteki dokular arasında glukoz ölçümü için mikrosensör yerleştirilmesi

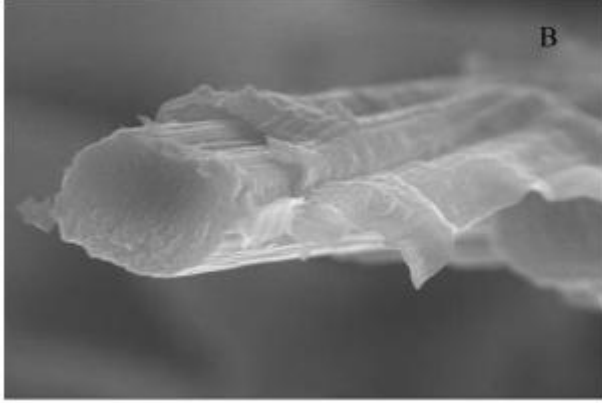
Yılmaz ve diğerleri, çitosana kovalent olarak bağlanmış ferrosen hibritine (CHIT-Fc) glukoz oksidazı immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyon sırasında glutaraldehidi çapraz bağlayıcı olarak kullanmışlar, hazırladıkları hibritin kararlı bir biyosensör olarak kullanabileceğini ifade etmişlerdir [127].



Şekil 2.53. Ferrosen takılı çitosan molekül yapısı ve GOx enziminin immobilizasyonun şematik gösterimi

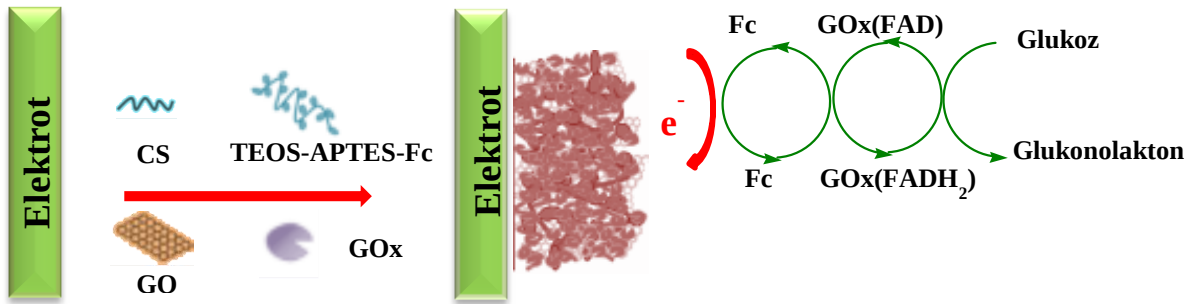
Crepaldi ve diğerleri, ferrosen içeren heksaflorofosfatı poliprol filmlerine (Fc-polipirol) taktıktan sonra (Resim 2.3.) GOx ve poliamidoamin (PAMAM) dendrimerini içeren bir bioanot ürettiklerini ifade etmişlerdir. Araştırmalarının sonucunda serbest GOx enzimi

($K_m = 21.5 (\pm 0.8) \text{ mmol L}^{-1}$) ile immobilize olmuş GOx enziminin ($K_m = 21.2 (\pm 0.6) \text{ mmol L}^{-1}$) kinetik parametrelerinin birbirine yakın olduğunu belirtmişlerdir [128].



Resim 2.3. Fc-polipirol filminin SEM görüntüsü

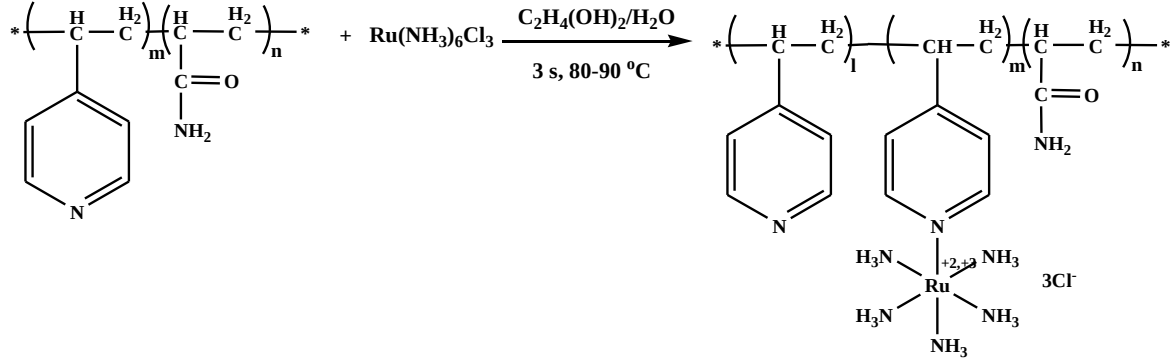
Peng ve diğerleri, yeni silika (ormosil)/ kitosan (CS) ve grafen oksit (GO) de dayalı ferrosen fırçalı destek materyali oluşturabilmek için 3-(aminopropil)trioksosilan (APTES), tetraetil ortosilikat (TEOS) ve ferrosenkarboksialdehitten (Fc-CHO) faydalanmışlardır. Hazırlanan destek materyale glukoz oksidaz enzimini (GOx) immobilize etmişlerdir. Bu destek materyale enzimin yüksek oranda yüklenebildiğini, 6,5µM derişimindeki glukozun tayin edebileceğini ifade etmişlerdir [129].



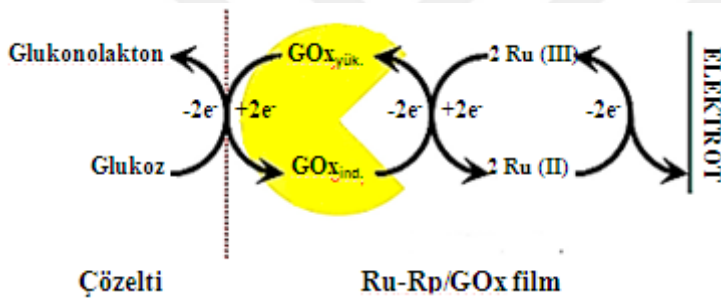
Şekil 2.54. Modifiye elektrot GOx/TEOS-APTES-Fc/CS/GO 'nun şematik hazırlanışı ve glukozun yükseltgenme mekanizması

Poli(vinilpiridin-ko-akrilamit) (PVPAA) iskeleti üzerine Ru(III) kompleksini etkileştirerek, bir redoks polimerini (Ru-RP) hazırlayan Deng ve diğerleri, aşağıdaki sentez rotasını izlemişlerdir (Şekil 2.55.). Glukoz tayinine engel teşkil eden askorbik asit, dopamin, ürik

asit gibi türlerinin yanında 10 mM'a kadar tayin edilebilecek bir biyosensör (Şekil 2.56.) hazırladıklarını ifade etmişlerdir [130].



Şekil 2.55. Ru-RP polimerinin sentez rotası

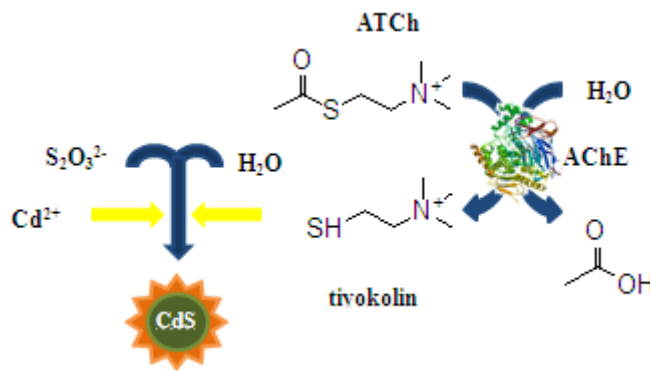


Şekil 2.56. Glukoz biyosensörünün çalışma prensibinin şematik gösterimi

Asetilkolinesteraz enziminin (AChE) biyosensör üzerine çalışmaların çok yaygın olduğu ancak immobilizasyon ile ilgili çalışmaların yaygın olmadığı görülmektedir. AChE enzimi üzerine olan dikkat çekici bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Kaynaklar incelendiğinde, AChE enziminin işlevini sürdürebilecek materyallerin hazırlanmasında, yaygın olarak nanomateriyallerin kullanıldığı görülmektedir. Nanomateriyallerin seçilmesinin nedeninin iki başlık altında toplandığı görülmektedir: birincisi nanomateriyallere AChE enziminin büyük miktarda yüklenebilmesi, böylece enzim taşıyıcı olarak mükemmel bir rol üstlenebilmesidir [131]; ikincisi ise, değişik substratları içeren nanomateriyallere immobilize edilen AChE enzimin, asetilkolin ile gerçekleşen tepkimeler sonucunda oluşan H_2O_2 'in, kalorimetrik yada floresans spektroskopisi ile kolayca tayin edilebilmesidir [132].

Saa ve diğçerleri, CdS kuantum noktalarının (CdS QDs) floresans yapma özelliğini geliştirmek için AChE enziminden faydalanmışlardır. AChE'nin asetiltiyokolini hidrolize etmesiyle oluşan tiyokolinin, tiyosülfat ve kadminyum iyonu varlığında floresans özelliğine sahip CdS kuantum noktalarını elde ettiklerini belirtmişlerdir. CdS kuantum noktalarının floresans şiddeti yardımıyla, AChE'nin hem aktifliği, hem de inhibe olup olmadığı ile ilgili bir değçerlendirmenin yapılabileceğini ifade etmişlerdir [133].

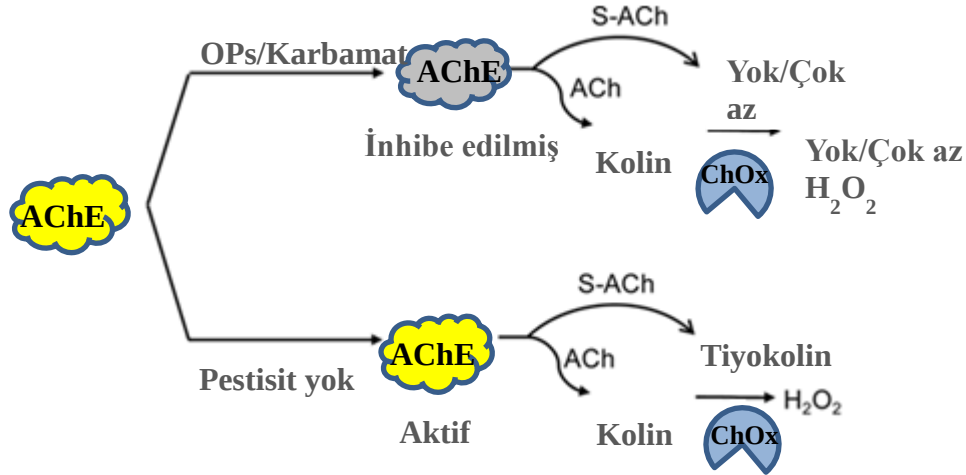


Şekil 2.57. AChE aktivitesinin belirlenmesi için CdSe QDS'nin enzimatik sentez rotası

Benzer bir çalışmanın da *Yi ve diğçerleri* tarafından Si kuantum noktaları üzerine yapıldığı görölmektedir [134].

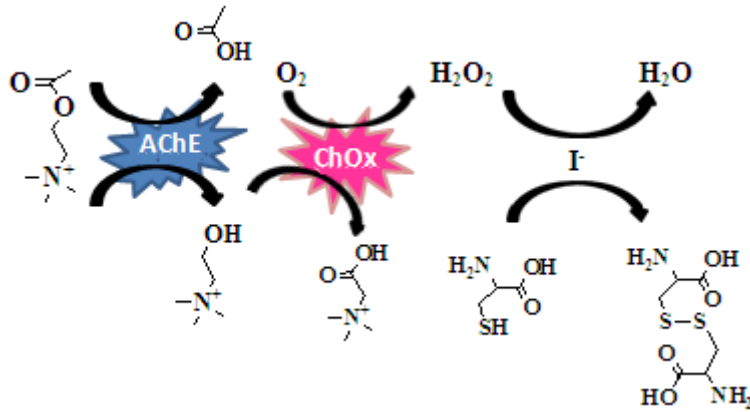
Snejdarkova ve diğçerleri, hazırladıkları amperometrik sensör için PAMAM dendrimerinden faydalanarak, bu dendrimerlere AChE'ı immobilize ettiklerini ifade etmişlerdir. Pestisit tayini için hazırladıkları sensörün, bir organofosfat olan trikrofon için tayin sınırının 3×10^{-3} nmol/L olduğunu bildirmişlerdir [135].

Metomil bir böcek öldürücüdür. Elma suyu ve yeşil çaydaki metomilin tayinini yapmak için, AChE enzminden faydalanmışlardır. Enzimatik ortamda ACh'den kolin meydana gelir, kolin ise çözeltide bulunan O_2 ile reaksiyona girerek H_2O_2 'i oluşturur. Araştırmacılar oluşan bu H_2O_2 'in çözelti ortamında gösterdiği renk değışimine göre belirlendiğı bir yöntemi geliştirdiklerini belirtmişlerdir. Bu yöntem sayesinde aynı anda hem karbamat hem de fosfomatları belirleyebileceklerini ifade etmişlerdir [136].



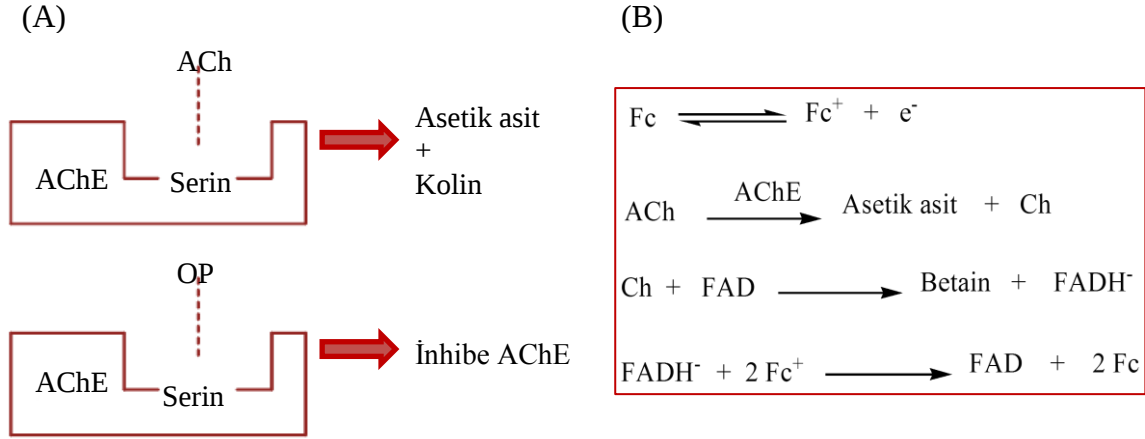
Şekil 2.58. Organofosfat ve karbamatların belirlenmesinde renk değişimini sağlayan H₂O₂'in oluşumu

Wang ve diğerleri, GOx enziminden faydalanarak, H₂O₂'in tayinini kolaylaştırmak için AChE ve kolinoksidaz (ChOx) enzimlerini içeren bir materyal geliştirmişlerdir. Araştırmacılar aşağıda verilen mekanizmaya göre kullandıkları enzimlerin nasıl bir rol aldığını yorumlamışlardır [137].



Şekil 2.59. H₂O₂ tayininde AChE ve ChOx enzimlerinin etkisinin şematik gösterimi

Haşerelerin uzaklaştırılması için kullanılan diazon tayininin elektrokimyasal yolla belirlenmesi için AChE/ChOx ikili enzim sistemini içeren bir biyosensör hazırlayan Lee ve diğerleri, mediatör olarak ferroseni kullanmışlar, böylece ferrosenin bir biyoelektrokataliz olarak rol aldığını ifade etmişlerdir [138].



Şekil 2.60. (A) AChE'nin substratı ACh ile tepkimesi ve OP bileşiklerle inhibisyonunun şematik gösterimi (B) ChOx tarafından gerçekleştirilen biyoelektrokatalitik sinyal mekanizması

Chaure ve diğerleri, ağır metal iyonlarını tayin etmek için, kalsiyum aljinat mikro boncuklara AChE enzimini immobilize ettikten sonra ftalosiyanın içeren film ile kaplıyarak, sudaki kadmiyumun belirlenmesi üzerine bir araştırma yapmışlardır. Araştırmacılar hazırladıkları sensör ile 1 ppm derişimindeki kadmiyumun belirlenebileceğini ifade etmişlerdir [139].

1990'lı yıllarda siyanobakteri tabanlı sensörler kullanılarak herbisit tayini çalışmaların yapıldığı görülmektedir [140]. Kaynaklar incelendiğinde AChE enziminin immobilizasyonuna dayalı çalışmaların çoğunlukla organofosfat ve karbamatlı pestisit türlerinin tayini üzerine olduğu, herbisitler üzerine olan çalışmaların ise yaygın olmadığı ve sınırlı sayıda kaldığı görülmektedir.

Geniş yapraklı bitkilerde böcek öldürücü olarak kullanılan 2,4-diklorofenoksiasetik asitin (2,4-D) 1987 yılında Uluslararası Kanseri Araştırma Enstitüsü tarafından B sınıfı kanser yapıcı bileşikler sınıfında yer aldığından *Kalab ve Skaladal* bu bileşiğin tayini için bir imüno sensör geliştirmişlerdir. Araştırmacılar içme suyunda bulunan 2,4-D'nin 0,01 µg/L'den daha az derişimde tayin ettiklerini ifade etmişlerdir [141].

Altın nanopartiküller üzerine, DNA, enzim, protein ve antikorlar gibi biyomoleküller ya da makromoleküllerin immobilize edilmesinde yaygın olarak kullanılmasının nedeni, onların biyoyumumluluğu, kirliliğe neden olmaması, hazırlanma ve ortamdan ayrılma kolaylığıdır. 2008 yılında *Valera ve diğerleri*, 40 nm çapına sahip altın nanopartiküllerini kullanarak

imünosensör hazırlamışlardır. Hazırladıkları imünosensör ile şarapta bulunan ve bir herbisit olan atrazininin 0,1-1 µg/L aralığındaki tayininin mümkün olabildiğini ifade etmişlerdir [142].



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

^1H -NMR spektrumları, Gazi Üniversitesi Fen 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, Gazi Üniversitesi 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 DMF çözücüsü içerisinde alındı.

LC-MS Spektrumları Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarında, Waters marka LCT Premier XE (TOF-MS) model spektrofotometre ile alındı.

MALDI-TOF MS spektrumları, Bruker microflex LT model spektrofotometre ile Gebze Teknik Üniversitesi, Temel Bilimler Fakültesi, Kimya Bölümü laboratuvarında alındı.

Numunelerin termal bozunmaları ve kütle kayıpları, 25 °C-900 °C sıcaklık aralığında 10 °C/dakika ısıtma hızında ve $\text{N}_2(\text{g})$ atmosferinde Setaram marka Simultaneous TG/DTA cihazı ile ODTÜ merkez laboratuvarlarında incelendi.

Element analizleri, LECO, CHNS-932 Elementel Analiz Cihazı ile ODTÜ Merkez Laboratuvar, AR-GE ve Ölçme merkezinde yapıldı.

Komplekslerin metal yüzdeleri ODTÜ Merkez Laboratuvar, Perkin Elmer AAanalyst 400 AA Spektrometresi AR-GE Eğitim ve Ölçme merkezinde yapıldı.

Bileşiklerin erime noktası, Barnstead-Electrothermal-9200 model erime noktası cihazı ile belirlendi.

Komplekslerin magnetik duyarlılık ölçümleri, 3 mm çapındaki cam tüplerde örnek yüksekliği 1,5 cm'den az olmamak üzere bölümümüzdeki Sherwood Scientific MKI model Gouy terazisi ile yapıldı. Standart olarak $[\text{Hg}(\text{NCS})_4]$ kullanıldı.

İletkenlik ölçümleri, inoLab Cond 730 iletkenlik cihazı ile $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ 'de DMF içerisinde 5×10^{-4} M'lık çözeltileri hazırlanarak yapıldı. Orion pH metre 420 A model pH metre, tampon çözeltilerin pH'sını ayarlamak için kullanıldı.

3.2. Kullanılan Maddeler

Deneysel çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve bunların temin edildiği firma adı Çizelge 3.1.'de, enzimler, substratları ve pestisitler ise Çizelge 3.2.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler

<i>Kodu</i>	<i>Kimyasal Madde</i>	<i>Firma</i>
M2659	Melamin, 99 % saflıkta	Aldrich
G7651	Glutaraldehit, 50 % (v/v)	Sigma-Aldrich
496391	1,1'-Ferrosenedikarboksialdehit, 96 % saflıkta	Aldrich
520632	PtCl ₂ , ≥ 99.9 % saflıkta	Aldrich
206113	PtCl ₄ , 96 % saflıkta	Aldrich
A71301	2-Aminofenol, 99 % saflıkta	Aldrich
144916	2-Amino-5-metilfenol 98 % saflıkta	Aldrich
303585	2-Amino-5-nitrofenol	Aldrich
227056	N,N-Dimetilformamid, susuz % 99.8 saflıkta	Sigma-Aldrich
322415	Metanol susuz % 99.8 saflıkta	Sigma-Aldrich
32205	Etanol, absolute ≥ 99.8 % saflıkta	Sigma-Aldrich
244511	Toluen susuz 99.8 % saflıkta	Sigma-Aldrich
439126	Aseton, ≥ 99.9 % saflıkta	Sigma-Aldrich
S8282	Sodyum Dihidrojen fosfat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma Aldrich
452289	Fosforik Asit (H ₃ PO ₄)	Aldrich
W302406	Sodyum Asetat (C ₂ H ₃ OONa)	Aldrich
NIST2186II	Disodyum hidrojenfosfat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma Aldrich
71997	Boraks (Na ₂ B ₄ O ₇)	Sigma Aldrich
71687	Sodyum hidroksit (NaOH)	Sigma
33528	4-Aminoantipirin (4-AAP)	Sigma Aldrich
P5566	Fenol	Sigma Aldrich
D8130	5,5'-Ditiyobis(2-nitrobenzoik asit)	Sigma
S5761	Sodyumbi karbonat	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) ≥ 99.0 % saflıkta	Sigma Aldrich
A9434	Amonyum klorür	Sigma

Çizelge 3.2. Kullanılan enzimler, substratları ve pestisitler

Kodu	Kimyasal Madde	Firma
49180	Glukoz Oksidaz (<i>Aspergillus niger</i> 'dan elde edilen) (192 U/mg) Glukoz	Sigma Sigma Aldrich
P8375	Peroksidaz enzimi (yaban turbundan elde edilen) (≥ 250 U/mg)	Sigma
C3389	Asetilkolinesteraz (elektrikli yılan balığından elde edilen) (200-1,0 U/mg)	Sigma
A5626	Asetiltiyokolin iyodür, ≥ 98 % saflıkta	Sigma
32055	Karbaril (1-naftil-N-metilkarbamat)	Sigma Aldrich
G005510	Fosmet (O,O-dimetilS-ftalimidometil fosforoditiyoat)	Supelco
45442	Diklofop-metil (metil (RS) -2- [4- (2,4-diklorofenoksi) fenoksi] propionat)	Sigma Aldrich

3.3. Hazırlanan Çözeltiler

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 asetatı 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.

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

Stok Glukoz çözeltisinin hazırlanışı (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.

Yapay üre çözeltisinin hazırlanışı: 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 karıştırılarak 0,1 M HCl çözeltisi ile pH 6'ya ayarlandı [143].

Asetilkolinesteraz enzim çözeltisi (AChE): 18 mg enzim 50 mL saf suda çözüldü ve 1'er mL'lik hacimler halinde ependorf tüplere koyularak derin dondurucuda -20 °C de muhafaza edildi.

Asetiltiyokolin iyodür çözeltisi: 0,075 M stok substrat çözeltisi hazırlamak için; 0,216 g asetiltiyokolin iyodür tartılarak 10 mL'ye saf su ile tamamlandı.

Renklendirici (DTNB): 0.01 M DTNB çözeltisi hazırlamak için: 39,6 mg 5,5-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit tartılarak 10 mL pH 7 fosfat tamponu ile çözüldü, üzerine 15 mg sodyum bikarbonat ilave edildi.

$1,86 \times 10^{-7}$ M fosmet (O,O-dimetilS-ftalimidometil fosforoditiyoat) çözeltisini hazırlamak için; 0,05 mg O,O-dimetilS-ftalimidometil fosforoditiyoat tartılarak 1 L saf su-asetonitril (19:1) karışımda çözüldü.

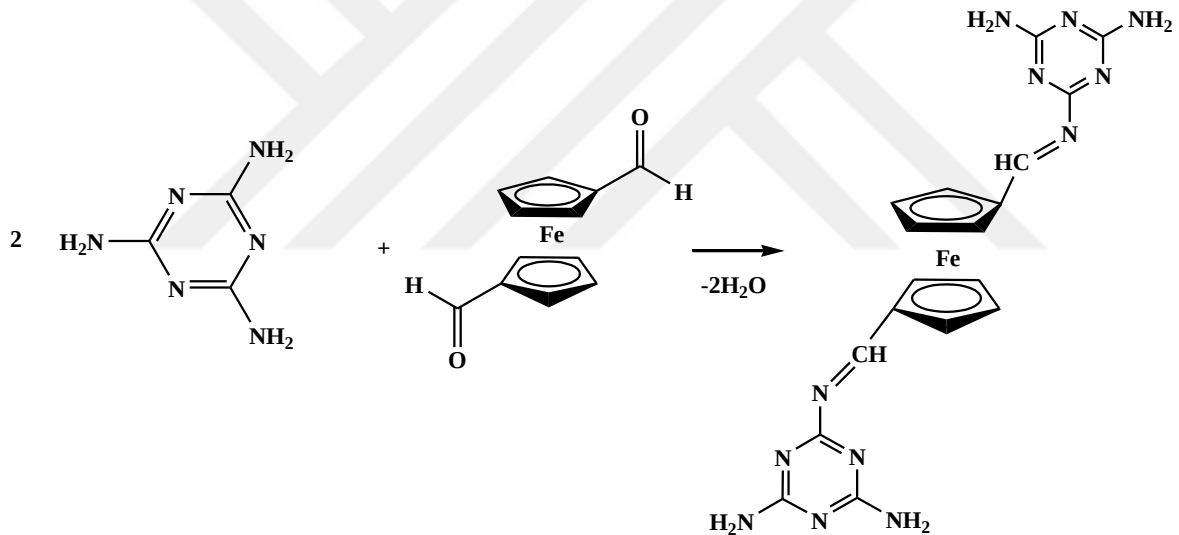
$2,49 \times 10^{-8}$ M karbaril (1-naftil-N-metilkarbamat) çözeltisini hazırlamak için; 0,05 mg 1-naftil-N-metilkarbamat tartılarak 1 L saf su-asetonitril (19:1) karışımda çözüldü.

$5,86 \times 10^{-8}$ M diklofop-metil çözeltisini hazırlamak için; 0,02 mg diklofop-metil tartılarak 1 L saf su-asetonitril (19:1) karışımda çözüldü.

4. DENEYSEL YÖNTEM

4.1. Birinci Jenerasyon 1G Dendrimerinin Sentezi

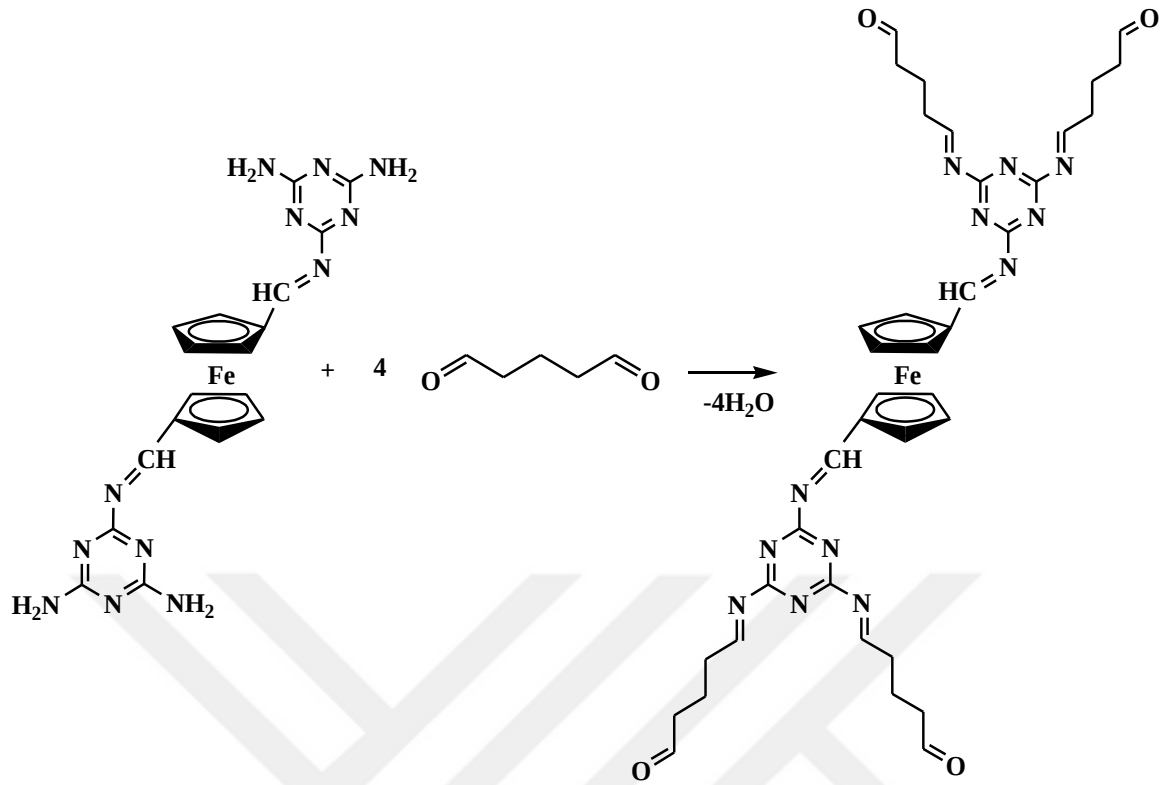
0,242 g (1×10^{-3} mol) ferrosendikarboksialdehit, 2 boyunlu cam balona alınarak 20 mL DMF içinde çözüldü. Damlatma hunisi içerisindeki 30 mL DMF’de çözünmüş 0,252 g (2×10^{-3} mol) melamin çözeltisi damla damla balondaki aldehit çözeltisi üzerine damlatıldı. Amin çözeltisi eklendikten sonra 6 saat geri 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. Çökelek 1:1 metanol:aseton karışımı ile 3 kere yıkandı. Daha sonra 80 °C de etüvde 1 gün boyunca kurutuldu (Şekil 4.1). (verim % 70; Şekil 4.2.).



Şekil 4.1. 1G dendrimerinin sentezi için öngörülen tepkime

4.2. İkinci Jenerasyon 2G Dendrimerinin Sentezi

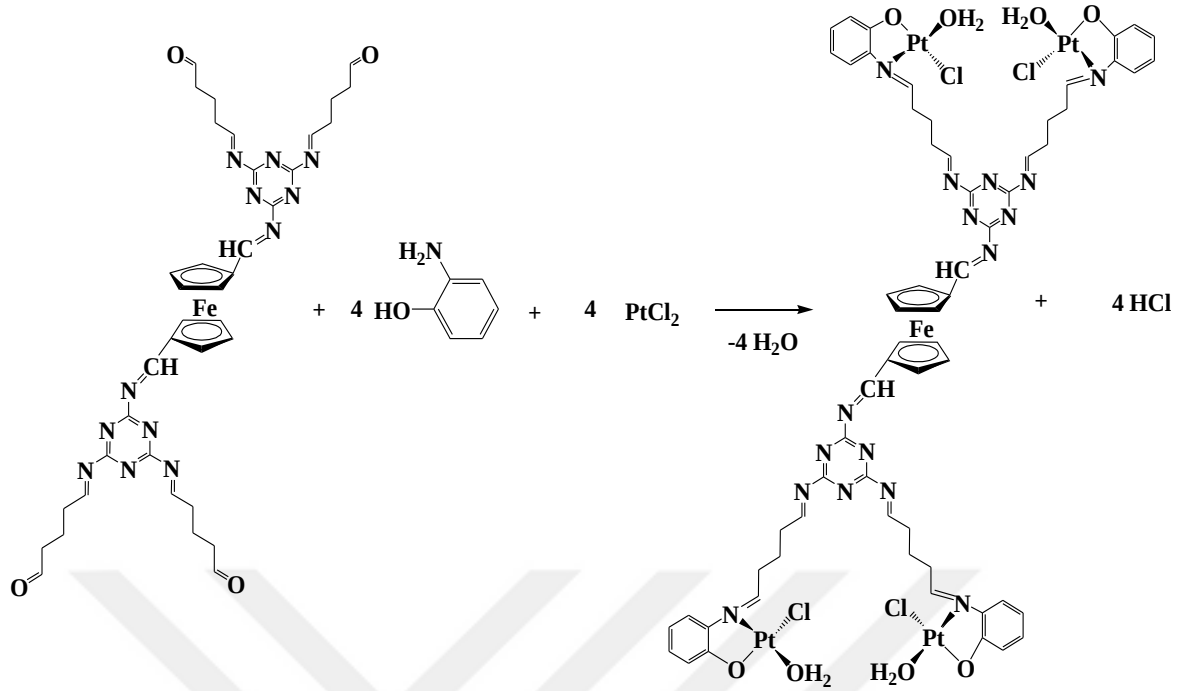
0,916 g (2×10^{-3} mol) 1G dendrimeri 2 boyunlu cam balona alınarak 50 mL DMF’de çözüldü. 1,5 mL (8×10^{-3} mol) glutaraldehit çözeltisi, reaksiyon ortamına yavaş yavaş damlatıldı. 6 saat geri soğutucu altında karıştırma ve ısıtma işlemine devam edildi. Reaksiyonun sonlanması TLC ile kontrol edildi. Altı saatin sonunda temiz bir behere alınan karışım oda sıcaklığına geldikten sonra, aseton eklenerek çöktürüldü. Çökelek 1:1 metanol:aseton karışımı ile 3 kere yıkandı. Daha sonra 80 °C de etüvde 1 gün boyunca kurutuldu (verim % 60; Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. 2G dendrimerinin sentezi için öngörülen tepkime

4.3. Genişletilmiş 2. Jenerasyon 2G-H-Pt(II) Dendrimerinin Sentezi

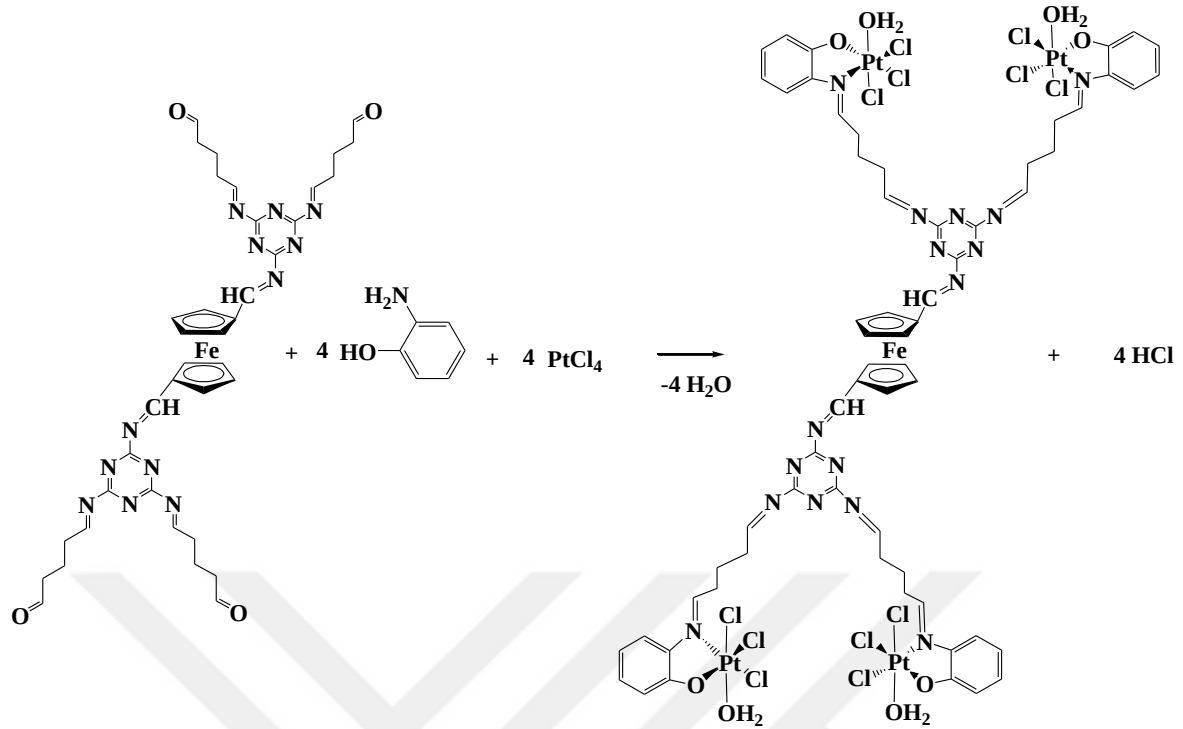
1,573 g (2×10^{-3} mol) 2G ligandı 2 boyunlu cam balona alınarak 20 mL DMF:CH₃OH (1:5) içinde çözüldü. 0,873 g, (8×10^{-3} mol) 2-Aminofenol'ün 10 mL DMF'de çözünmüş çözeltisi, damlatma hunisi içine konularak çözelti ortamına yavaş yavaş ilave edildi. Daha sonra reaksiyon ortamına 2,128 g (8×10^{-3} mol) PtCl₂'nin 10 mL DMF'de çözünmüş çözeltisi konularak 24 saat boyunca 85 °C'de geri soğutucu altında magnetik karıştırıcıda karıştırıldı. 24 saatin sonunda temiz bir behere alınan karışım oda sıcaklığına geldikten sonra, toluen eklenerek çöktürüldü. Çökelek 1:1 metanol:toluen karışımı ile 3 kere yıkandı, süzüldü ve 80 °C de etüvde kurutuldu (verim % 58; Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. 2G-H-Pt(II) dendrimerinin sentezi için öngörülen tepkime

4.4. Genişletilmiş 2. Jenerasyon 2G-H-Pt(IV) Dendrimerinin Sentezi

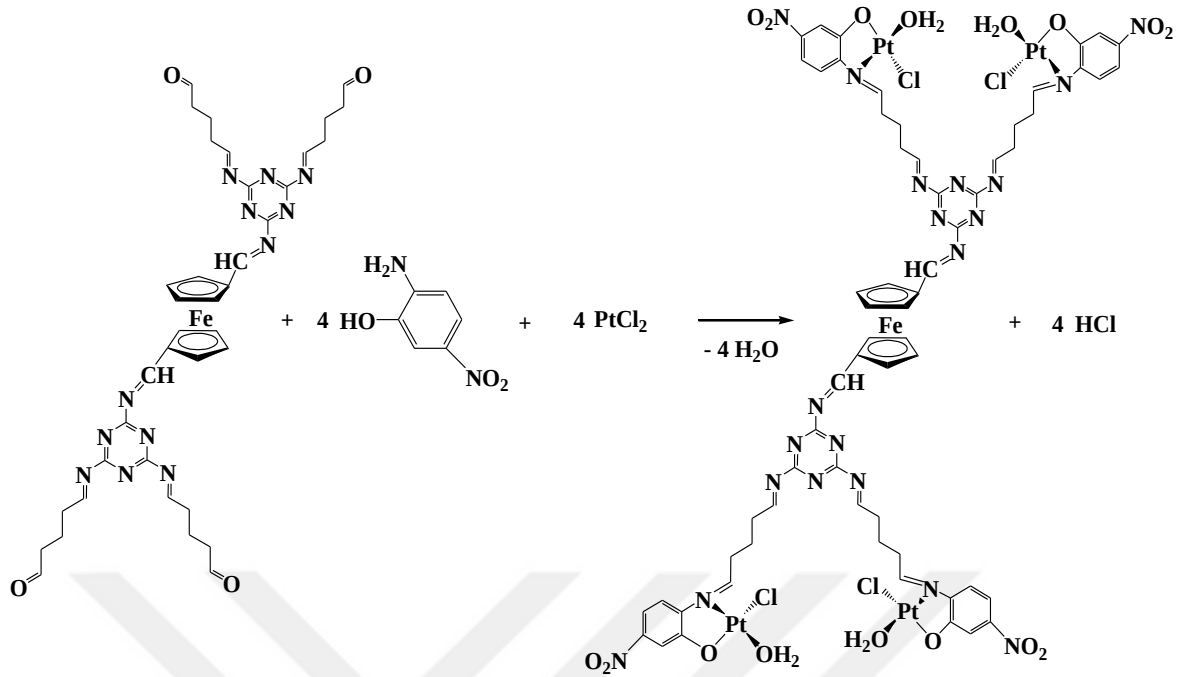
1,573 g (2×10^{-3} mol) 2G ligandı 2 boyunlu cam balona alınarak 20 mL DMF:CH₃OH (1:5) içinde çözüldü. 0,873 g, (8×10^{-3} mol) 2-Aminofenol'ün 10 mL DMF'de çözülmüş çözeltisi, damlatma hunisi içine konularak çözelti ortamına yavaş yavaş ilave edildi. Daha sonra reaksiyon ortamına 2,695 g (8×10^{-3} mol) PtCl₄'ün 10 mL DMF'de çözülmüş çözeltisi konularak 24 saat boyunca 85 °C'de geri soğutucu altında magnetik karıştırıcıda karıştırıldı. 24 saatin sonunda temiz bir behere alınan karışım oda sıcaklığına geldikten sonra, toluen eklenerek çöktürüldü. Çökelek 1:1 metanol:toluen karışımı ile 3 kere yıkandı, süzüldü ve 80 °C de etüvde kurutuldu (verim % 65; Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. 2G-H-Pt(IV) dendrimerinin sentezi için öngörülen tepkime

4.5. Genişletilmiş 2. Jenerasyon 2G-NO₂-Pt(II) Dendrimerinin Sentezi

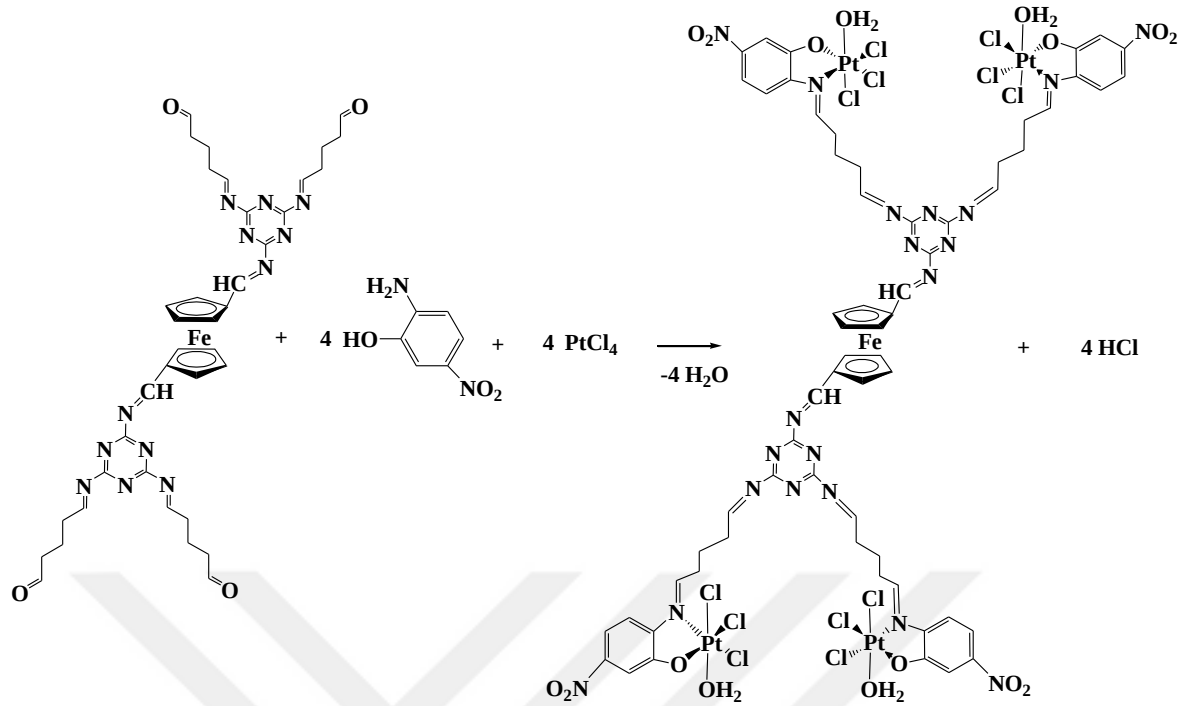
1,573 g (2×10^{-3} mol) 2G ligandı 2 boyunlu cam balona alınarak 20 mL DMF:CH₃OH (1:5) içinde çözüldü. 1,233 g, (8×10^{-3} mol) 2-Amino-5-nitrofenol'ün 10 mL DMF'de çözünmüş çözeltisi, damlatma hunisi içine konularak çözelti ortamına yavaş yavaş ilave edildi. Daha sonra reaksiyon ortamına 2,128 g (8×10^{-3} mol) PtCl₂'nin 10 mL DMF'de çözünmüş çözeltisi konularak 24 saat boyunca 85 °C'de geri soğutucu altında magnetik karıştırıcıda karıştırıldı. 24 saatin sonunda temiz bir behere alınan karışım oda sıcaklığına geldikten sonra, toluen eklenerek çöktürüldü. Çökelek 1:1 metanol:toluen karışımı ile 3 kere yıkandı, süzüldü ve 80 °C de etüvde kurutuldu (verim % 62; Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. 2G-NO₂-Pt(II) dendrimerinin sentezi için öngörülen tepkime

4.6. Genişletilmiş 2. Jenerasyon 2G-NO₂-Pt(IV) Dendrimerinin Sentezi

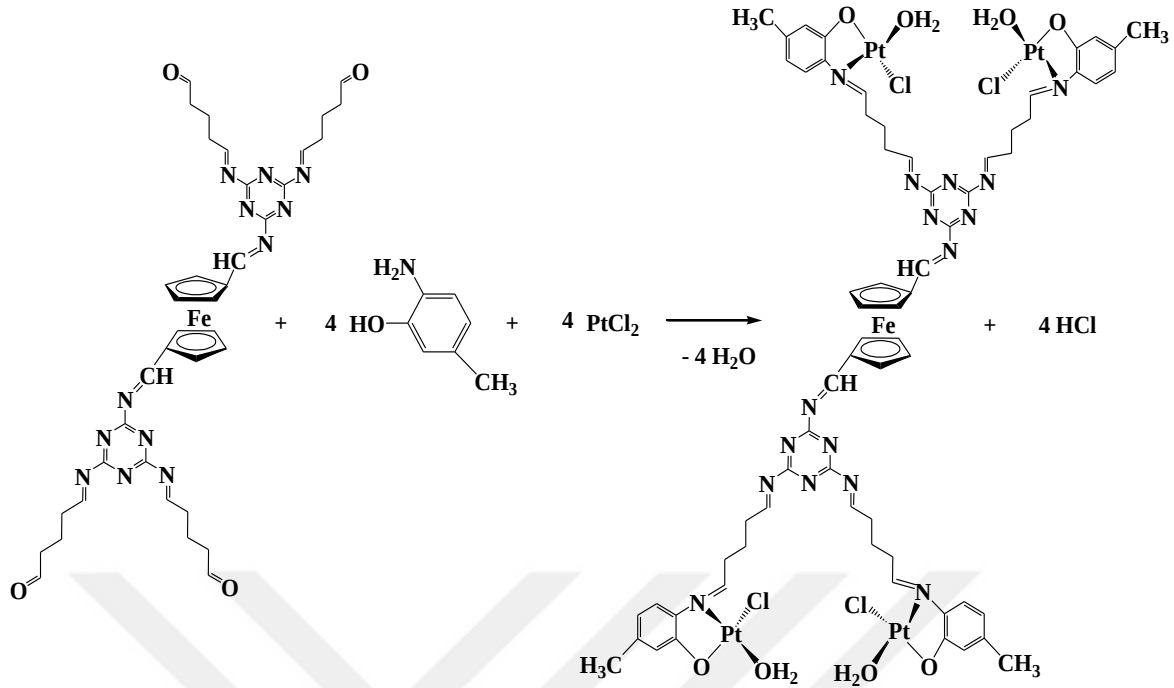
1,573 g (2×10^{-3} mol) 2G ligandı 2 boyunlu cam balona alınarak 20 mL DMF:CH₃OH (1:5) içinde çözüldü. 1,233 g, (8×10^{-3} mol) 2-Amino-5-nitrofenol'ün 10 mL DMF'de çözünmüş çözeltisi, damlatma hunisi içine konularak çözelti ortamına yavaş yavaş ilave edildi. Daha sonra reaksiyon ortamına 2,695 g (8×10^{-3} mol) PtCl₄'ün 10 mL DMF'de çözünmüş çözeltisi konularak 24 saat boyunca 85 °C'de geri soğutucu altında magnetik karıştırıcıda karıştırıldı. 24 saatin sonunda temiz bir behere alınan karışım oda sıcaklığına geldikten sonra, toluen eklenerek çöktürüldü. Çökelek 1:1 metanol:toluen karışımı ile 3 kere yıkandı, süzüldü ve 80 °C de etüvde kurutuldu (verim % 55; Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. 2G-NO₂-Pt(IV) dendrimerinin sentezi için öngörülen tepkime

4.7. Genişletilmiş 2. Jenerasyon 2G-CH₃-Pt(II) Dendrimerinin Sentezi

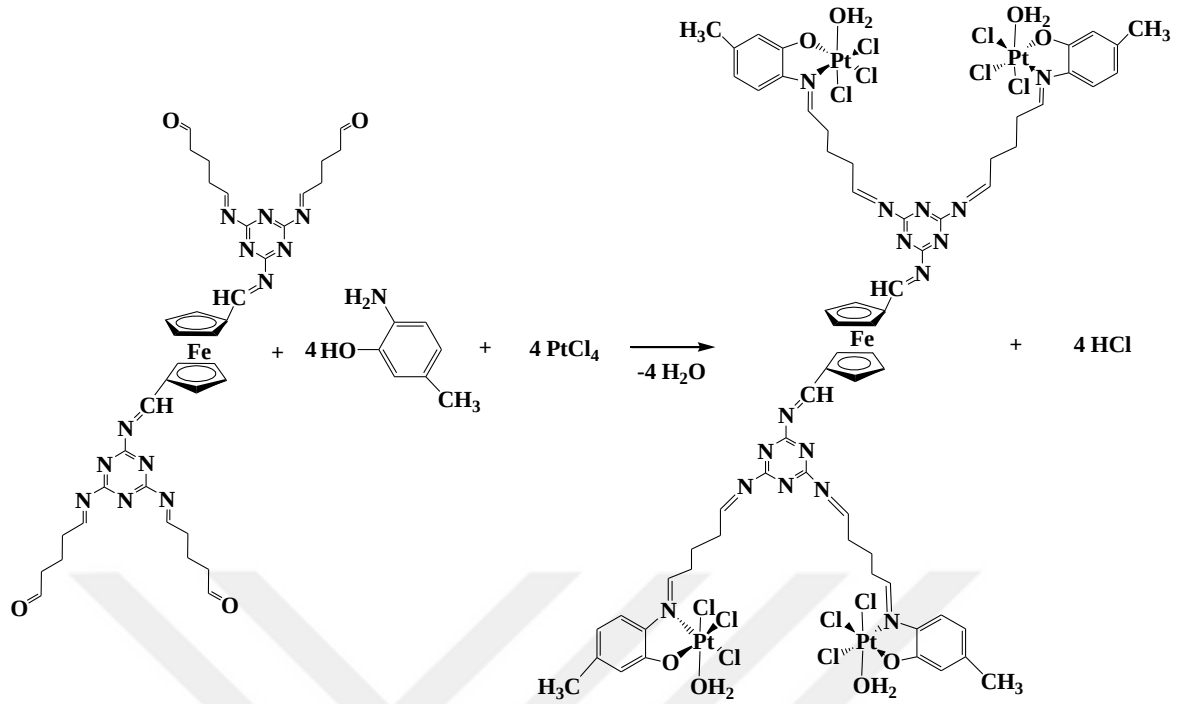
1,573 g (2×10^{-3} mol) 2G ligandı 2 boyunlu cam balona alınarak 20 mL DMF:CH₃OH (1:5) içinde çözüldü. 0,986 g, (8×10^{-3} mol) 2-Amino-5-metilfenol'ün 10 mL DMF'de çözünmüş çözeltisi, damlatma hunisi içine konularak çözelti ortamına yavaş yavaş ilave edildi. Daha sonra reaksiyon ortamına 2,128 g (8×10^{-3} mol) PtCl₂'nin 10 mL DMF'de çözünmüş çözeltisi konularak 24 saat boyunca 85 °C'de geri soğutucu altında magnetik karıştırıcıda karıştırıldı. 24 saatin sonunda temiz bir behere alınan karışım oda sıcaklığına geldikten sonra, toluen eklenerek çöktürüldü. Çökelek 1:1 metanol:toluen karışımı ile 3 kere yıkandı, süzüldü ve 80 °C de etüvde kurutuldu (verim % 53; Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. 2G-CH₃-Pt(II) dendrimerinin sentezi için öngörülen tepkime

4.8. Genişletilmiş 2. Jenerasyon 2G-CH₃-Pt(IV) Dendrimerinin Sentezi

1,573 g (2×10^{-3} mol) 2G ligandı 2 boyunlu cam balona alınarak 20 mL DMF:CH₃OH (1:5) içinde çözüldü. 0,986 g, (8×10^{-3} mol) 2-Amino-5-metilfenol'ün 10 mL DMF'de çözünmüş çözeltisi, damlatma hunisi içine konularak çözelti ortamına yavaş yavaş ilave edildi. Daha sonra reaksiyon ortamına 2,695 g (8×10^{-3} mol) PtCl₄'ün 10 mL DMF'de çözünmüş çözeltisi konularak 24 saat boyunca 85 °C'de geri soğutucu altında magnetik karıştırıcıda karıştırıldı. 24 saatin sonunda temiz bir behere alınan karışım oda sıcaklığına geldikten sonra, toluen eklenerek çöktürüldü. Çökelek 1:1 metanol:toluen karışımı ile 3 kere yıkandı, süzüldü ve 80 °C de etüvde kurutuldu (verim % 65; Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. 2G-CH₃-Pt(IV) dendrimerinin sentezi için öngörülen tepkime

4.9. Dendrimerlerin Element Analizi ve Fiziksel Özellikleri

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

4.10. Dendrimerlerin İletkenlik ve Manyetik Duyarlılık Ölçümleri

Pt⁺² ve Pt⁺⁴ iyonları içeren dendrimerlerin iletkenlik ve manyetik duyarlılık ölçümleri Bölüm 3.1.’de anlatıldığı biçimde yapılarak belirlendi ve sonuçları Çizelge 4.1.’de verildi. Komplekslerin önce 5x10⁻⁴ M DMF çözeltisi hazırlandı ve oda sıcaklığında iletkenlikleri ölçüldü. Referans olarak KCl nin 5x10⁻⁴ M DMF çözeltisinin iletkenlik ölçümleri ile DMF çözeltisinin iletkenliği belirlendi. Verilere göre Pt⁺² ve Pt⁺⁴ iyonu içeren tüm dendrimerlerin elektrolit olmadığı anlaşıldı [144].

Platin iyonu içeren dendrimerlerin manyetik duyarlılıkları Bölüm 3.1.’de anlatıldığı şekilde ölçüldü (Çizelge 4.1.) ve hepsinin diyamanyetik oldukları belirlendi.

Çizelge 4.1. Sentezlenen bileşiklerin element analiz, molar iletkenlik, manyetik duyarlılık sonuçları ve fiziksel özellikleri

Bileşik	Kapalı Formül (Mol kütlesi g.mol ⁻¹)	B.N.	μ_{eff} (BM)	İletkenlik ($\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$)	Renk	Elementel Analiz Bulunan (hesaplanan)%				
						C	H	N	Pt	Fe
1G	C ₁₈ H ₁₈ FeN ₁₂ (458,3)	266-270*	-	-	Koyu kahve	45,02 (47,18)	4,12 (3,96)	35,05 (36,68)	-	11,30 (12,19)
2G	C ₃₈ H ₄₂ FeN ₁₂ O ₄ (786,7)	>350	-	-	Siyah-Kahve	55,18 (58,02)	5,50 (5,38)	18,91 (21,37)	-	6,04 (7,10)
2G-H-Pt(II)	C ₆₂ H ₆₆ Cl ₄ FeN ₁₆ O ₈ Pt ₄ (2141,3)	>300	D	33,8	Koyu Kahve	34,99 (34,78)	3,49 (3,11)	10,34 (10,47)	35,00 (36,44)	2,30 (2,61)
2G-H-Pt(IV)	C ₆₂ H ₆₆ Cl ₁₂ FeN ₁₆ O ₈ Pt ₄ (2424,9)	>300	D	91,6	Siyah	32,97 (30,71)	3,02 (2,74)	9,65 (9,24)	32,40 (32,18)	2,89 (2,30)
2G-NO ₂ -Pt(II)	C ₆₂ H ₆₂ Cl ₄ FeN ₂₀ O ₁₆ Pt ₄ (2321,2)	>285	D	28,0	Kahve	32,79 (32,08)	3,06 (2,69)	12,35 (12,07)	34,10 (33,62)	1,99 (2,41)
2G-NO ₂ -Pt(IV)	C ₆₂ H ₆₂ Cl ₁₂ FeN ₂₀ O ₁₆ Pt ₄ (2604,9)	>350	D	68,4	Koyu kahve	29,94 (28,59)	2,61 (2,40)	11,11 (10,75)	30,40 (29,96)	2,01 (2,14)
2G-CH ₃ -Pt(II)	C ₆₆ H ₇₄ Cl ₄ FeN ₁₆ O ₈ Pt ₄ (2197,4)	>280	D	9,8	Kahve	35,40 (36,08)	3,81 (3,39)	10,60 (10,20)	36,10 (35,51)	2,29 (2,54)
2G-CH ₃ -Pt(IV)	C ₆₆ H ₇₄ Cl ₁₂ FeN ₁₆ O ₈ Pt ₄ (2481)	>300*	D	99,2	Kızıl-Kahve	32,94 (31,95)	3,12 (3,01)	9,60 (9,03)	32,40 (31,45)	1,99 (2,25)

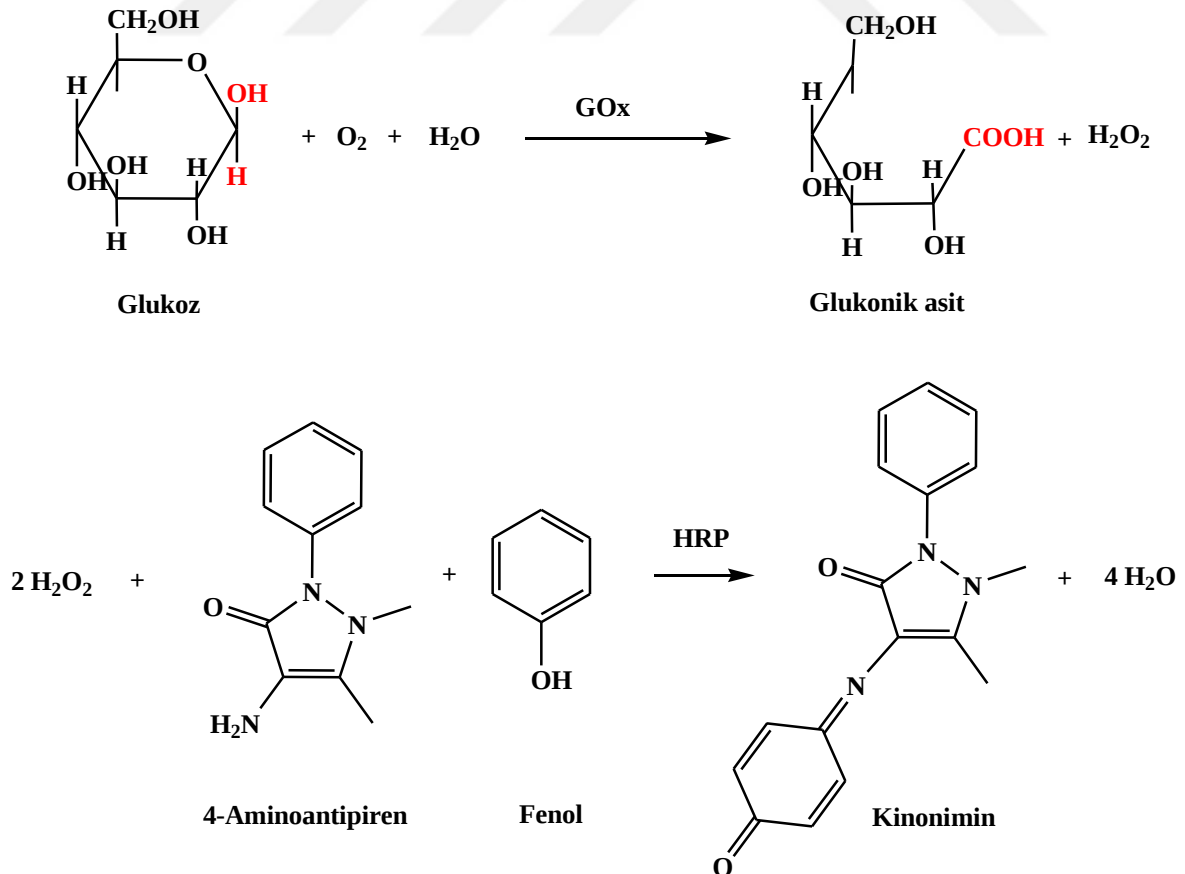
*: Erime sıcaklığı

D: Diyamanyetik

4.11. β -Glukoz oksidaz (GOx) Enziminin İmmobilizasyonu ve Optimizasyonu

10 mg β -Glukoz oksidazın 10 mL sudaki çözeltileri hazırlandıktan sonra 0,5'er gram 2G, 2G-H-Pt(II), 2G-H-Pt(IV), 2G-NO₂-Pt(II), 2G-NO₂-Pt(IV), 2G-CH₃-Pt(II), 2G-CH₃-Pt(IV) dendrimerlerinin üzerlerine ilave edildi. Karışım oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı üzerinde 1 gün boyunca karıştırılarak immobilizasyonun gerçekleşmesi sağlandı. Daha sonra dendrimerler süzülerek alındı, +4 °C'de muhafaza edildi.

Glukoz oksidaz enziminin aktivitesi, kalorimetrik Trinder metodu ile belirlenmiştir [145]. Glukoz oksidaz enzimi, çözeltide çözünmüş olarak bulunan oksijen gazı ile glukozu glukonik asite yükseltirken oksijen gazı H₂O₂'e indirgenir. Ortama boyar madde olarak 4-Aminoantipiren, fenol ve peroksidaz enzimi (HRP) ilave edilir ve pembe renkli kinonimin bileşiği oluşturulur. Aşağıda bu tepkimenin denklemi verilmektedir (Şekil 4.9.). Bu bileşiğin maksimum absorbans yaptığı dalga boyu 507 nm'dir. Enzim aktivitesi bu dalga boyundaki absorbans değişim izlenerek belirlenir.



Şekil 4.9. Trinder metoduna göre meydana gelen mekanizmanın şematik gösterimi

4.11.1. İmmobilize GOx enziminin aktifliğine pH etkisi

İmmobilize enzimin aktifliğine pH etkisini incelemek için, GOx (β -glukoz oksidaz) enzimi immobilize edilmiş dendrimerlerden 2'şer mg alınarak yedi farklı tüp içerisine konuldu. Üzerlerine 0,020 g glukoz ve pH 3,0-9,0 arasında hazırlanan tampon çözeltilerinden ilave edilip oda sıcaklığında ultrasonik su banyosunda 20 dk karıştırıldı. 4-Aminoantipiren (10 mg), fenol (20 mg) ve peroksidaz enzimi (0,5 mg) eklendikten sonra 10 dk daha karıştırılıp UV-GB spektrofotometresi ile 507 nm'deki absorbans değişimi izlendi.

Referans olarak aynı işlemler immobilize edilmemiş β -glukoz oksidaz enzimine de uygulandı. Bunun için, serbest enzim çözeltisinden 1'er mL alınıp yedi farklı tüp içerisine konuldu. Yukarıda verilen materyallerin ve işlemlerin aynısı uygulandı ve UV-GB spektrofotometresi ile 507 nm deki absorbans değişimi izlendi.

4.11.2. İmmobilize GOx enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi

İmmobilize enzimin aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek için, GOx (β -glukoz oksidaz) enzimi immobilize edilmiş dendrimerlerden 2'şer mg alınarak sekiz farklı tüp içerisine konuldu. Üzerlerine 0,020 g glukoz ve optimum pH'daki tampon çözeltisinden ilave edilip 20 °C - 90 °C sıcaklıkları arasında ısıtılmış olan ultrasonik su banyosunda 20 dk karıştırıldı. 4-Aminoantipiren (10 mg), fenol (20 mg) ve peroksidaz enzimi (0,5 mg) eklendikten sonra 10 dk daha karıştırılıp UV-GB spektrofotometresi ile 507 nm'deki absorbans değişimi izlendi.

Referans olarak aynı işlemler immobilize edilmemiş GOx (β -glukoz oksidaz) enzimine de uygulandı. Bunun için serbest enzim çözeltisinden 1'er mL alınıp sekiz farklı tüp içerisine konuldu. Yukarıda verilen materyallerin ve işlemlerin aynısı uygulandı ve UV-GB spektrofotometresi ile 507 nm deki absorbans değişimi izlendi.

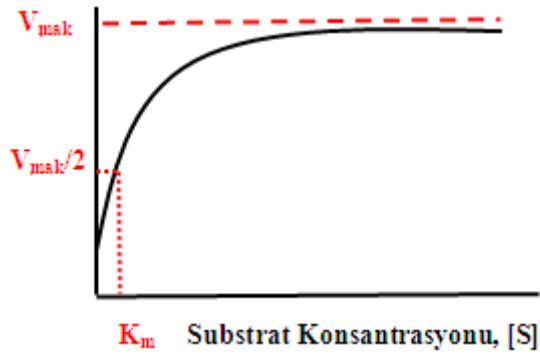
.

4.11.3. İmmobilize GOx enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Enzimle katalizlenen bir reaksiyonun hızı (V) ortamda enzim konsantrasyonunun sabit olması koşuluyla, substrat konsantrasyonu [S] ile birlikte hızla artar ve maksimum hız

(V_{mak}) değerine varıncaya kadar artış devam eder. Substrat derişimi daha fazla artırılrsa dahi reaksiyon hızı sabit kalır [146].

Enzim kinetiği yaygın şekilde Michaelis–Menten kinetik eşitliğine bağlı olarak hesaplanır. Eğer enzimin reaksiyon hızı (V), substrat konsantrasyonuna (S) karşı grafiğe geğirilirse hiperbolik bir eğri ortaya çıkar.

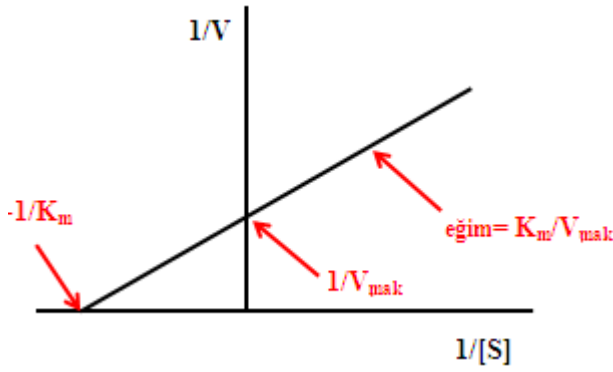


şekil 4.10. Michaelis-Menten grafiği

Enzim tepkime hızı Michaelis-Menten eşitliği ile verilir.

$$V = \frac{V_{\text{mak}} \cdot S}{K_m + S} \quad (4.1)$$

Burada, V_{mak} sistemden elde edilebilecek en yüksek reaksiyon hızıdır, enzimi doyurucu substrat konsantrasyonunda bu hıza ulaşılır. Michaelis sabiti K_m , reaksiyon hızının V_{mak} 'ın yarisı olduğu substrat konsantrasyonudur. Genelde tek substratlı biyokimyasal reaksiyonların Michaelis–Menten kinetiğine uyduğu varsayılır. V_{mak} 'ın değerini grafikten tam olarak tespit etmek zordur. Eğer Michaelis-Menten eşitliğinin her iki tarafı 1'e bölünürse *Lineweaver-Burk* eşitliği olarak adlandırılan bir doğru denklemi elde edilir. $1/S$ 'ye karşı $1/V$ grafiğe geğirilirse V_{mak} ve K_m değerleri kolaylıkla belirlenebilir.



Şekil 4.11. Lineweaver-Burk grafiği

Michaelis-Menten eşitliğinin düzenlenmesi ile *Lineweaver-Burk* bağıntısı elde edilir.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{mak}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{mak}} \quad (4.2)$$

İmmobilize enzimin aktifliğine glukoz (substrat) derişiminin etkisini incelemek için, GOx (β -glukoz oksidaz) enzimi immobilize edilmiş dendrimerlerden 2'şer mg alınarak tüplere konuldu. Üzerlerine 0,05M'lık stok glukoz çözeltisinden değişen miktarlarda (0,5-10 mL) tüplere ilave edildi. Tüplerdeki hacim toplam 10 mL olacak şekilde optimum pH'daki tampon çözeltisinden ilave edildi ve 20 dk ultrasonik su banyosunda karıştırıldı. Bir sonraki adımda 4-Aminoantipirin (10 mg), Fenol (20 mg) ve Peroksidaz enzimi (0,5 mg) eklendi ve ultrasonik su banyosunda 10 dk daha karıştırılıp 507 nm'deki absorbands değişimi izlendi. Artan substrat derişimine karşı absorbands değerleri grafiğe geçirildi. Elde edilen grafiğin denkleminde eğim bulunarak $v = \frac{A}{t} \times \left(\frac{1}{Eğim}\right)$ formülünden herbir derişim için hız değerleri hesaplandı. Daha sonra *Lineaweaver-Burk* kalibrasyon grafiği çizilerek K_m ve V_{mak} değerleri belirlendi.

Referans olarak aynı işlemler immobilize edilmemiş GOx (β -glukoz oksidaz) enzimine de uygulandı. Bunun için serbest enzim çözeltisinden 1'er mL alınıp onbeş farklı tüp içerisine konuldu. Yukarıda verilen materyallerin ve işlemlerin aynısı uygulandı ve UV-GB spektrofotometresi ile 507 nm'deki absorbands değişimi izlendi.

4.11.4. İmmobilize GOx enziminin tekrar kullanılabilirliği

İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliğini incelemek için, bir tüpe 2 mg immobilize dendrimer koyularak üzerine belirlenen optimum pH'daki tampon çözeltisinden 4 mL ve 0,020 g glukoz ilave edilip 20 dk oda sıcaklığında karıştırıldı. 4-Aminoantipiren (10 mg), fenol (20 mg) ve peroksidaz enzimi (0,5 mg) eklendikten sonra tekrar 10 dk oda sıcaklığında karıştırıldı. UV-GB spektrofotometresi yardımıyla 507 nm'deki absorbans değerleri okundu. Daha sonra tüp içerisindeki çözelti kısmı atılarak tekrar katının üzerine tampon çözelti, glukoz ve renklendiriciler ilave edilerek aynı işlemler 30 dk ara ile tekrarlandı.

Ayrıca immobilize GOx enziminin yapay üre çözeltisinde tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. Bunun için 2 mg immobilize dendrimer tartılarak deney tüpüne konuldu. Üzerine Bölüm 3.3.'de belirtildiği şekilde hazırlanan yapay üre çözeltisinden 4 mL ilave edildi. 1,26 mg glukoz katısı eklenerek 20 dk karıştırıldı. 4-Aminoantipiren (10 mg), fenol (20 mg) ve peroksidaz enzimi (0,5 mg) eklendikten sonra 10 dk daha karıştırılarak UV-GB spektrofotometresi yardımıyla 507 nm'deki absorbans değerleri okundu.

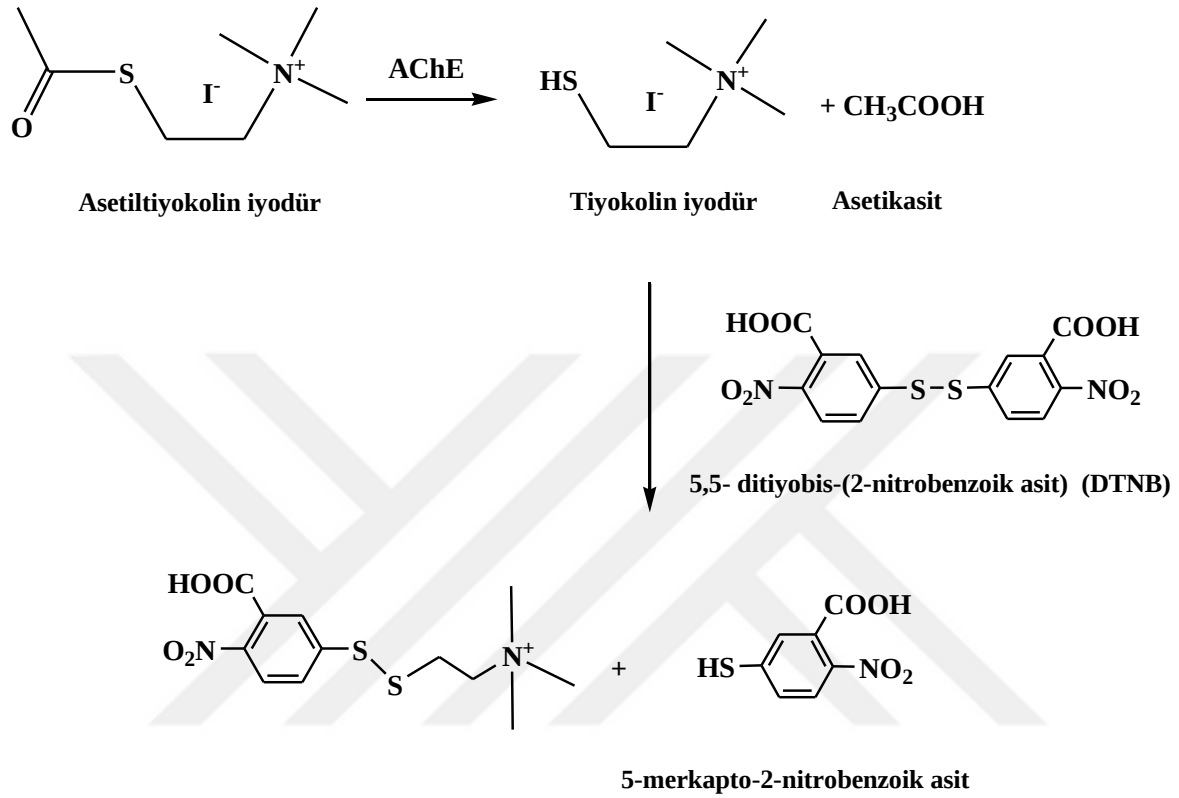
4.11.5. İmmobilize GOx enziminin depolama kararlılığı

İmmobilize enzimin depolama kararlılığı için 2 mg madde tartılarak üzerine 4 mL tampon çözelti ve 0,020 g glukoz katısı eklenerek 20 dk karıştırıldı. 4-Aminoantipiren (10 mg), fenol (20 mg) ve peroksidaz enzimi (0,5 mg) eklendikten sonra 10 dk daha karıştırılarak UV-GB spektrofotometresi yardımıyla 507 nm'deki absorbans değerleri okundu ve bu işlem her ay tekrarlandı.

4.12. Asetilkolinesteraz (AChE) Enziminin İmmobilizasyonu ve Optimizasyonu

Hazırlanan asetilkolinesteraz enzim çözeltisinden 2 mL alınarak 0,5'er gram 2G, 2G-H-Pt(II), 2G-H-Pt(IV), 2G-NO₂-Pt(II), 2G-NO₂-Pt(IV), 2G-CH₃-Pt(II), 2G-CH₃-Pt(IV) dendrimerlerinin üzerlerine ilave edildi. Karışım oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı üzerinde 1 gün boyunca karıştırılarak immobilizasyonun gerçekleşmesi sağlandı. Reaksiyon sonunda immobilize edilen dendrimerler süzülerek çözelti ortamından alındı ve +4 °C' de muhafaza edildi.

Asetilkolinesteraz enziminin aktivitesinin tayininde Ellman'ın spektrofotometrik yöntemi kullanılmıştır [147]. AChE enzimi, substratı asetiltiyokolin iyodür ile Şekil 4.12.'deki tepkimeyi vermektedir.



Şekil 4.12. Ellman metoduna göre meydana gelen mekanizmanın şematik gösterimi

Tepkime sonucunda oluşan ürün ile ortama katılan renklendirici 5,5-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) arasındaki tepkime sonucu sarı renkli bileşik (5-merkapt-2-nitrobenzoik asit) oluşmaktadır. Bu bileşiğin maksimum absorbans yaptığı dalga boyu 412'nm dir. Enzim aktivitesi bu dalga boyundaki absorbans değişim izlenerek belirlenmiştir.

4.12.1. İmmobilize AChE enziminin aktifliğine pH etkisi

İmmobilize enzimin aktifliğine pH etkisini incelemek için, AChE (asetilkolin esteraz) enzimi ile immobilize edilmiş dendrimerlerden 2'şer mg alınarak yedi farklı tüp içerisine konuldu. Üzerlerine 20 µL asetiltiyokolin iyodür ve pH 3,0-9,0 arasında hazırlanan tampon çözeltilerinden ilave edilip oda sıcaklığında ultrasonik su banyosunda 30 dk karıştırıldı.

50 µL DTNB eklendikten sonra UV-GB spektrofotometresi ile 412 nm'deki absorbans değişimi izlendi.

Referans olarak aynı işlemler immobilize edilmemiş AChE (asetilkolin esteraz) enzimine de uygulandı. Bunun için, serbest enzim çözeltisinden 2,88 µL alınıp yedi farklı tüp içerisine konuldu. Yukarıda verilen materyallerin ve işlemlerin aynısı uygulandı ve UV-GB spektrofotometresi ile 412 nm'deki absorbans değişimi izlendi.

4.12.2. İmmobilize AChE enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi

İmmobilize enzimin aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek için, AChE (asetilkolin esteraz) enzimi immobilize edilmiş dendrimerlerden 2'şer mg alınarak sekiz farklı tüp içerisine konuldu. üzerlerine 20 µL asetiltiyokolin iyodür ve optimum pH'daki tampon çözeltisinden ilave edilip 20 °C - 90 °C sıcaklıkları arasında ısıtılmış olan ultrasonik su banyosunda 30 dk karıştırıldı. 30 dakikanın sonunda 50 µL DTNB eklendikten sonra UV-GB spektrofotometresi ile 412 nm'deki absorbans değişimi izlendi.

Referans olarak aynı işlemler immobilize edilmemiş AChE (asetilkolin esteraz) enzimine de uygulandı. Bunun için, serbest enzim çözeltisinden 2,88 µL alınıp sekiz farklı tüp içerisine konuldu. Yukarıda verilen materyallerin ve işlemlerin aynısı uygulandı ve UV-GB spektrofotometresi ile 412 nm'deki absorbans değişimi izlendi.

4.12.3. İmmobilize AChE enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi

İmmobilize enzimin aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek için, AChE enzimi immobilize edilmiş dendrimerlerden 2'şer mg alınarak tüplere konuldu. Üzerlerine 0,075 M'lık stok asetiltiyokolin iyodür çözeltisinden değişen miktarlarda (10-60 µL) tüplere ilave edildi. Tüplerdeki hacim toplam 4,02 mL olacak şekilde optimum pH'daki tampon çözeltisinden ilave edildi ve ultrasonik su banyosunda 30 dk karıştırıldı. Bir sonraki adımda her tüpe 50 µL DTNB eklendi. Tüpler içerisinde substrat (asetiltiyokolin iyodür) yönünden değişik derişimlerdeki renkli çözeltilerin, UV-GB spektrofotometresi ile 412 nm'deki absorbans değişimi izlendi. *Lineaweaver-Burk* kalibrasyon grafiği çizilerek K_m ve V_{mak} değerleri belirlendi.

Referans olarak aynı işlemler immobilize edilmemiş AChE (asetilkolin esterase) enzimine de uygulandı. Bunun için, serbest enzim çözeltisinden 2,88 µL alınıp on farklı tüp içerisine konuldu. Yukarıda verilen materyallerin ve işlemlerin aynısı uygulandı ve UV-GB spektrofotometresi ile 412 nm'deki absorbans değişimi izlendi.

4.12.4. İmmobilize AChE enziminin tekrar kullanılabilirliği

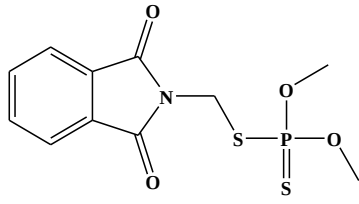
İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliğini incelemek için, bir tüpe 2 mg immobilize dendrimer koyularak üzerine belirlenen optimum pH'daki tampon çözeltisinden 4 mL ve 20 µL asetiltiyokolin iyodür ilave edilip 30 dk oda sıcaklığında karıştırıldı. Karıştırma işlemi bittikten sonra 50 µL DTNB eklenerek UV-GB spektrofotometresi ile 412 nm'deki absorbans değişimi izlendi. Daha sonra tüp içerisindeki çözelti dekante edilerek uzaklaştırıldı. Geride kalan katının üzerine aynı miktarda tampon çözelti, asetilkolin ve renklendirici ilave edilerek yukarıdaki işlemler tekrarlandı.

4.12.5. İmmobilize AChE enziminin depolama kararlılığı

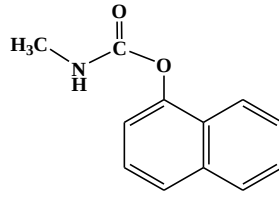
İmmobilize enzimin depolama kararlılığı ile ilgili çalışmada, bir tüp içerisine 2 mg immobilize dendrimer tartılarak üzerine optimum pH'daki tampon çözeltiden 4 mL ve 20 µL asetiltiyokolin iyodür eklenerek 30 dk karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra 50 µL DTNB eklendikten ve UV-GB spektrofotometresi ile 412 nm'deki absorbans değişimi izlendi. Bu işlem ayda bir kere olmak üzere 8 ay boyunca tekrarlandı.

4.12.6. Pestisitlerin immobilize AChE enzimi ile kalitatif tayini

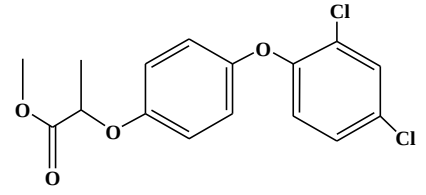
Kalitatif tayin için insektisit olarak kullanılan fosmet ve karbaril (1-naftil-N-metilkarbamat) ile herbisit olarak kullanılan diklofop-metil seçildi. Şekil 4.13.'de fosmet, karbaril ve diklofop-metil'e ait açık yapılar verildi.



Fosmet



Karbaril



Diklofop-metil

Şekil 4.13. Çalışılan pestisitlerin açık yapısı ve adlandırılmaları

İmmobilize AChE enzimi ile pestisit tayini için, beş (5) ayrı tüp içerisinde bulunan 2'şer mg immobilize dendrimer üzerine 4 mL pH 8 tamponu ve 20 µL asetiltiyokolin iyodür çözeltileri eklenerek 30 dk karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra, 50 µL DTNB eklendi ve UV-GB spektrofotometresinde 412 nm dalga boyundaki absorbans değerleri izlendi. Daha sonra yukarıda hazırlanmış olan beş ayrı tüp içerisine toplam hacim aynı olacak şekilde stok pestisit çözeltisinden sırasıyla 10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL ve 50 µL ilave edildi. Pestisit ilavesinden 30 dk sonra UV-GB spektrofotometresinde 412 nm dalga boyundaki absorbans değerleri kaydedildi.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde yapılan çalışmalar şu başlıklar altında incelenmiştir:

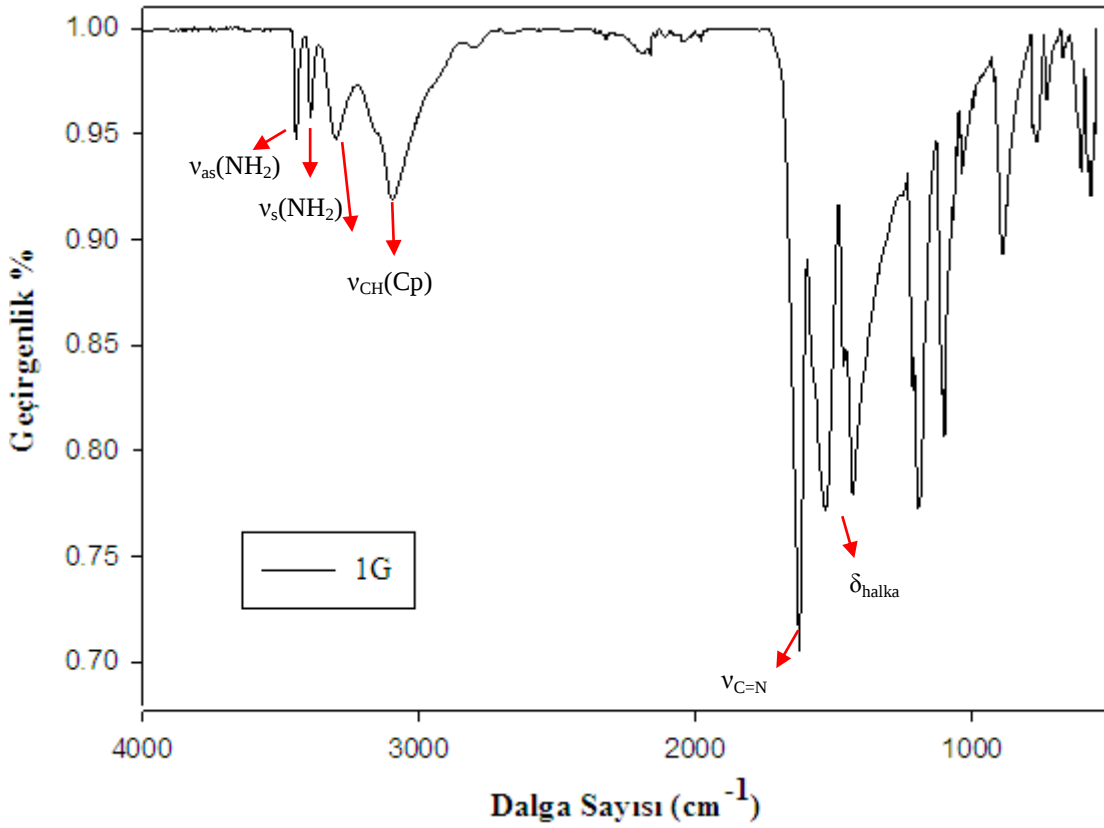
- a) Sentezlenen bileşiklerin yapıları FTIR, UV-Vis, ^1H -NMR, AAS, LC-MS, MALDI-TOF MS, TGA, molar iletkenlik ve magnetik susseptibilite ölçümleri ile aydınlatılması,
- b) Sentezlenen dendrimerlere immobilize edilen β -Glukoz oksidaz (GOx) enziminin optimizasyon çalışmaları,
- c) Sentezlenen dendrimerlere immobilize edilen asetilkolinesteraz (AChE) enziminin optimizasyon çalışmaları,
- d) İmmobilize enzimlerin uygulamaları.

5.1. Dendrimerlerin Yapı Analizi

Sentezlenen birinci ve ikinci jenerasyon dendrimerler ile metal içeren geniştilmiş ikinci jenerasyon dendrimerlerin yapı analizi için gerekli spektroskopik yöntemlerle birlikte molar iletkenlik ve magnetik susseptibilite ölçümlerinden yararlanılmıştır.

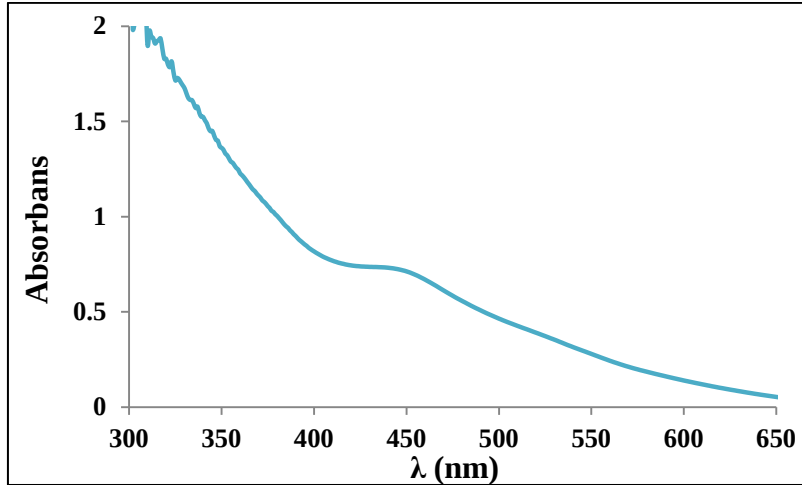
5.1.1. Birinci jenerasyon 1G dendrimerinin yapı analizi

Sentezlenen 1G dendrimerinin FTIR spektrumu Şekil 5.1.'de verilmektedir. Spektrumda gözlenen karakteristik IR titreşim bandları şöyledir: NH_2 grubuna ait $\nu_{(\text{NH})}$ asimetrik ve simetrik gerilme titreşimi 3465 ve 3420 cm^{-1} 'de, azometin grubuna ait $\nu_{(\text{C}=\text{N})}$ gerilme titreşimi 1648 cm^{-1} 'de gözlemlendi. Ayrıca, ferrosen molekülüne ait δ_{halka} halka gerilme titreşimi 1423 cm^{-1} 'de ve δ_{CCH} düzlem içi bükülme titreşimi 1210 cm^{-1} 'de, gözlenmiştir [148].



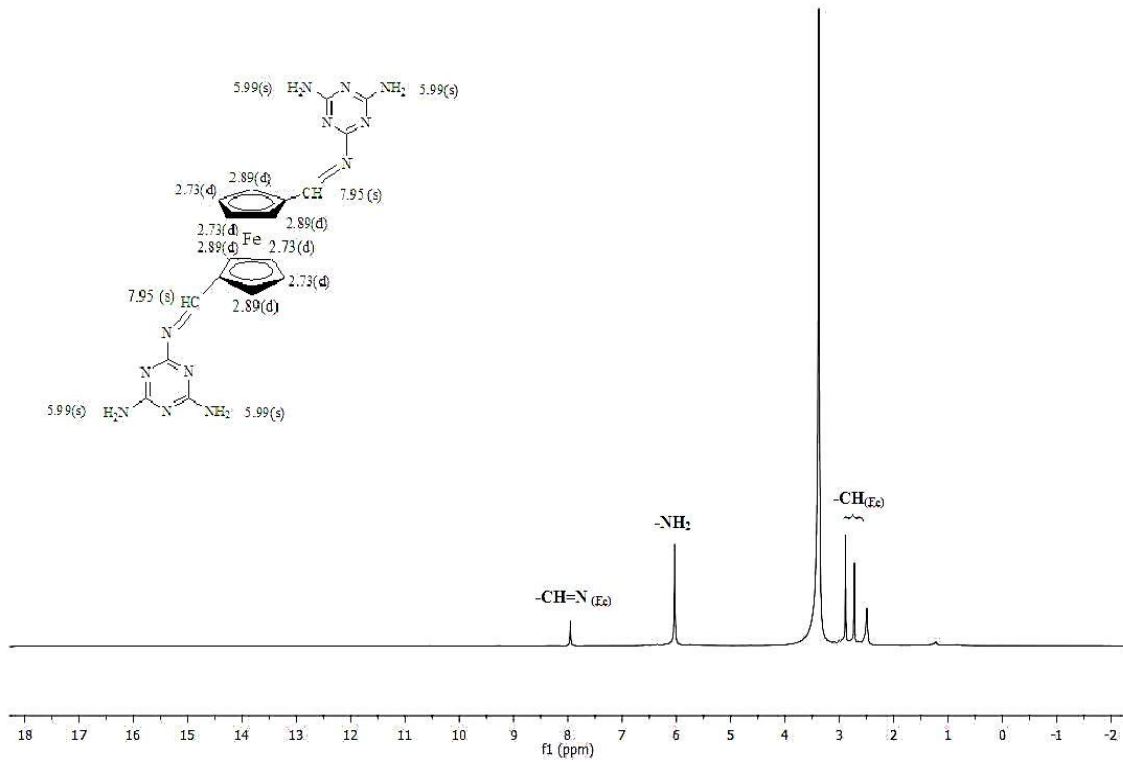
Şekil 5.1. Birinci jenerasyon dendrimere (1G) ait FTIR spektrumu

Birinci jenerasyon dendrimerin elektronik absorpsiyon (UV-GB) spektrumu Şekil 5.2.'de verilmektedir. Bu spektrumda $\sigma \rightarrow \sigma^*$ geçişi 203 nm'de şiddetli bir band olarak gözlenmiştir. Kaynaklar incelendiğinde, $\sigma \rightarrow \sigma^*$ geçişine ait bandın 190 nm dalga boyunda çıktığı görülmektedir [149]. Fakat yapıdaki konjugasyondan dolayı bu band daha yüksek dalga boyunda kaymıştır. $\pi \rightarrow \pi^*_{(bnz)}$ geçişi 229 nm'de şiddetli bir band, $n \rightarrow \pi^*_{(C=N)}$ geçişi 251 nm'de ve ferrosene ait $d \rightarrow d_{(Fc)}$ geçişi ise 433 nm'de zayıf bir band olarak gözlenmiştir [150].



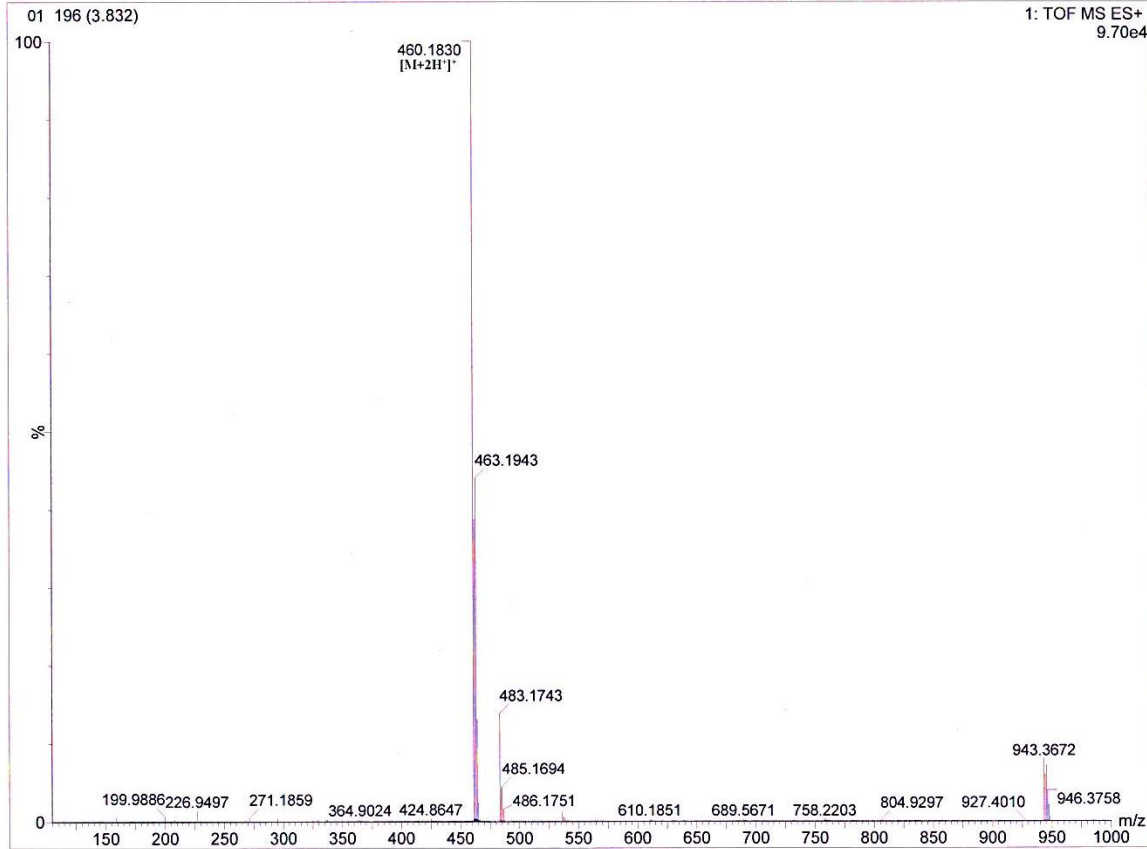
Şekil 5.2. Birinci jenerasyon dendrimere (1G) ait UV-GB spektrumu

Sentezlenen birinci jenerasyon dendrimerin DMSO- d_6 'da alınan ^1H -NMR spektrumu Şekil 5.3.'de verildi. Burada, $\text{CH}=\text{N}$ protonu 7,95 ppm'de tekli pik (s, 2H) ve NH_2 protonuna ait pik 5,99 ppm'de tekli pik (s, 8H) olarak gözlemlendi [151]. Ferreosen H atomlarına ait pikler ise 2,89 ppm'de ikili (d, 4H) ve 2,73 ppm'de (d, 4H) ikili pik olarak gözlemlenmiştir.



Şekil 5.3. Birinci jenerasyon dendrimere (1G) ait ^1H -NMR spektrumu

Birinci jenerasyon dendrimer 1G'nin kütle spektrumu Şekil 5.4.'de verilmektedir. LC-MS spektrumu incelendiğinde moleküler iyon piki $[M+2H]^+$: 460,1830 (m/z: %100) de gözlemlendi.



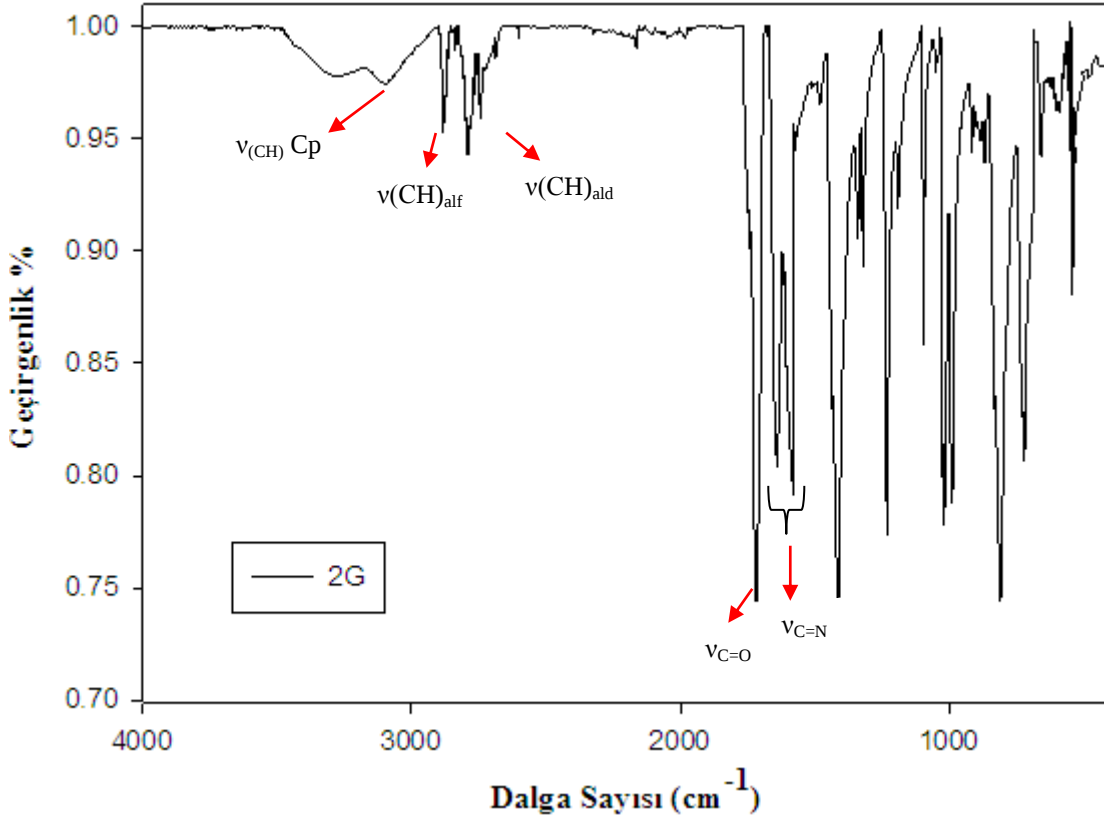
Şekil 5.4. Birinci jenerasyon dendrimere (1G) ait LC-MS spektrumu

5.1.2. İkinci jenerasyon 2G dendrimerinin yapı analizi

2G dendrimerinin FT-IR spektrumu Şekil 5.5.'de verilmektedir. Spektrum incelendiğinde, 1G dendrimerine ait 3465 ve 3420 cm^{-1} 'deki $\nu_{\text{(NH}_2\text{)}}$ titreşim bantlarının kaybolduğu gözlenmektedir. 2G dendrimerinde uç aldehitlere ait $\nu_{\text{(C=O)}}$ gerilme titreşimi keskin bir bant olarak 1714 cm^{-1} 'de gözlemlendi.

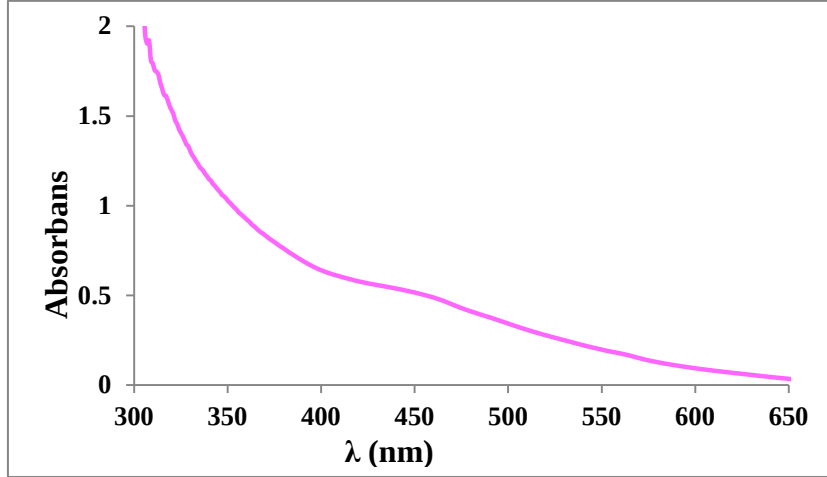
1G dendrimerinde 1648 cm^{-1} 'deki $\nu_{\text{(C=N)}}$ gerilme titreşimi 2G dendrimerinde az miktarda düşük dalga sayısına kayarak 1645 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. 1635 cm^{-1} 'de ortaya çıkan yeni band ise 2G dendrimerinde oluşan yeni imin grubuna ait ν_{CN} gerilme titreşimine atfedilmiştir [152]. 1G de ferrosen halkasına ait δ_{halka} (1423 cm^{-1}) titreşimi 2G de düşük dalga sayısına kayarak 1410 cm^{-1} 'de gözlenirken δ_{CCH} (1210 cm^{-1}) düzlem içi bükülme

titreşimi yüksek dalga sayısına kayarak 1226 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. Bu durum ferrosen halkasının 2G molekülünde elektronik çevresinin değiştiğini göstermektedir.



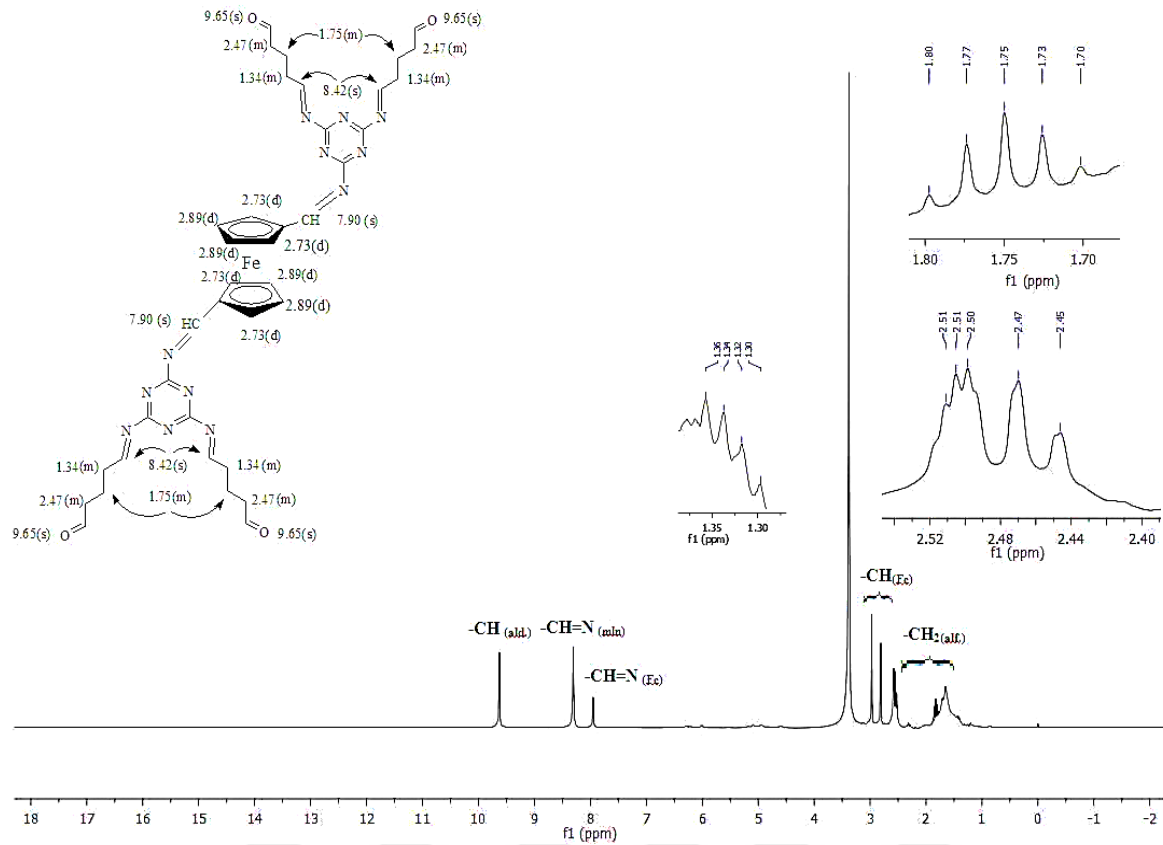
Şekil 5.5. İkinci jenerasyon dendrimere (2G) ait FTIR spektrumu

2G dendrimerine ait UV-GB spektrumu Şekil 5.6.'da verilmektedir. 2G dendrimerinin spektrumunun 1G ile çok benzer olduğu görülmüştür. Bu spektrumda da $\sigma \rightarrow \sigma^*$ geçişi 201 nm 'de şiddetli bir band; $\pi \rightarrow \pi^*_{(\text{bnz})}$ geçişi 231 nm 'de şiddetli bir band, $n \rightarrow \pi^*_{(\text{C=N})}$ geçişi 255 nm 'de, $n \rightarrow \pi^*_{(\text{C=N})}$ geçişi 292 nm 'de ve ferrosene ait $d \rightarrow d_{(\text{Fc})}$ geçişi ise 438 nm 'de zayıf bir band olarak gözlenmiştir [150].



Şekil 5.6. İkinci jenerasyon dendrimere (2G) ait UV-GB spektrumu

2G dendrimerinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu Şekil 5.7.'de verilmektedir. 1G dendrimerinin 5,99 ppm'de gözlenen NH_2 protonuna ait tekli pikin kaybolduğu gözlenmiştir. 1G dendrimerinin 7,95 ppm'de gözlenen imin protonuna ait tekli pik, 2G dendrimerinin spektrumunda 7,90 ppm (s, 2H) de tekli pik olarak gözlemlendi. Ayrıca 2G'ye ait yeni imin protonu 8,42 ppm'de tekli pik olarak gözlemlendi. 2G'nin uç aldehit protonları ise 9,65 ppm'de tekli pik olarak gözlemlendi. 1G dendrimerinde ferrosen halkasına ait iki tane ikili pik (2,89 ppm'de ikili ve 2,73 ppm'de ikili) 2G'nin spektumunda da aynı yerde gözlenmiştir. C=N ve C=O grupları arasındaki üç karbon atomlu alifatik zincirin proton pikleri 2,47-1,34 ppm arasında gözlenmiştir. C=O grubuna bağlı CH_2 protonları 2,47 ppm'de çoklu pik olarak gözlenmekte ve DMSO çözücüsünün pikleri ile kısmen örtüşmektedir. 1,75 ppm'de gözlenen çoklu pikin ortadaki CH_2 grubuna ait olduğu düşünülmektedir.

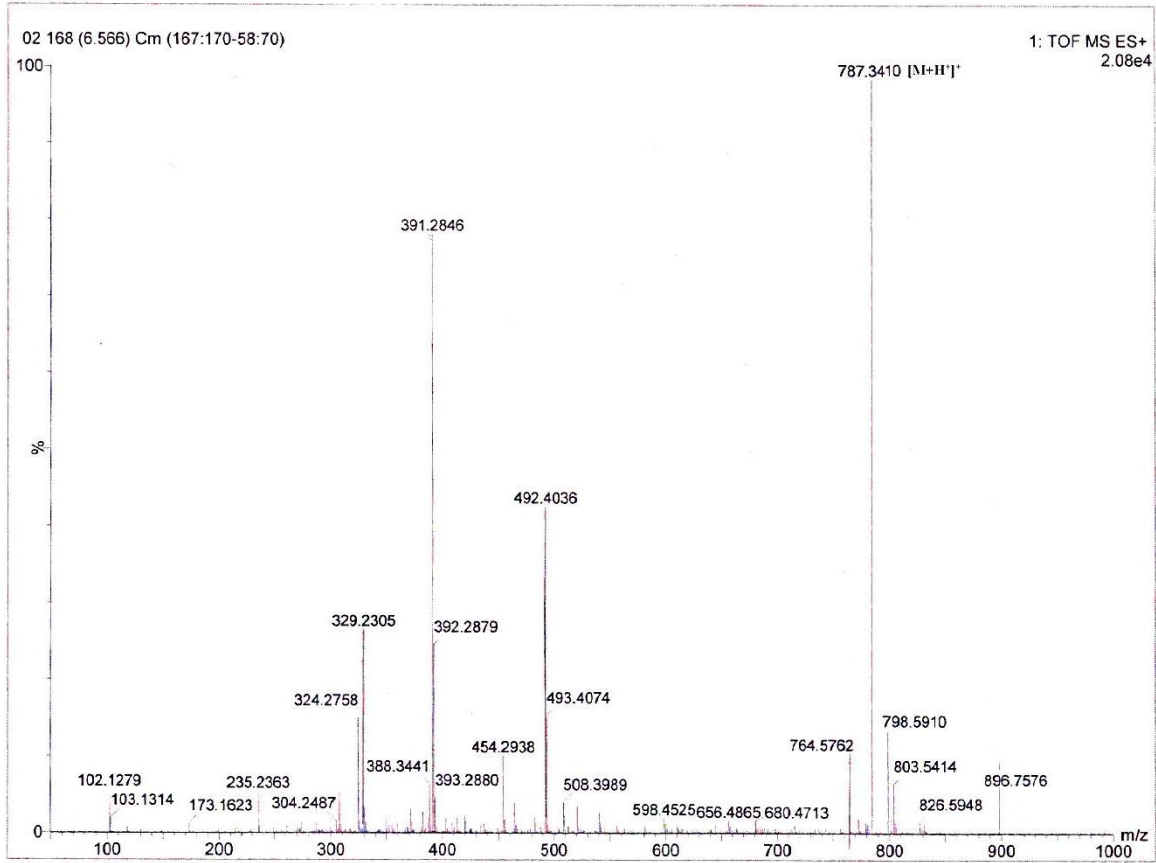


Şekil 5.7. İkinci jenerasyon dendrimere (2G) ait ^1H -NMR spektrumu

Çizelge 5.1. 1G ve 2G dendrimerleri için ^1H -NMR spektrumları

Bileşikler	-H-C=O	-HC=N	-NH ₂	-CH _(Ar)	-CH _(alf)
1G	-	7,95 (s,2H) -	5,99 (s,8H)	2,73 (d,4H) 2,89 (d,4H)	-
2G	9,65 (s, 4H)	7,90 (s,2H) 8,42 (s,4H)	-	2,73 (d,4H) 2,89 (d,4H)	1,75(m,2H) 1,34(m,2H) 2,47(m,2H)

İkinci jenerasyon dendrimer (2G) için LC-MS spektrumu incelendiğinde moleküler iyon piki $[\text{M}+\text{H}^+]^+$: 787,3410 (m/z: %100) olarak belirlendi. Şekil 5.8.'de 2G dendrimerine ait LC-MS spektrumu verilmektedir.



Şekil 5.8. İkinci jenerasyon dendrimere (2G) ait LC-MS spektrumu

5.1.3. Genişletilmiş ikinci jenerasyon dendrimerlerin yapı analizi

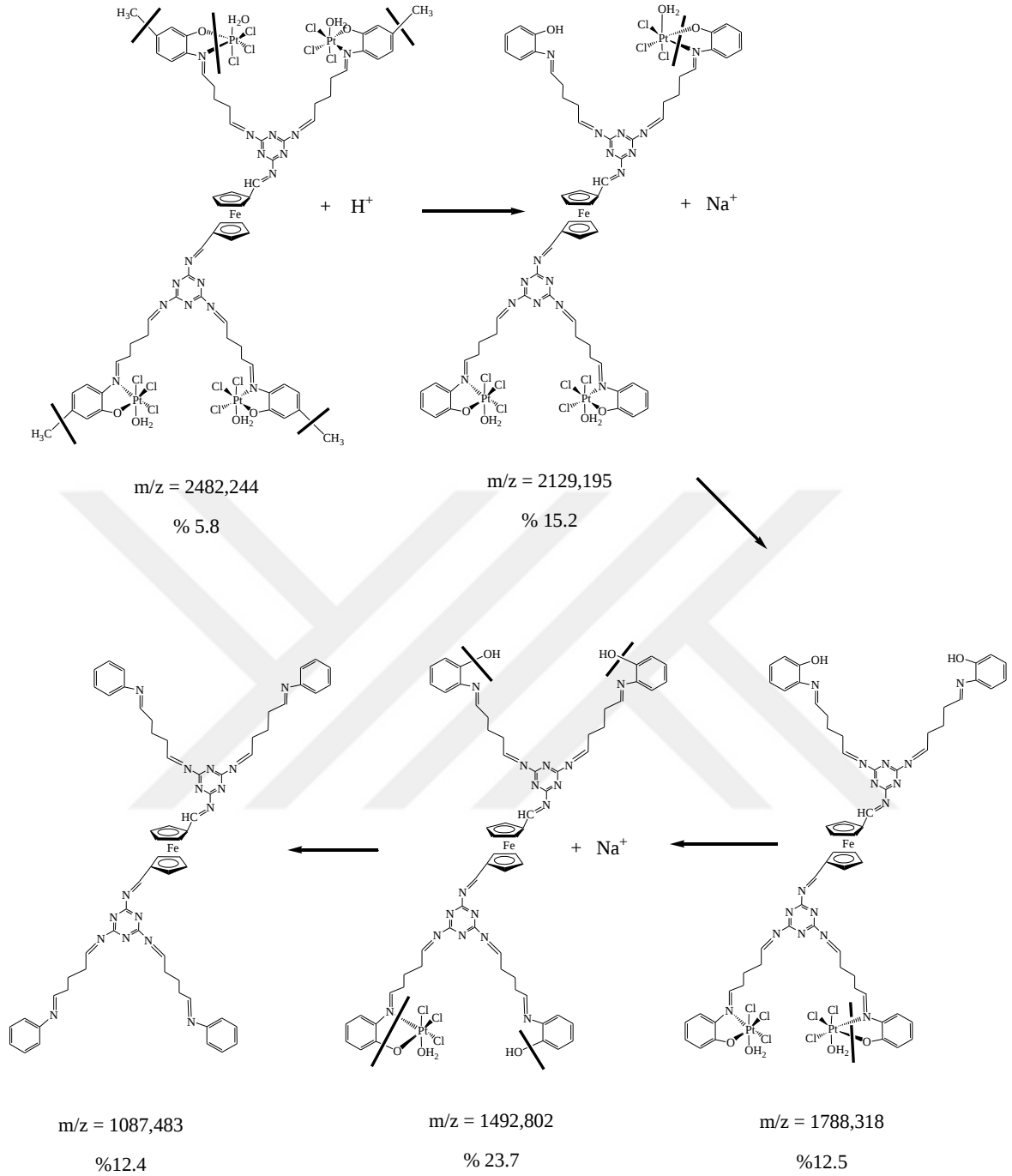
İkinci jenerasyon dendrimere üç farklı aminofenol (2-aminofenol, 2-amino-5-nitrofenol ve 2-Amino-5-metilfenol) katılarak “kalıp” yöntemi ile Pt(II) ve Pt(IV) kompleksleri sentezlendi.

Elde edilen bileşiklerin pek çok çözücude çözünürlüğü düşük olduğu için ¹H-NMR spektrumları alınamadı. Bu nedenle yapıları FTIR, UV-Vis, MALDI-TOF MS, element analizi, AAS, molar iletkenlik ve manyetik duyarlılık ölçümleri ile aydınlatıldı.

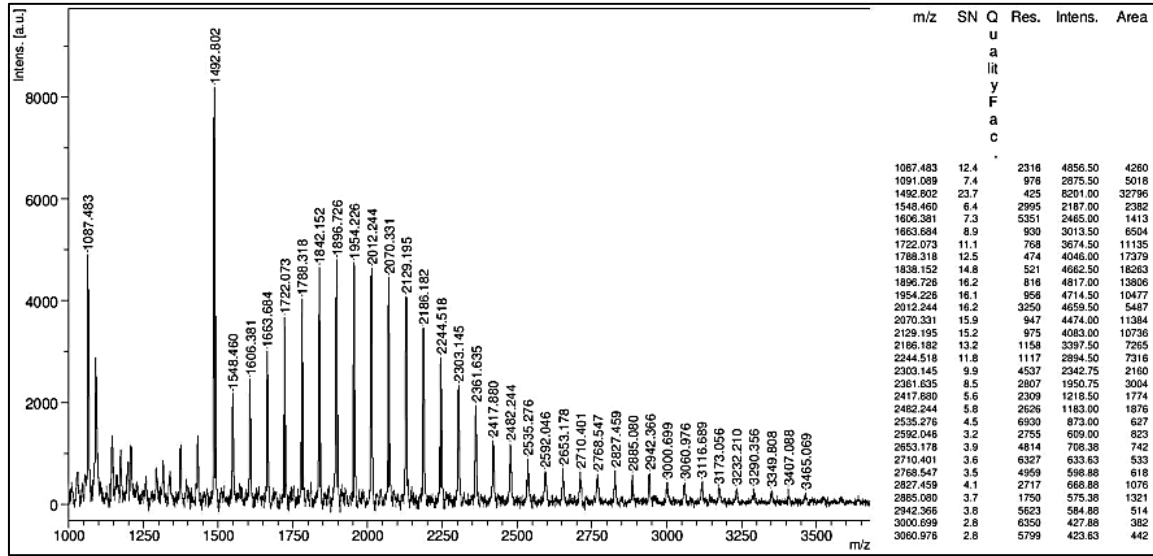
Pt(II) ve Pt(IV) içeren dendrimerlerin iletkenlik ölçümleri Bölüm 3.1.’de anlatıldığı gibi yapıldı ve sonuçları Çizelge 4.1.’de verildi. 5×10^{-4} M DMF çözeltisinde ölçülen iletkenliklere göre bütün dendrimerlerin elektrolit olmadığı (non-elektrolitik) olduğu görüldü [144]. Buna göre Pt(II) ve Pt(IV) komplekslerinin nötr yapıya sahip olduğu öngörüldü.

Pt(II) ve Pt(IV) içeren dendrimerlerin manyetik duyarlılık ölçümleri Bölüm 3.1.'de anlatıldığı gibi yapıldı ve sonuçları Çizelge 4.1.'de verildi. Ölçüm değerleri bütün dendrimerlerin diyamanyetik olduğunu gösterdi. Buna göre Pt(II) komplekslerinin elektron konfigürasyonlarının $5d^8$ ve geometrisinin karedüzlem, buna karşılık Pt(IV) komplekslerinin elektron konfigürasyonlarının $5d^6$ ve geometrisinin oktahedral (düşük spin) olduğunu öngörmek mümkündür.

İkinci jenerasyon dendrimerlerden sadece 2G-CH₃-Pt(IV)'ün MALDI-TOF MS spektrumu alınabilmiştir. Kompleksin fragmentasyon şeması Şekil 5.9.'da, MALDI-TOF MS spektrumu ise Şekil 5.10.'da verilmiştir. 2G-CH₃-Pt(IV) için moleküler iyon piki $[M+H]^+$ şeklinde $m/z = 2482,244$ (5,8%) de gözlenmiştir. Bazı fragmentler ise şöyledir: $m/z = 2129,195$ (15,2%) $[M-C_4H_{13}Cl_3OPt+Na]^+$; $m/z = 1788,318$ (12,5%) $[M-C_4H_{14}Cl_6O_2Pt_2]^+$; $m/z = 1492,802$ (23,7%) $[M-C_4H_{15}Cl_9O_3Pt_3+Na]^+$ ve $m/z = 1087,483$ (12,4%) $[M-C_4H_{20}Cl_{12}O_8Pt_4]^+$. Buna göre Pt(IV) kompleksinde dört Pt atomu ve bir dendrimerin bulunduğu, Pt₄L molekül formülüne sahip olduğu öngörülebilir.



Şekil 5.9. 2G-CH₃-Pt(IV) dendrimerinin şematik fragmentasyonu



Şekil 5.10. 2G-CH₃-Pt(IV) dendrimerinin MALDI-TOF MS spektrumu

Genişletilmiş ikinci jenerasyon dendrimerlerin elektronik absorpsiyon (UV-GB) spektrumları Şekil 5.11.'de, spektrumlardaki bandlara karşılık gelen dalga boyları Çizelge 5.2.'de verilmiştir.

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

Bileşik	$\lambda_{\max}$ (10^{-4} M DMF)					
	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	$\pi \rightarrow \pi^*_{(\text{bnz})}$	$\pi \rightarrow \pi^*_{(\text{C=N})}$	$n \rightarrow \pi^*_{(\text{C=N})}$	$d \rightarrow d_{(\text{Fc})}$	$d \rightarrow d_{(\text{M})}$
1G	203	229	251	288	433	-
2G	201	231	255	292	438	-
2G-H-Pt(II)	208	232	254	301	436	-
2G-NO ₂ -Pt(II)	201	234	253	300	389	-
2G-CH ₃ -Pt(II)	202	231	254	302	433	-
2G-H-Pt(IV)	206	233	257	298	412	(536)*
2G-NO ₂ -Pt(IV)	207	231	257	296	392	(549)*
2G-CH ₃ -Pt(IV)	205	230	252	298	430	(539)*

(*) : 10^{-3} M DMF

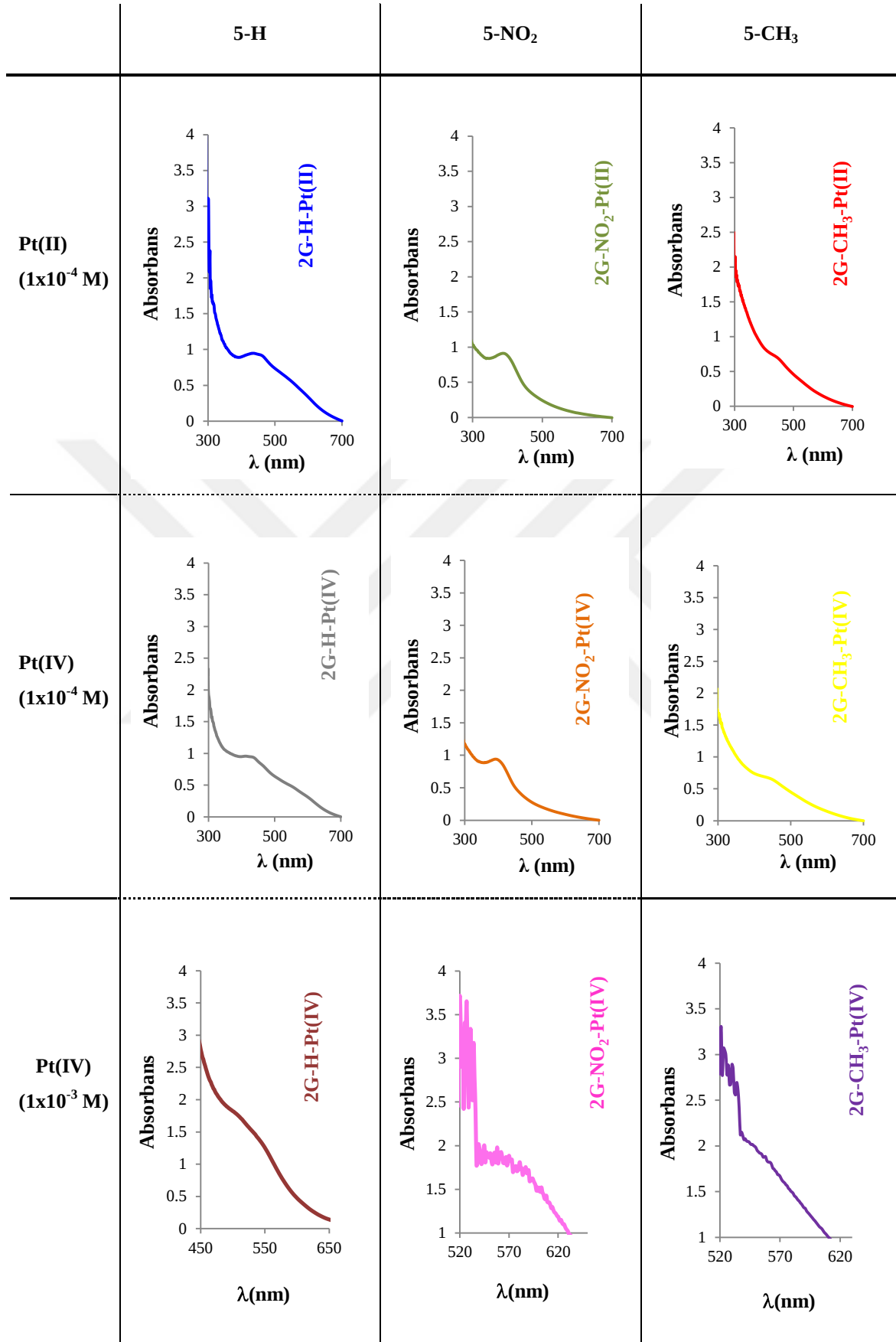
Dendrimerlerin UV spektrumundaki bandların işaretlenmesinde literatürdeki benzer bileşiklerin yorumları temel alınmıştır. Genişletilmiş ikinci jenerasyon dendrimerlerine ait $\sigma \rightarrow \sigma^*$ geçişi 201-208 nm aralığında gözlenmiştir. Benzen halkasına ait $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişleri 230-234 nm arasında, imin grubuna ait $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişleri ise 252-257 nm arasında gözlenmiştir [149].

Ligandlarla (1G ve 2G) kıyasladığımızda özellikle imin grubuna ait $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişlerinin kompleks oluşumu ile daha yüksek dalga boyuna kaydığı gözlenmektedir. Ligandlardaki $n \rightarrow \pi^*_{(C=N)}$ geçişleri 288-292 nm aralığında gözlenmiştir. Benzer şekilde kompleks oluşumu ile bu bantlar da yüksek dalga boyuna kaymaktadır (296-302 nm). Bu kaymalar Schiff bazının metale imin azotu üzerinden bağlandığını gösterir.

Ferrosene ait $d \rightarrow d_{(Fe)}$ geçişleri 389-438 nm aralığında gözlemlendi [153]. Kompleks oluşumu ile bu bantlar kısmen düşük dalga boyuna kaymaktadır. En çok kayma nitro grubu taşıyan Pt(II) ve Pt(IV) komplekslerinde gözlenmiştir.

Dendrimerlerde Pt(IV) iyonuna ait $d \rightarrow d$ geçişler ancak yüksek derişimde (1×10^{-3} M) gözlenebilmiştir. 536-549 nm aralığında gözlenen bu geçişler oktahedral geometriye sahip Pt^{+4} iyonu içeren komplekslerdeki geçişler ile benzerlik göstermektedir [154]. Kare düzlem Pt(II) komplekslerinde gözlenen $d \rightarrow d$ geçişleri [155] dendrimerlerimizde gözlenememiştir. Çünkü ferrosene ait bantlar ile örtüşme göstermektedir.

Metal içeren dendrimerlerin TGA eğrileri Ek 1-6'da verilmektedir. TGA eğrileri incelendiğinde tüm dendrimerlerin tek kademedede bozunduğu gözlenmiş ve bozunma sıcaklığının 360-510 °C aralığında değiştiği görülmüştür. Dendrimerlerin TGA eğrilerinde 100 °C'nin altında bozunma sıcaklığı ve kütle kaybı görülmemiştir. Bu durum dendrimerlerde kristal suyunun olmadığını düşündürmüştür.



Şekil 5.11. Genişletilmiş 2. jenerasyon dendrimerlere ait UV-GB spektrumları

Genişletilmiş ikinci jenerasyon dendrimerlerine ait karakteristik IR titreşim bandları Çizelge 5.3.'de verilirken FTIR spektrumları şekil 5.12-5.17.'de verilmektedir.

2G dendrimerlerindeki uç aldehitlere ait $\nu_{(C=O)}$ gerilmesine ait 1714 cm^{-1} 'de ki bandın kompleks oluşumu ile kaybolması, uç aldehitlerin 2-aminofenol ve türevleri ile tepkimeye girdiğini göstermektedir. Metal içeren dendrimerlerin tümünde $3320\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ arasında gözlenen geniş bandlar koordinasyon suyuna ait $\nu_{(O-H)}$ gerilme ve $1605\text{-}1595\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen bandlar δ_{H_2O} bükölme titreşimlerine aittir. [156]. 2G dendrimerinde 1645 cm^{-1} ve 1635 cm^{-1} 'de imine ait iki tane $\nu_{C=N}$ gerilme titreşimi mevcuttur. Pt içeren dendrimerlerde ayrıca $1627\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$ 'de yeni imin bantı gözlenmiştir. Bu imin bantının ortaya çıkması 2-aminofenol ile uç aldehitlerin tepkimeye girdiğini göstermektedir. Ayrıca bu bandın düşük dalga sayısında gözlenmesi bu imindeki azot atomunun platin ile koordinasyona girdiğini göstermektedir [155]. N atomu üzerinden metale aktarılan elektronlar $C=N$ bağının zayıflamasına ve bağ kuvvetinin azalmasına neden olur.

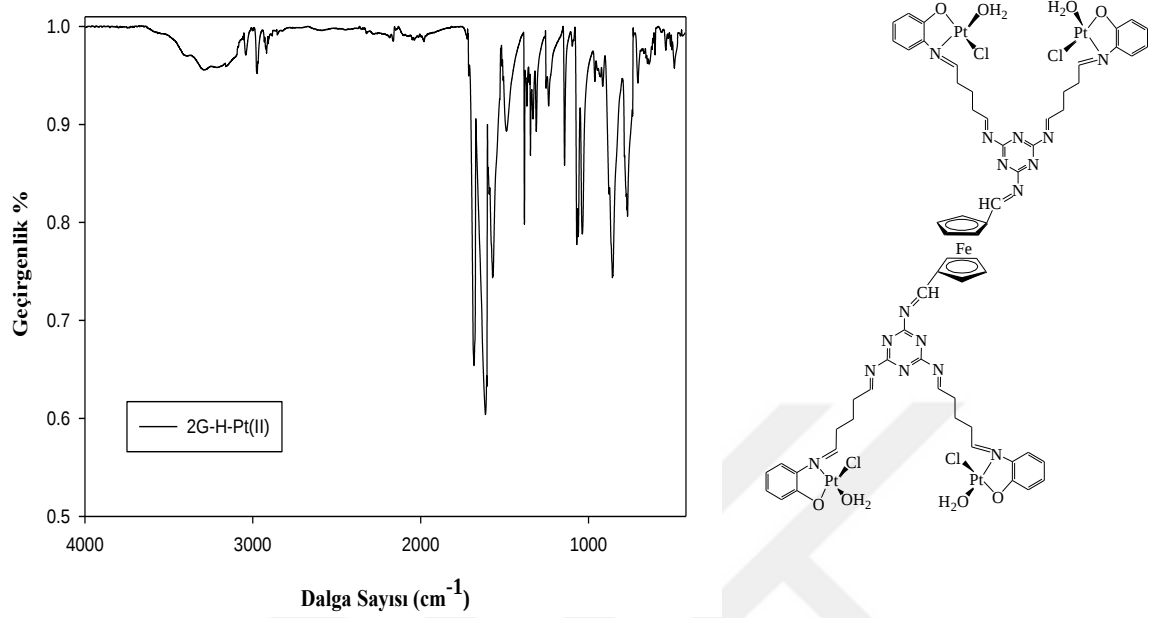
Literatür verilerine göre $\nu_{(C-O)}$ gerilme titreşimi $1300\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ aralığında görölen keskin ve şiddetli bir banttır [156]. Dendrimerlerimizde bu titreşimler $1279\text{-}1235\text{ cm}^{-1}$ aralığında şiddetli bantlar olarak görölmüştür.

Metal içeren dendrimerlerin IR spektrumlarındaki titreşimlerinin düşük frekans bölgesinde M-N ve M-O titreşim bandlarının belirlenmesi çok kolay değildir. Literatür verilerine göre $571\text{-}554\text{ cm}^{-1}$ ve $520\text{-}483\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen yeni bantlar $\nu_{(Pt-O)}$ ve $\nu_{(Pt-N)}$ titreşimleri olarak şaretlenmiştir. Bu ilave bantlar Schiff bazının O ve N verici atomları ile platin atomuna koordine olduğunu göstermektedir [157, 158].

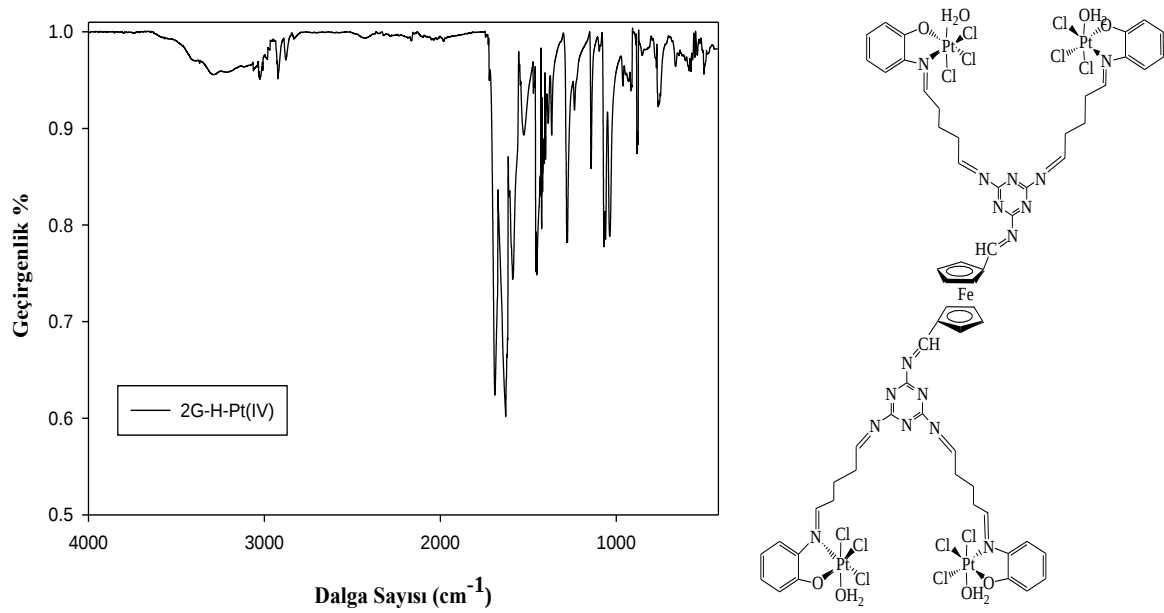
$1600\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ arasında gözlenen çoklu keskin pikler aromatik $C=C$ titreşim frekansına (ν_{halka}) aittir. Tüm dendrimerlerde alifatik $\nu_{(C-H)}$ titreşimlerin $2916\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$ aralığında, aromatik $\nu_{(C-H)}$ titreşimleri ise $3055\text{-}3028\text{ cm}^{-1}$ aralığında gözlendi. Ligandlarla kıyaslandığında, metal içeren dendrimerlerde aromatik ve alifatik C-H gerilme titreşimlerinde çok büyük bir kayma meydana gelmemiştir.

2G- NO_2 -Pt(II) dendrimerinde 1500 cm^{-1} ve 1300 cm^{-1} 'de, 2G- NO_2 -Pt(IV) dendrimerinde 1510 ve 1320 cm^{-1} 'de gözlenen bantlar $\nu_{\text{as}(\text{NO}_2)}$ ve $\nu_{\text{sim}(\text{NO}_2)}$ titreşiminden kaynaklanmaktadır

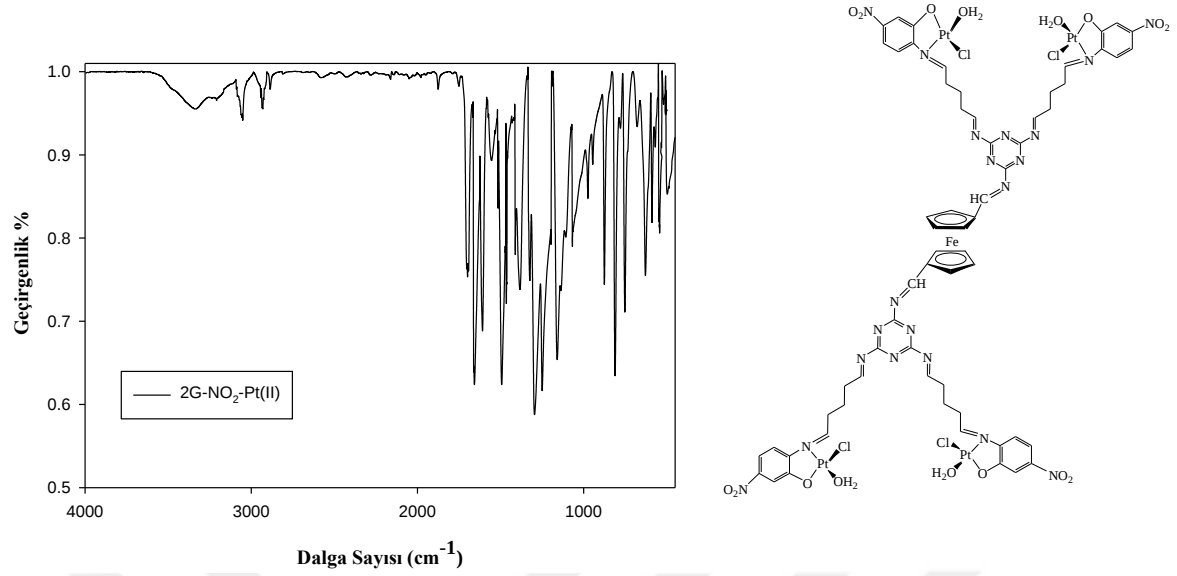
[159]. Ayrıca 2G-CH₃-Pt(II) ve 2G-CH₃-Pt(IV) dendrimerlerine ait spektrumda 2982 ve 2978 cm⁻¹'de görülen bandlar $\nu_{as}(\text{CH}_3)$ asimetrik gerilmesine ait olduğu düşünülmektedir.



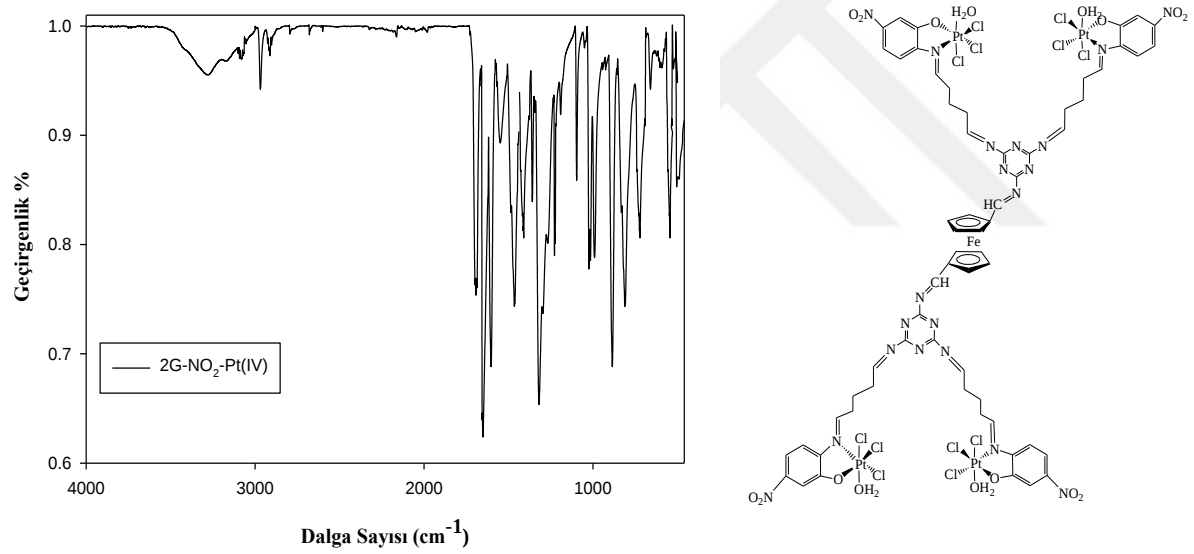
Şekil 5.12. 2G-H-Pt(II) dendrimerine ait FT-IR spektrumu



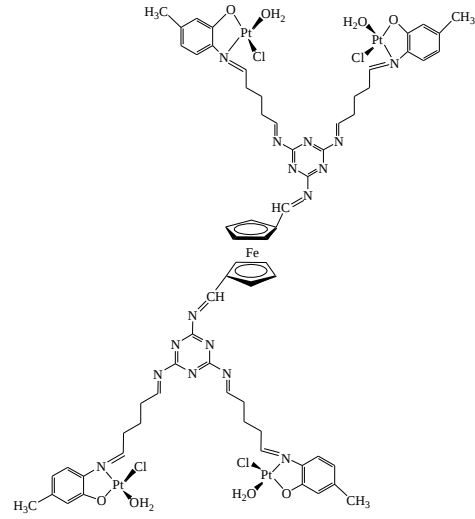
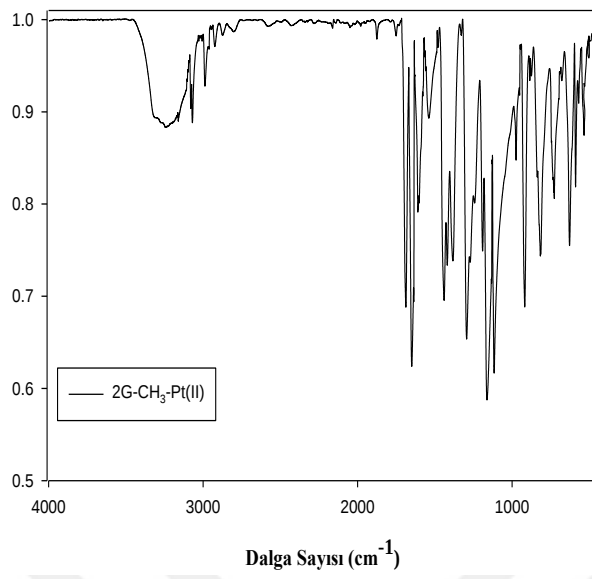
Şekil 5.13. 2G-H-Pt(IV) dendrimerine ait FT-IR spektrumu



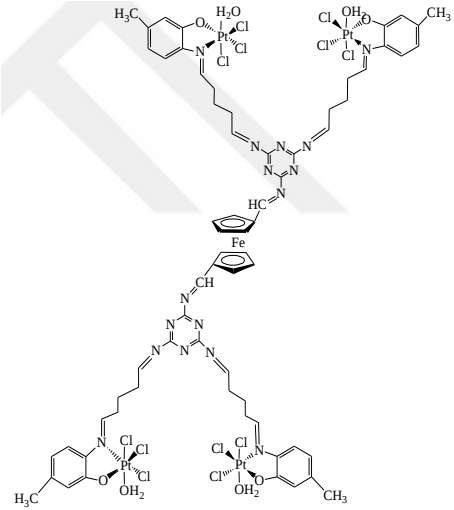
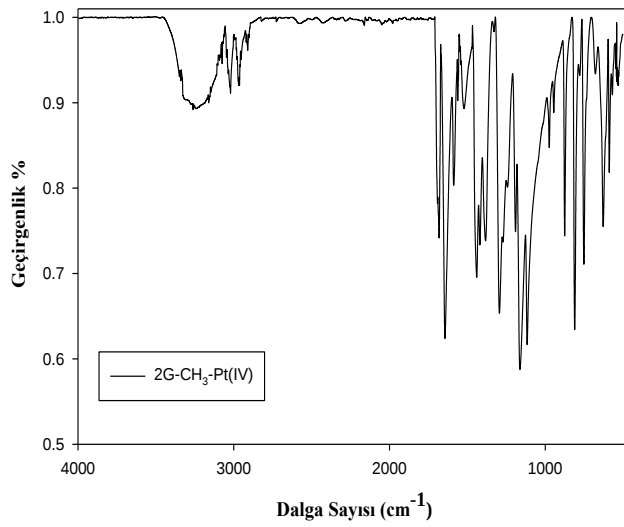
Şekil 5.14. 2G-NO₂-Pt(II) dendrimerine ait FT-IR spektrumu



Şekil 5.15. 2G-NO₂-Pt(IV) dendrimerine ait FT-IR spektrumu



Şekil 5.16. 2G-CH₃-Pt(II) dendrimerine ait FT-IR spektrumu



Şekil 5.17. 2G-CH₃-Pt(IV) dendrimerine ait FT-IR spektrumu

Çizelge 5.3. Sentezlenen dendrimerlerin önemli IR titreşim frekansları (cm⁻¹)

Bileşik	V _{NH(asm-sim)}	V _{C=O}	V _{-CH (ald)}	V _{-CH=N}	V _{OH}	V _{(C-H)alf}	V _{(C-H)aro}	V _(C-O)	V _{NO2}	V _{CH3}	V _{Pt-O}	V _{Pt-N}	δ _{H2O}	δ _{C-C(bht)}	δ _{CCH}
1G	3465,3420	-	-	1648	-	-	3070	-	-	-	-	-	-	1423	1210
2G	-	1714	2750, 2800	1645 1635	-	2900	3075	-	-	-	-	-	-	1410	1226
2G-H-Pt(II)	-	-	-	1640 1635 1624	3298	2910	3032	1272	-	-	560	484	1605	1440	1234
2G-H-Pt(IV)	-	-	-	1637 1626 1620	3200	2916	3048	1264	-	-	571	492	1600	1455	1240
2G-NO ₂ -Pt(II)	-	-	-	1638 1630 1622	3316	2915	3053	1235	1300, 1500	-	561	483	1595	1458	1242
2G-NO ₂ -Pt(IV)	-	-	-	1640 1625 1620	3320	2914	3055	1242	1320, 1510	-	563	486	1600	1456	1245
2G-CH ₃ -Pt(II)	-	-	-	1635 1630 1625	3239	2900	3040	1270	-	2982	554	520	1602	1436	1232
2G-CH ₃ -Pt(IV)	-	-	-	1630 1625 1627	3270	2908	3028	1279	-	2978	558	514	1605	1438	1227

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

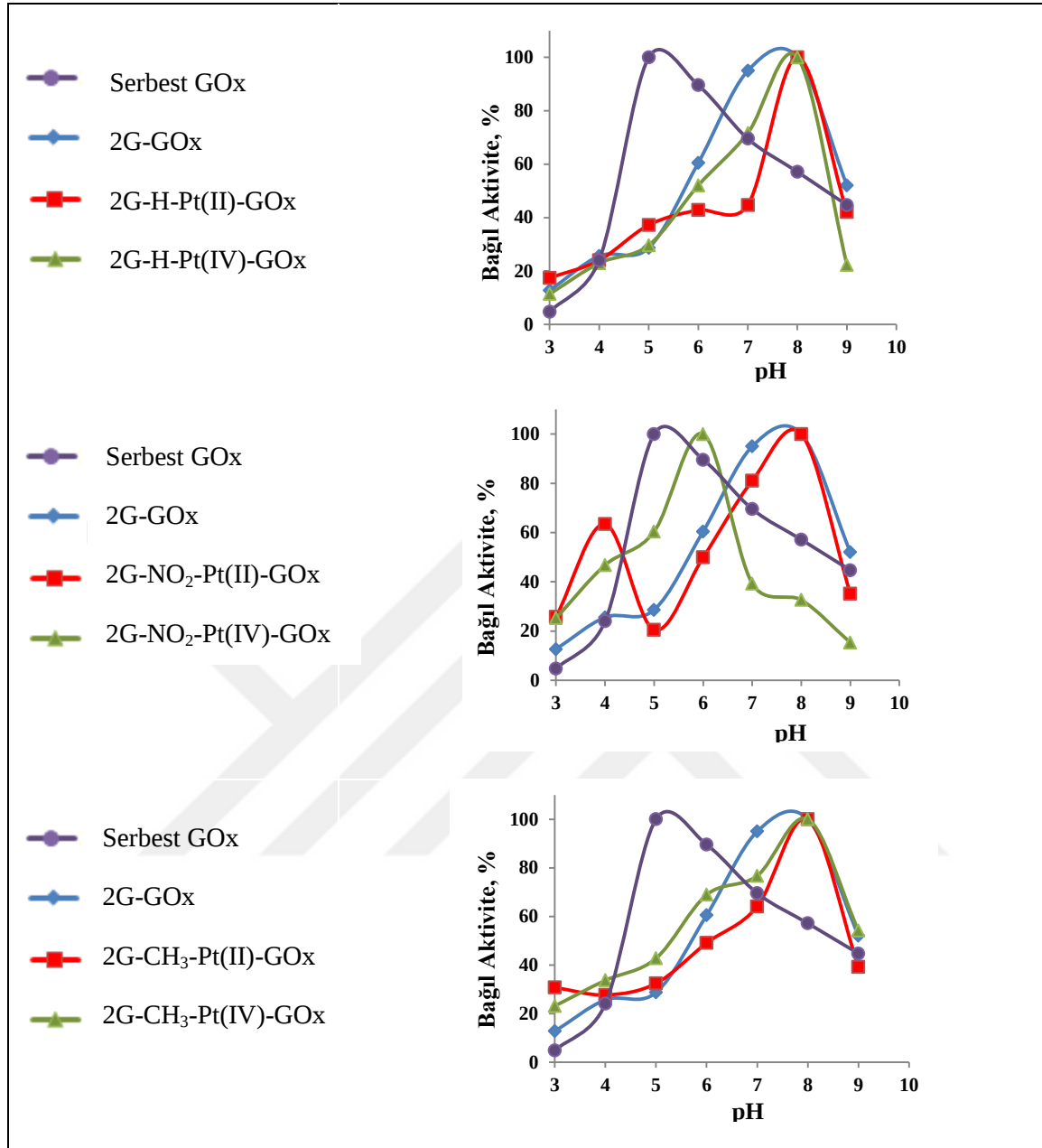
β -Glukoz oksidaz (GOx) enziminin immolizasyonu Bölüm 4.11.'de ayrıntı bir şekilde verilmektedir. İmmobilize enzimin optimizasyonunda pH, sıcaklık ve derişim parametreleri incelenmiştir.

5.2.1. İmmobilize β -Glukoz oksidaz enziminin aktifliğine pH etkisi

İkinci jenerasyon dendrimer 2G ve genişletilmiş ikinci jenerasyon 2G-H-Pt(II), 2G-H-Pt(IV), 2G-NO₂-Pt(II), 2G-NO₂-Pt(IV), 2G-CH₃-Pt(II), 2G-CH₃-Pt(IV) dendrimerlerine immobilize edilen β -glukoz oksidazın aktifliğine pH etkisinin incelemesinde kullandığımız yöntem Bölüm 4.11.1.'de ayrıntılı bir şekilde verildi. Deneyler sonucunda elde edilen veriler ile grafikler çizildi (Şekil 5.18.). x-eksenine pH ve y-ekseninde ise bağıl aktivite değerleri konuldu. Referans olarak serbest enzim (mor çizgi) kullanıldı.

Şekilde görüldüğü gibi serbest enzimin bağıl aktivitesinin en yüksek olduğu pH, 5 civarındadır. 2G dendrimerinde ise bağıl aktivite iki farklı pH'da (pH 4 ve 8) maksimumdur. pH 8'deki bağıl aktivite daha yüksek olduğundan, diğer çalışmalarda pH 8'de gerçekleştirilmiş ve buna uygun fosfat tamponu kullanılmıştır. 2G-H-Pt(II) ve 2G-H-Pt(IV), dendrimerlerinde optimum pH değerinin değişmediği ve 8 olduğu belirlendi. Yani, kompleks oluşumu ile ve kompleksin yükünün değişimi ile optimum pH'nın değişmediği gözlemlendi.

2G-CH₃-Pt(II) ve 2G-CH₃-Pt(IV) dendrimerlerinin bağıl aktiflik grafiklerinin 2G-H-Pt(II) ve 2G-H-Pt(IV) grafiklerine benzer olduğu görüldü. Nitekim optimum pH değerleri 8 olarak belirlendi. Metil grubunun bağıl aktiflik grafiklerde ve optimum pH'da bir değişim yapmadığı görüldü. Buna karşılık 2G-NO₂-Pt(II) ve 2G-NO₂-Pt(IV) dendrimerlerinin bağıl aktiflik grafiklerinin farklı olduğu belirlendi. 2G-NO₂-Pt(II) kompleksinde optimum pH 4 ve 8 iken, 2G-NO₂-Pt(IV) dendrimerinde pH 6 olarak tespit edildi. Nitro grubu dendrimerinde hem bağıl aktiflik grafiğini hem de optimum pH'yı oldukça değiştirmektedir.



Şekil 5.18. GOx enziminin aktifliği üzerine pH'nın etkisi

İmmobilize enzim için optimum pH değerleri 4, 6 ve 8 olarak bulundu. Kaynak araştırmasına göre, kataliz olayı asidik ortamda meydana geliyorsa enzimin Glu412 olarak kodlanan bölgesi, nötral ortamda reaksiyon oluşuyorsa enzimin His516 kısmı, bazik ortamda reaksiyon oluşuyorsa enzimin His559 kısmı etkili olur [160].

Bu bilgiler dikkate alındığında 2G-NO₂-Pt(II) dendrimerine immobilize edilen enzimin pH 4,0'de ve 2G-NO₂-Pt(IV) dendrimerine immobilize edilen enzimin ise pH 6,0'da aktif

olmasının nedeni enzimin Glu412 kodlu kısmının aktif rol oynamasından kaynaklanmaktadır.

2G, 2G-H-Pt(II)-GOx, 2G-H-Pt(IV)-GOx, 2G-NO₂-Pt(II)-GOx, 2G-CH₃-Pt(II)-GOx, 2G-CH₃-Pt(IV)-GOx dendrimerlerine immobilize enzimin pH 8,0'de aktif olmasının nedeni enzimin His559 kodlu kısmının aktif rol oynadığını göstermektedir [161].

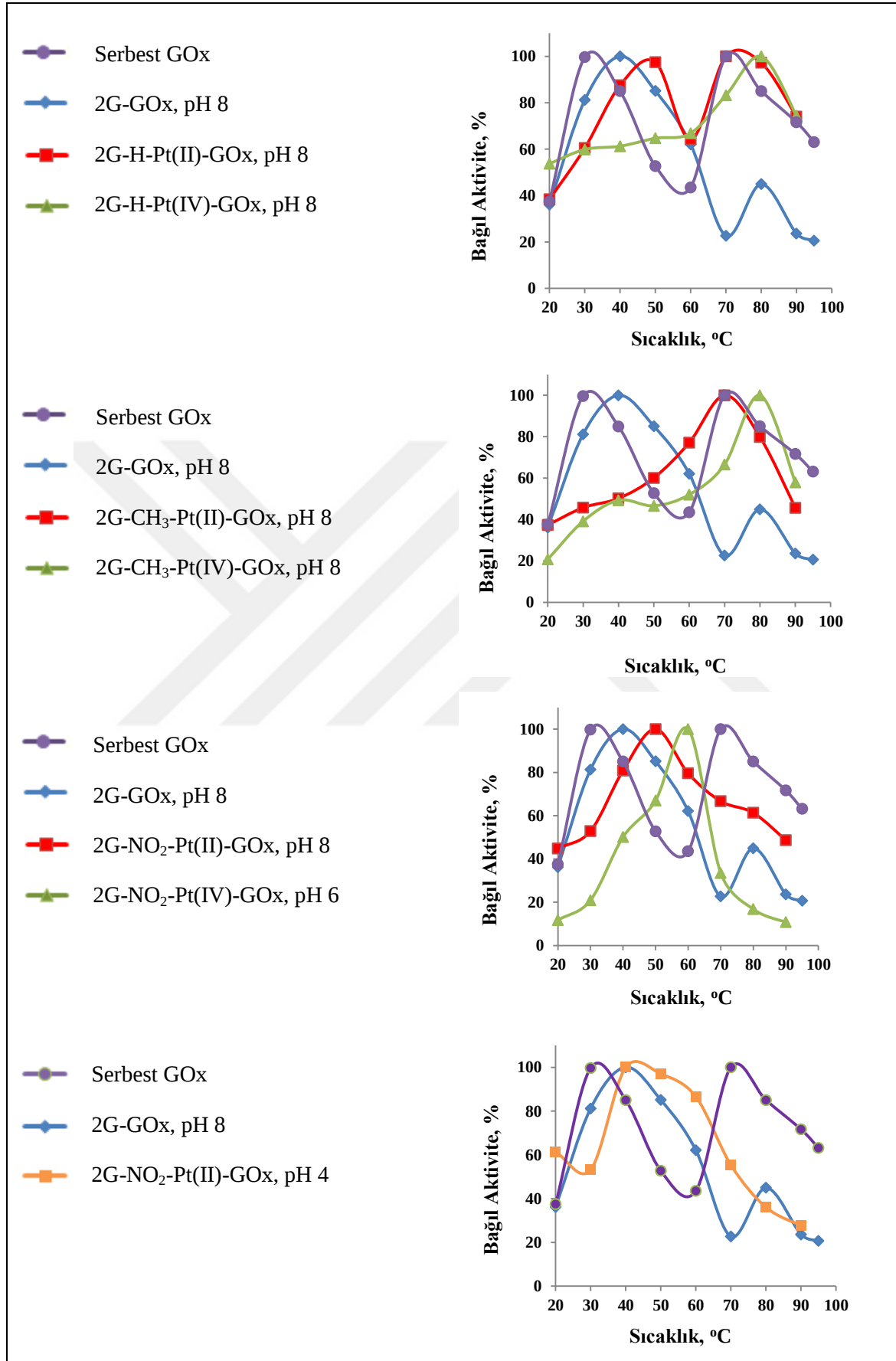
5.2.2. İmmobilize β -Glukoz oksidaz enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi

Dendrimerlere immobilize edilen β -glukoz oksidaz enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi çalışmaları Bölüm 4.11.2.'de belirtildiği gibi yapılmıştır. Sıcaklığa (x-ekseni) karşı bağıl aktivite değerlerinin (y-ekseni) çizildiği grafikler Şekil 5.19.' da verilmektedir.

Serbest enzimde pH 8'deki optimum sıcaklıklar 30 °C ve 70 °C olarak belirlendi. Bu sıcaklıklarda bağıl aktivitenin eşit olduğu görüldü. Halbuki, immobilize 2G dendrimerinde pH 8'de optimum sıcaklıkların biraz artarak 40 °C ve 80 °C olduğu, ayrıca 40 °C de ki bağıl aktivitenin daha yüksek olduğu belirlendi.

2G-H-Pt(II) dendrimerinde optimum sıcaklıkların 50 °C ve 70 °C, buna karşılık 2G-H-Pt(IV) dendrimerinde 80 °C olduğu görüldü. Platin komplekslerinin optimum sıcaklık değerlerini değiştirdiği gözlemlendi.

Metil grubunu taşıyan dendrimerlerde pH 8'deki optimum sıcaklıkların Pt(II)'de 70 °C, Pt(IV) de 80 °C olduğu görüldü. Metil grubunun varlığı optimum sıcaklıklarda ciddi bir değişime neden olmamıştır. Nitro grubunu taşıyan dendrimerler için Pt(IV)'de pH 6'da belirlenen sıcaklık 60 °C, Pt(II)'de pH 4'de 40 °C ve pH 8'de 50 °C olduğu görüldü. Genellikle Pt⁺⁴ iyonu içeren genişletilmiş dendrimerlerde immobilize enzimin daha yüksek sıcaklıklarda aktifliğini koruduğu gözlemlendi. Dendrimerlerin optimum sıcaklık değerleri Çizelge 5.4.'de topluca verildi.



Şekil 5.19. GOx enziminin aktifliği üzerine sıcaklığın etkisi

5.2.3. İmmobilize β -Glukoz oksidaz enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Substrat derişiminin etkisi daha önce belirlediğimiz optimum pH ve sıcaklıklarda incelendi. Bunun için çeşitli derişimlerde substrat çözeltilerinin absorbands değerleri belirlendi. *Lineaweaver-Burk* kalibrasyon grafikleri ($1/S$ in $1/V$ ye karşı) çizildi (Şekil 5.20.). Bu grafiklerden hesaplanan K_m ve V_{mak} değerleri Çizelge 5.4.'de verildi.

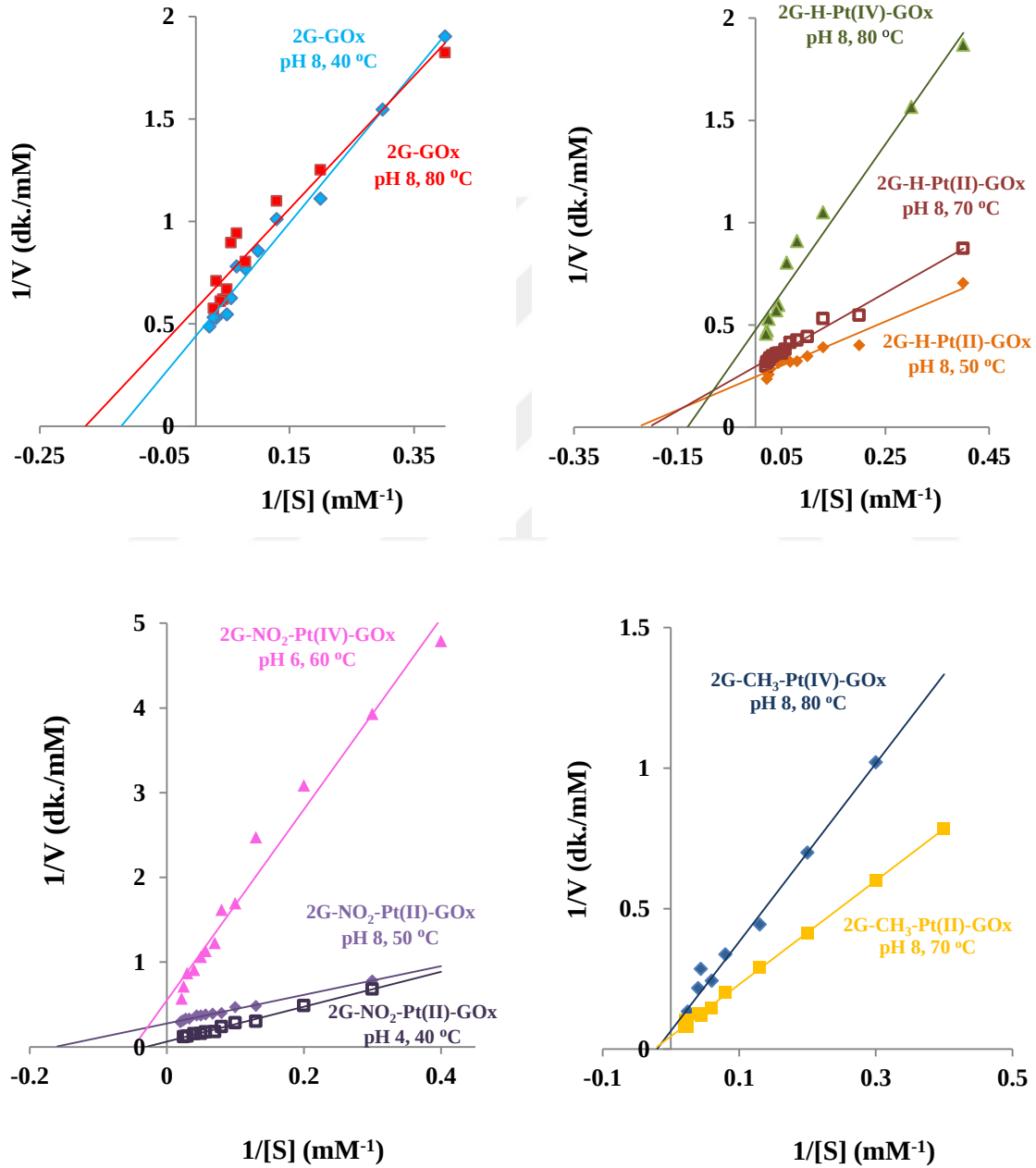
K_m , enzimlerin substratlarına karşı ilgilerini ifade eden bir parametredir ve enzimler için parmak izi olarak kabul edilir. Düşük K_m değeri enzimin substrata karşı yüksek ilgisini ifade eder. V_{mak} ise enzimin doymuş substrattaki reaksiyon hızıdır ve bir enzimde ulaşılacak en yüksek hızdır.

Yaptığımız çalışmalarda immobilizasyonla K_m değerlerinin değiştiği gözlenmiştir. 2G dendrimerinin K_m değeri (40 °C, 8,35 mM) serbest enzime (40 °C, 12,82 mM) oranla düşüktür, yani immobilize 2G substrata daha fazla ilgi göstermektedir. Benzer düşüş V_{mak} değerinde de gözlenmiştir. Bağlı aktivitenin daha yüksek olduğu 40 °C'daki K_m değerindeki düşüş daha fazladır. Ancak 80 °C'deki K_m değeri (5,63 mM) 40 °C'dekinden daha düşüktür.

2G-H-Pt(II)-GOx dendrimerinde 50 °C (4,39 mM, 4,06 mM dk.⁻¹) ve 70 °C'deki (4,85 Mm, 3,37 mM dak⁻¹) K_m ve V_{mak} değerleri birbirine yakındır. Ancak serbest enzimle kıyaslandığında 70 °C'de K_m değerindeki düşüş daha fazladır. 2G-NO₂-Pt(II)-GOx dendrimerinde bağlı değeri daha yüksek olan pH 8'deki K_m değeri (6,09 Mm) düşerken, bağlı değeri daha düşük olan pH 4'deki K_m değeri düşüşü serbest enzimle kıyaslandığında oldukça fazladır ve V_{mak} değerinde de düşüş gözlenmiştir. K_m değerleri mukayese edildiğinde pH 8'deki K_m değerinin (6,09 mM) pH 4'deki K_m değerinden (33,88 mM) daha düşük olduğu görülmüştür.

2G-CH₃-Pt(II)-GOx dendrimerinde ise hem K_m hem de V_{mak} değerinde yükselme görülmüştür. Halkaya elektron sağlayan metil grubu K_m (40,67 mM) değerini yükseltirken, halkasından elektron çeken nitro grubu K_m (6,09 Mm) değerlerini düşürmektedir. Ancak nitro grubunun enzim ile hidrojen bağı yapabilmesi nedeniyle enzime daha iyi bağlanarak K_m değerini düşürebileceği dikkate alınmalıdır.

2G-NO₂-Pt(IV)-GOx ve 2G-CH₃-Pt(IV)-GOx dendrimerlerinin her ikisinde de hem K_m hem de $V_{\max}$ değerlerinde artma gözlenmiştir. Genel olarak Pt(IV) dendrimerleri, Pt(II) dendrimerlerinden daha yüksek K_m değerlerine sahiptir. Tek avantajı 2G-H-Pt(IV)-GOx'un yüksek sıcaklıkta (80 °C) uygulanabilir oluşudur. Bu dendrimerlerde hem metil hem de nitro grubu K_m değerini arttırmaktadır.



Şekil 5.20. GOx enzimi immobilize edilmiş dendrimerler için Lineaweaver-Burk grafikleri

Çizelge 5.4. GOx enzimi immobilize edilmiş dendrimerler için bulunan optimum şartlar ve kinetik parametreler

Dendrimerlerin kapalı formülleri	pH	T(°C)	Dendrimer-GOx		Serbest enzim	
			K_m^*	V_{mak}^{**}	K_m	V_{mak}
2G-GOx	8	40	8,35	2,27	12,82	2,70
"	8	80	5,63	1,74	9,53	2,20
2G-H-Pt(II)-GOx	8	50	4,39	4,06	6,78	4,35
"	8	70	4,85	3,37	7,85	3,30
2G-NO ₂ -Pt(II)-GOx	4	40	33,88	16,42	157,81	36,23
"	8	50	6,09	3,60	6,78	4,35
2G-CH ₃ -Pt(II)-GOx	8	70	40,67	22,03	7,85	3,30
2G-H-Pt(IV)-GOx	8	80	7,63	2,10	9,53	2,20
2G-NO ₂ -Pt(IV)-GOx	6	60	20,56	1,82	4,40	4,15
2G-CH ₃ -Pt(IV)-GOx	8	80	48,73	15,36	9,53	2,20

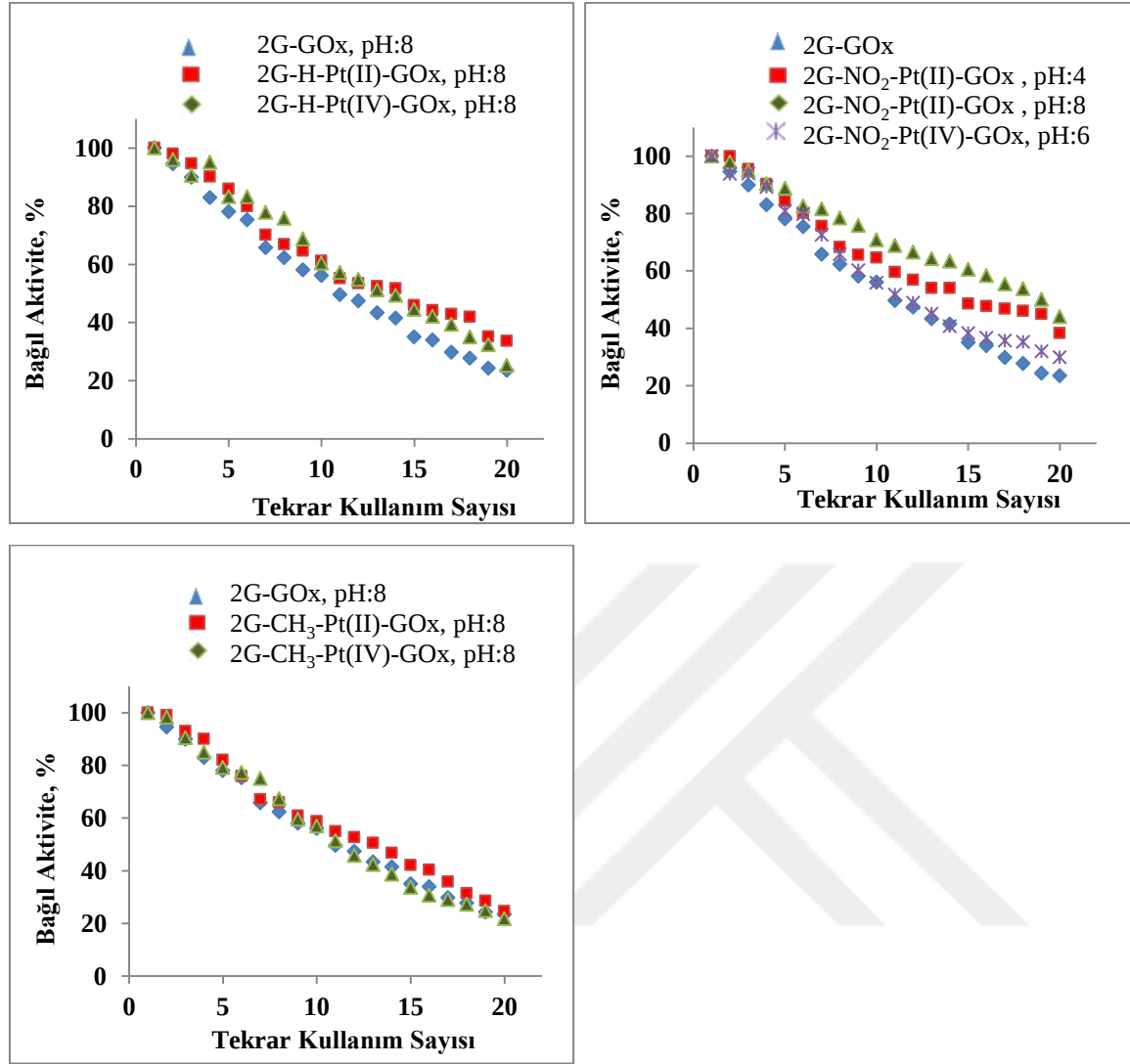
* (mM)

** (mM dk.⁻¹)

5.2.4. İmmobilize β -Glukoz oksidaz enziminin tekrar kullanılabilirliği ve depo kararlılığı

Dendrimerlere immobilize edilen β -Glukoz oksidaz enziminin tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için işlemler Bölüm 4.11.4.'te anlatıldığı şekilde yapıldı. Elde edilen tekrar kullanım sayısına karşı bağlı aktivite değerleri grafiği Şekil 5.21.'de verildi.

5 tekrar sonucunda immobilize dendrimerler genel olarak aktifliklerini % 80 oranında korumaktadır. 20 tekrar sonucunda immobilize 2G-GOx dendrimeri aktifliğinin % 23,50'ini korurken Pt(II) iyonu içeren immobilize dendrimerler genel olarak aktifliklerini yaklaşık % 35'ini Pt(IV) iyonu içeren immobilize dendrimerler ise % 25 civarında aktifliklerini korumaktadır.



Şekil 5.21. GOx enzimi immobilize edilmiş dendrimerler için tekrar kullanılabilirlik grafiği

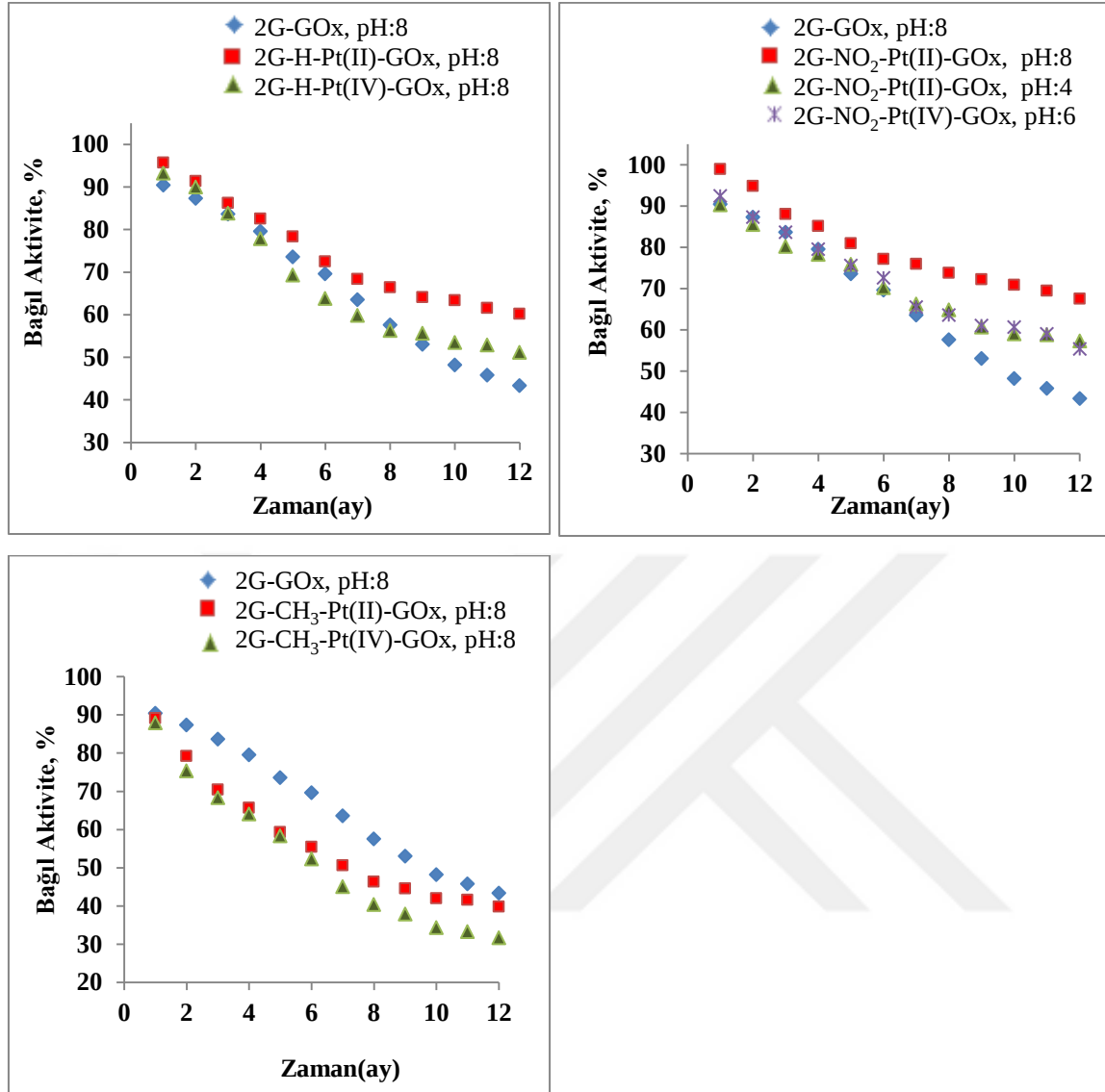
Çizelge 5.5. GOx enzimi immobilize edilmiş dendrimerler için tekrarlanabilirlik değerleri (% aktiflik)

İmmobilize Dendrimerler	Optimum pH	Tekrarlanabilirlik Sayısı			
		5	10	15	20
2G-GOx	8	78,04	56,09	35,05	23,50
2G-H-Pt(II)-GOx	8	85,94	61,23	45,94	33,63
2G-NO ₂ -Pt(II)-GOx	4	84,32	64,58	48,51	38,34
2G-NO ₂ -Pt(II)-GOx	8	88,82	70,79	60,57	44,09
2G-CH ₃ -Pt(II)-GOx	8	82,13	58,79	42,14	24,72
2G-H-Pt(IV)-GOx	8	83,24	60,44	44,51	25,24
2G-NO ₂ -Pt(IV)-GOx	6	80,84	55,79	38,32	29,88
2G-CH ₃ -Pt(IV)-GOx	8	79,24	57,04	33,66	21,86

Dendrimerlere immobilize edilen β -Glukoz oksidaz enziminin depolama kararlılığını belirlemek için işlemler Bölüm 4.11.5.'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Immobilize dendrimerlerin depolama kararlılığı grafikleri Şekil 5.22.'de verildi. Depolama kararlılığı enzimin saklama koşullarına bağlı bir parametredir. Dendrimerlerin oda koşullarında bir ay sonraki depolama kararlılığı yaklaşık % 90, altı ay sonra ise yaklaşık % 60-70 civarındadır. Bir yıl sonunda, 2G'nin aktifliğinin yaklaşık % 40 oranında korurken, Pt(II) dendrimerlerinin % 55 civarında, Pt(IV) dendrimerleri ise yaklaşık % 45 oranında korumaktadır. Pt(II) dendrimerlerin aktifliğini daha uzun süre korumasının nedeni, bunların enzimlere daha kuvvetli bağlandığını düşündürmektedir.

Çizelge 5.6. GOx enzimi immobilize edilmiş dendrimerler için depolama değerleri (% aktiflik)

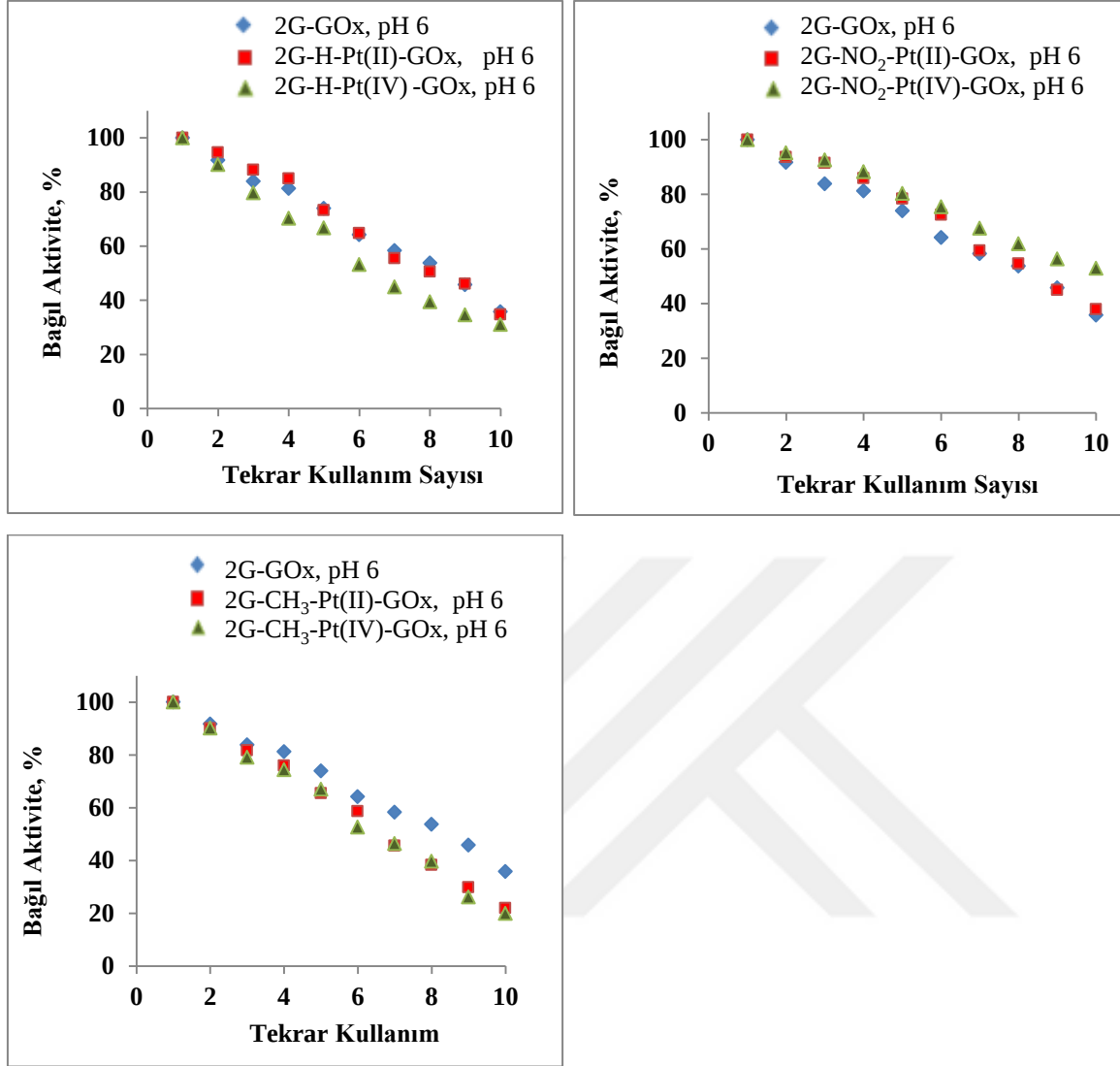
Dendrimer Zaman(ay)	1.ay	2.ay	3.ay	4.ay	5.ay	6.ay	7.ay	8.ay	9.ay	12. ay
2G pH 8	90,41	87,32	83,61	79,53	73,55	69,61	63,53	57,55	53,04	43,34
2G-H-Pt(II) pH 8	95,69	91,34	86,21	82,49	78,33	72,49	68,33	66,4	64,1	60,18
2G-NO ₂ -Pt(II) pH 4	90,26	85,49	80,23	78,24	75,84	70,23	66,24	64,84	60,65	57,32
2G-NO ₂ -Pt(II) pH 8	98,95	94,79	88,03	85,15	80,94	77,15	75,94	73,8	72,23	67,55
2G-CH ₃ -Pt(II) pH 8	89,09	79,17	70,41	65,63	59,32	55,41	50,63	46,32	44,56	39,79
2G-H-Pt(IV) pH 8	93,25	89,98	83,82	77,80	69,27	63,82	59,8	56,27	55,65	51,14
2G-NO ₂ -Pt(IV) pH 6	92,41	87,32	83,61	79,53	75,55	72,61	65,53	63,55	61,04	55,34
2G-CH ₃ -Pt(IV) pH 8	87,88	75,33	68,31	64,07	58,34	52,31	45,07	40,34	37,90	31,68



Şekil 5.22. GOx enzimi immobilize edilmiş dendrimerler için depolama kararlılığı grafiği

5.2.5. İmmobilize β -Glukoz oksidaz enziminin yapay idrar çözeltisindeki tekrar kullanılabilirliğinin tayini

Tekrar kullanılabilirlik değerinin farklı bir ortamda değişip değişmediğini belirlemek için yapay idrar çözeltisi kullanıldı ve işlem Bölüm 4.11.4.'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. β -Glukoz oksidaz, idrardaki şeker tayininde kullanılan bir enzimdir. Yapay idrar çözeltisinde 30 dakika ara ile 10 tekrar yapılmıştır. Elde edilen veriler Şekil 5.23.'de ve Çizelge 5.7.'de verilmektedir.



Şekil 5.23. GOx enzimi immobilize edilmiş dendrimerler için yapay idrar ortamında tekrar kullanılabilirlik grafiği

5 tekrar sonucunda, immobilize dendrimeler aktivitesini yaklaşık % 70 civarında 10 tekrar sonucunda ise yaklaşık % 35 civarında korumaktadır. Sulu ortamda 5 tekrar sonucunda aktifliklerini % 80 oranında koruduklarına göre tekrarlanabilirlik çözücü ortamında göre değişiklik gösterebilmektedir ve yapay idrar çözeltisinde azalmaktadır. Pt(II) ve Pt(IV) içeren dendrimerleri kıyasladığımızda birbirine çok yakın aktifliklere sahip oldukları görülmektedir. Yani metal iyonunun varlığı yapay idrar ortamında aktifliği çok fazla değiştirmemiştir.

Çizelge incelendiğinde en çok göze çarpan immobilize dendrimer 2G-NO₂-Pt(IV)-GOx'dir. Bu dendrimerin 10 tekrar sonunda %50 civarında aktifliğini koruduğu

belirlenmiştir. Bunun nedeni, 2G-NO₂-Pt(IV)-GOx dendrimerinin optimum pH değerinin 6 olması ve asidik ortamda daha yüksek aktifliğe sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 5.7. GOx enzimi immobilize edilmiş dendrimerlerin yapay idrar çözeltisindeki tekrarlanabilirlik değerleri (% aktiflik)

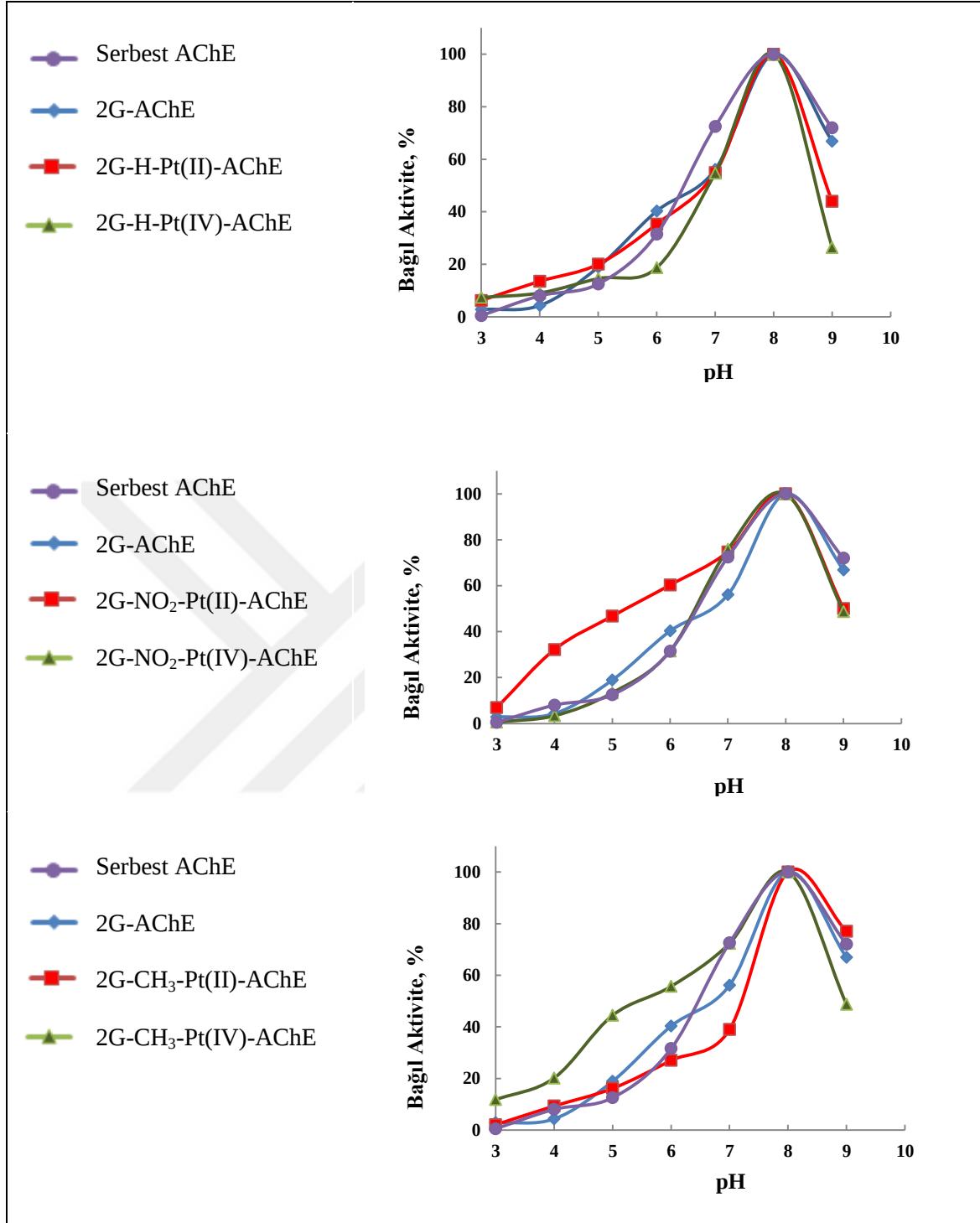
Dendrimer	Tekrarlanma Sayısı	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
2G-GOx		100	91,72	83,86	81,24	73,94	64,21	58,30	53,74	45,77	35,79
2G-H-Pt(II)-GOx		100	94,58	88,17	84,89	73,20	64,77	55,46	50,52	46,01	34,69
2G-NO ₂ -Pt(II)-GOx		100	93,63	91,45	85,82	78,35	72,45	59,43	54,60	44,92	37,88
2G-CH ₃ -Pt(II)-GOx		100	90,04	81,69	75,98	65,46	58,66	45,61	38,22	29,78	21,92
2G-H-Pt(IV)-GOx		100	90,10	79,61	70,31	66,67	53,21	44,87	39,45	34,59	31,03
2G-NO ₂ -Pt(IV)-GOx		100	95,17	92,58	88,26	80,27	75,43	67,52	61,84	56,30	52,92
2G-CH ₃ -Pt(IV)-GOx		100	90,15	79,07	74,44	67,04	52,58	46,41	39,66	26,18	19,95

5.3. Asetilkolinesteraz (AChE) Enziminin Optimizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Asetilkolinesteraz (AChE) enziminin immolizasyonu Bölüm 4.12.'de ayrıntı bir şekilde verilmektedir. Immobilize enzimin optimizasyonunda pH, sıcaklık ve derişim parametreleri incelenmiştir.

5.3.1. İmmobilize asetilkolinesteraz enziminin aktifliğine pH etkisi

İkinci jenerasyon dendrimer 2G ve genişletilmiş ikinci jenerasyon 2G-H-Pt(II), 2G-H-Pt(IV), 2G-NO₂-Pt(II), 2G-NO₂-Pt(IV), 2G-CH₃-Pt(II), 2G-CH₃-Pt(IV) dendrimerlerine immobilize edilen asetilkolinesterazın (AChE) aktifliğine pH etkisinin incelemesinde kullandığımız yöntem Bölüm 4.12.1.'de ayrıntılı bir şekilde verildi. Deneyler sonucunda elde edilen veriler ile grafikler çizildi (Şekil 5.24.). x-eksenine pH ve y-ekseninde ise bağıl aktivite değerleri konuldu. Referans olarak serbest enzim (mor çizgi) kullanıldı.

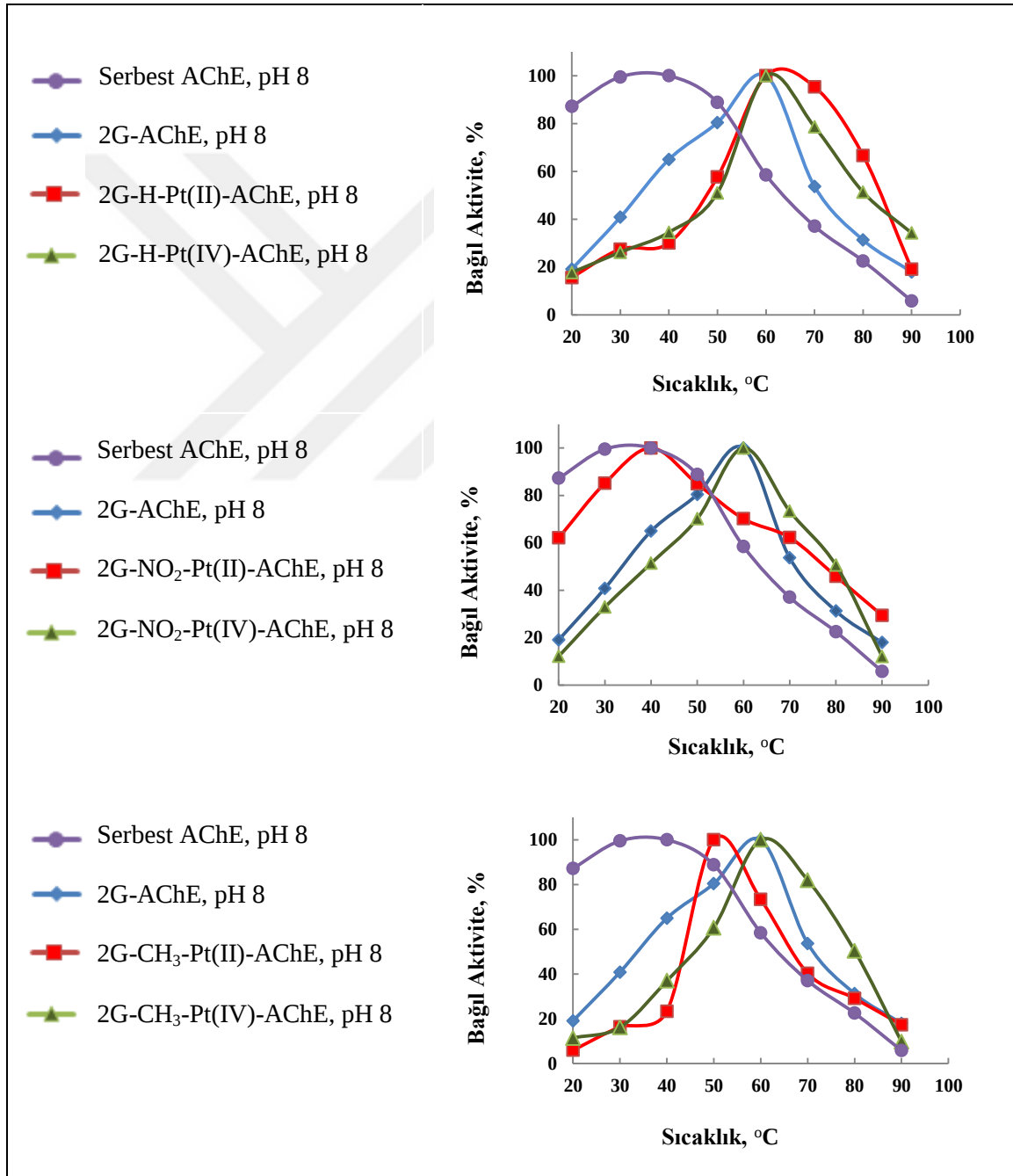


Şekil 5.24. AChE enziminin aktifliği üzerine pH'nın etkisi

Şekilde görüldüğü gibi hem serbest enzimin hem de immobilize dendrimerlerin bağl aktivitesinin en yüksek olduğu pH 8'dir. Yani, kompleks oluşumu ile ve kompleksin yükünün değişimi ile optimum pH'nın değişmediği gözlemlendi.

5.3.2. İmmobilize asetilkolinesteraz enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi

İkinci jenerasyon dendrimeri olan 2G ve genişletilmiş ikinci jenerasyon dendrimerlerine 2G-H-Pt(II), 2G-H-Pt(IV), 2G-NO₂-Pt(II), 2G-NO₂-Pt(IV), 2G-CH₃-Pt(II), 2G-CH₃-Pt(IV) immobilize edilen AChE enziminin aktifliğine sıcaklığın etkisi Bölüm 4.12.2.'de belirtildiği gibi yapılarak bağıl aktivitenin sıcaklık ile değişimi Şekil 5.25.'de verildi.



Şekil 5.25. AChE enziminin aktifliği üzerine sıcaklığın etkisi

Serbest enzimde pH 8'deki optimum sıcaklık 40 °C olarak belirlendi. Halbuki çoğu immobilize dendrimerlerde, optimum sıcaklığın biraz artarak 60 °C olduğu belirlendi. İstisna olarak iki dendrimerde optimum sıcaklık değişmektedir: 2G-CH₃-Pt(II)-AChE de, 50 °C ve 2G-NO₂-Pt(II)-AChE de 40 °C olarak tespit edildi. Sadece Pt(II) iyonu taşıyan dendrimerlerde süstitüentler (nitro, metil) optimum sıcaklığı değiştirmektedir. Pt⁺⁴ iyonu içeren tüm dendrimerlerde immobilize enzimin daha yüksek sıcaklıklarda aktifliğini koruduğu gözlemlendi. Dendrimerlerin optimum sıcaklık değerleri Çizelge 5.8.'de topluca verildi.

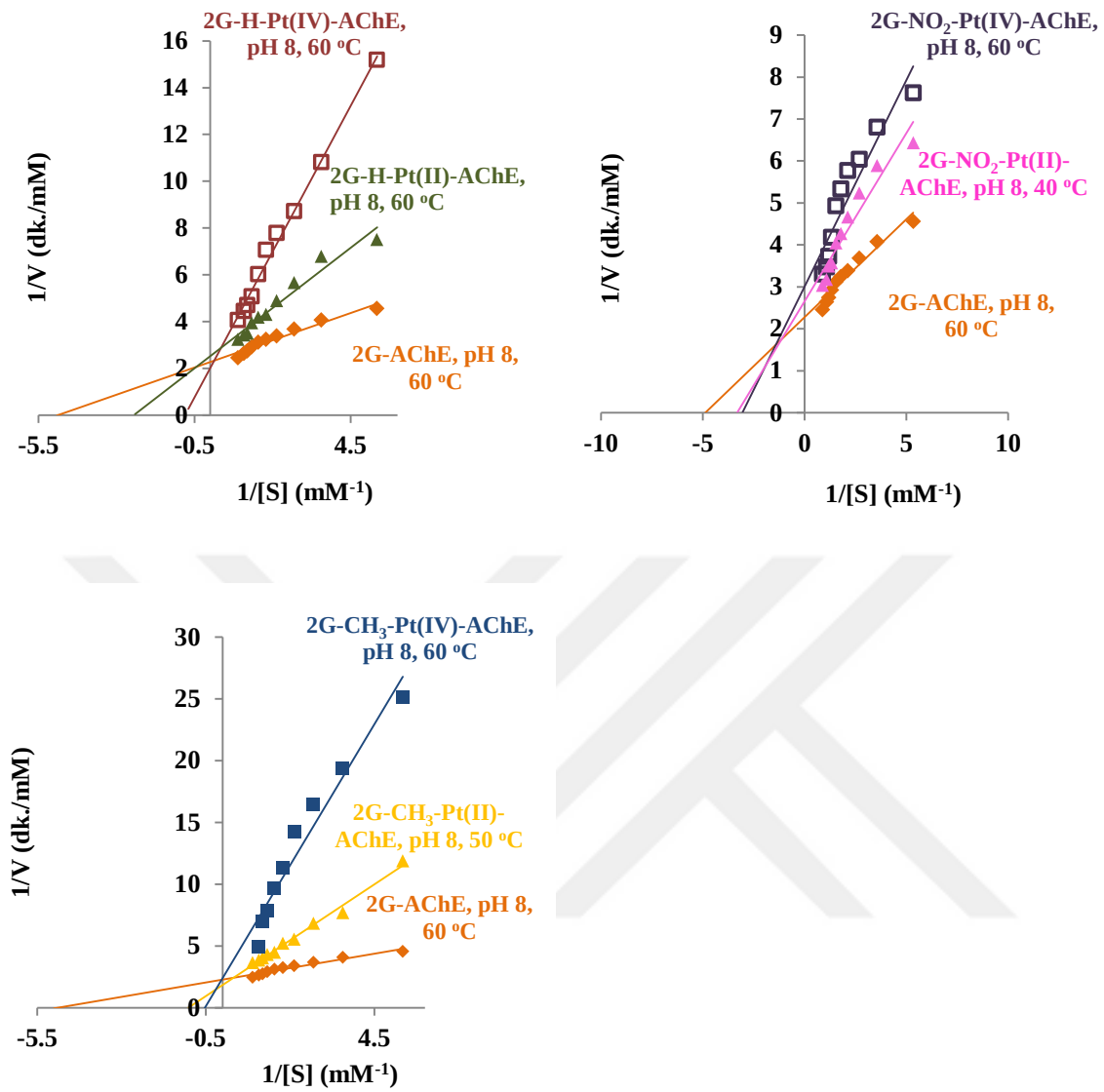
5.3.3. İmmobilize asetilkolinesteraz enziminin aktifliğine substrat derişiminin etkisi

Substrat derişiminin etkisi daha önce belirlediğimiz optimum pH ve sıcaklıklarda incelendi. Bunun için çeşitli derişimlerde substrat çözeltilerinin absorbans değerleri belirlendi. *Lineaweaver-Burk* kalibrasyon grafikleri (1/S'nin 1/V'ye karşı) çizildi (Şekil 5.26.). Bu grafiklerden hesaplanan K_m ve V_{mak} değerleri Çizelge 5.8.'de verildi.

Yaptığımız çalışmalarda immobilizasyonla K_m değerlerinin değiştiği ve genel olarak bu değerlerin arttığı gözlenmiştir. 2G dendrimerinin K_m değeri (0,20 mM) serbest enzime (0,07 mM) oranla yüksektir, yani immobilize 2G substrata daha az ilgi göstermektedir.

2G-H-Pt(II)-AChE dendrimerinde 60 °C'deki K_m (0,41 mM) ve V_{mak} (0,40 mM dk.⁻¹) değerleri birbirine yakındır. Ancak bu dendrimerin K_m değeri serbest enzime oranla yüksektir. 2G-NO₂-Pt(II)-AChE dendrimerinde pH 8, 40 °C'deki K_m değerinin (0,30 mM) serbest enzimin K_m değeri (0,99 mM) ile kıyaslandığında ciddi bir düşüş olduğu gözlenmiştir. 2G-CH₃-Pt(II)-AChE dendrimerinde ise K_m değerinde yükselme görülmüştür. Halkaya elektron sağlayan metil grubu K_m değerini yükseltirken, halkadan elektron çeken nitro grubu K_m değerlerini düşürmektedir. Ancak nitro grubunun enzim ile hidrojen bağı yapabilmesi nedeniyle enzime daha iyi bağlanarak K_m değerini düşürebileceği dikkate alınmalıdır.

2G-H-Pt(IV)-AChE, 2G-NO₂-Pt(IV)-AChE ve 2G-CH₃-Pt(IV)-AChE dendrimerlerinin her üçünde de hem K_m hem de V_{mak} değerlerinde artma gözlenmiştir. Genel olarak Pt(IV) dendrimerleri, Pt(II) dendrimerlerinden daha yüksek K_m değerlerine sahiptir.



Şekil 5.26. AChE enzimi immobilize edilmiş dendrimerler için Lineweaver-Burk grafikleri

Çizelge 5.8. AChE enzimi immobilize edilmiş dendrimerler için bulunan optimum şartlar ve kinetik parametreler

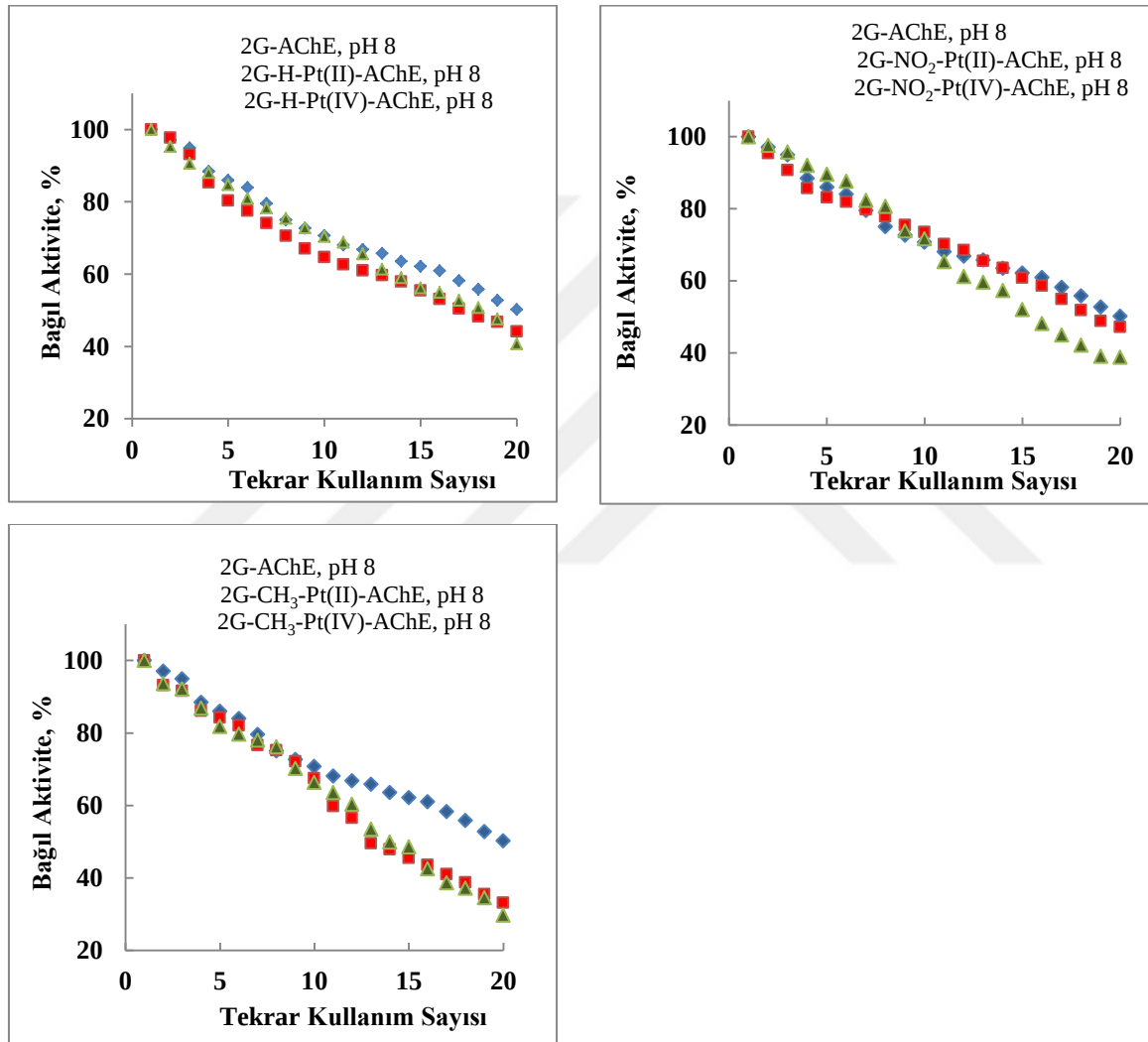
Dendrimerlerin kapalı formülleri	pH	T (°C)	Dendrimer-AChE		Serbest enzim(AChE)	
			K_m^*	V_{mak}^{**}	K_m	V_{mak}
2G-AChE	8	60	0,20	0,44	0,07	4,32
2G-H-Pt(II)-AChE	8	60	0,41	0,40	0,07	4,32
2G-NO ₂ -Pt(II)-AChE	8	40	0,30	0,38	0,99	2,06
2G-CH ₃ -Pt(II)-AChE	8	50	0,98	0,53	0,15	1,09
2G-H-Pt(IV)-AChE	8	60	1,24	0,50	0,07	4,32
2G-NO ₂ -Pt(IV)-AChE	8	60	0,33	0,33	0,07	4,32
2G-CH ₃ -Pt(IV)-AChE	8	60	1,90	0,42	0,07	4,32

* (mM)

** (mM dk.⁻¹)

5.3.4. İmmobilize asetilkolinesteraz enziminin tekrar kullanılabilirliği ve depolama kararlılığı

Dendrimerlere immobilize edilen AChE enziminin tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için Bölüm 4.12.4.'te anlatıldığı şekilde işlemler gerçekleştirildi. İmmobilize enzimin aktifliğinin tekrar kullanım sayısı ile değişimi Şekil 5.27.'de verilmektedir.



Şekil 5.27. AChE enzimi immobilize edilmiş dendrimerler için tekrar kullanılabilirlik grafiği

Şekil 5.27.'de görüldüğü gibi beşinci tekrardan sonra bağlı aktivitenin % 89,57-80,31 arasında korunduğu belirlendi. Onuncu tekrardan sonra en yüksek bağlı aktiviteye % 73,55 ile 2G-AChE'nin sahip olduğu gözlemlendi. Yirminci tekrardan sonra en düşük bağlı aktivite % 29,75 ile 2G-CH₃-Pt(IV)-AChE'de gözlemlendi. Metal iyonu içeren immobilize

dendrimerleri kendi aralarında kıyasladığımızda yirminci tekrardan sonra bağıl aktivite değerlerinin birbirine çok yakın olduğunu ve yaklaşık % 40 civarında korunduğu belirlendi. 20. kullanımdan sonra en yüksek aktiviteye % 50,18 değeri ile 2G-AChE dendrimeri sahiptir.

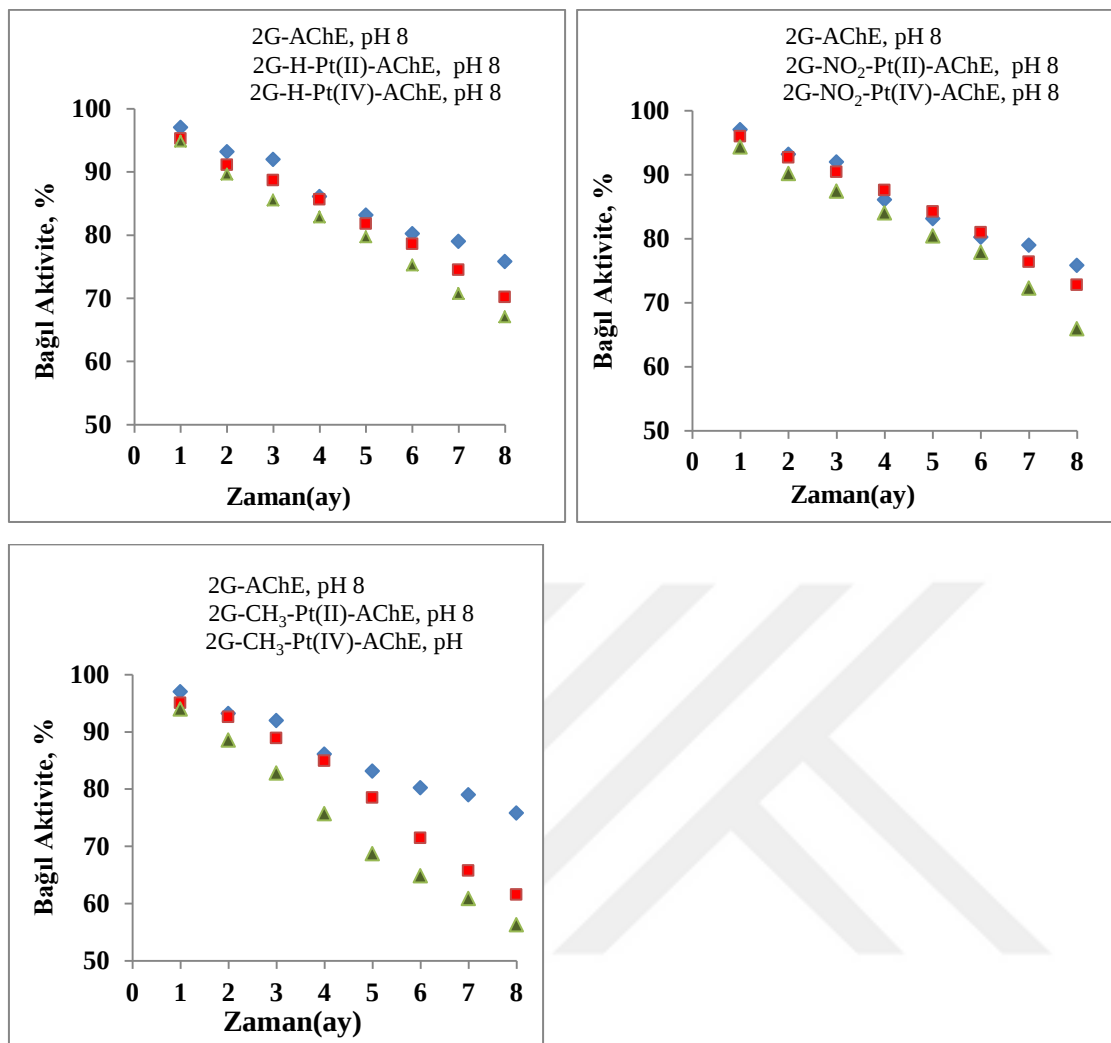
Çizelge 5.9. AChE enzimi immobilize edilmiş dendrimerler için tekrarlanabilirlik değerleri (% aktiflik)

İmmobilize Dendrimerler	Optimum pH	Tekrarlanabilirlik Sayısı			
		5	10	15	20
2G-AChE	8	85,94	70,69	62,17	50,18
2G-H-Pt(II)-AChE	8	80,31	64,69	55,48	44,12
2G-NO ₂ -Pt(II)-AChE	8	83,14	73,55	60,84	47,18
2G-CH ₃ -Pt(II)-AChE	8	84,21	67,49	45,51	33,10
2G-H-Pt(IV)-AChE	8	84,75	70,42	56,14	40,70
2G-NO ₂ -Pt(IV)-AChE	8	89,57	71,67	52,08	38,81
2G-CH ₃ -Pt(IV)-AChE	8	81,77	66,35	48,52	29,75

Dendrimerlere immobilize edilen AChE enziminin depolama kararlılığını belirlemek için Bölüm 4.12.5.'de anlatıldığı şekilde işlemler gerçekleştirildi. İmmobilize dendrimerlerin depolama kararlılığına ait grafikler Şekil 5.28.'de verildi.

Depolama kararlılığı üzerine olan çalışmalar değerlendirildiğinde 1 ay sonunda genel olarak bağıl aktiviteleri % 95 oranında korunduğu gözlenmiştir. 6 ay sonra 2G-AChE'nin bağıl aktifliğinin yaklaşık % 80 korunurken, Pt(II) ve Pt(IV) komplekslerinde yaklaşık % 75 oranında korunmaktadır. İmmobilize edilen dendrimerler arasında 2G-CH₃-Pt(IV)-AChE'nin bağıl aktivitesinin sekizinci ay sonunda % 56,32 ile en düşük değere sahip olduğu belirlendi.

Komplekslerin kendi içerisinde bir değerlendirme yapıldığında nitro komplekslerinin bağıl aktivitesinin daha yüksek olduğu (%70 civarında) belirlendi. Pt(II) ve Pt(IV) iyonlarını içeren dendrimerlerin kıyaslanması yapıldığında ise Pt(II) içeren dendrimerlerin bağıl aktivitesinin daha büyük olduğu (% 68 civarında) belirlendi.



Şekil 5.28. AChE enzimi immobilize edilmiş dendrimerler için depolama kararlılığı grafiği

Çizelge 5.10. AChE enzimi immobilize edilmiş dendrimerler için depolama değerleri (% aktiflik, pH 8)

Dendrimerler	1.ay	2.ay	3.ay	4.ay	5.ay	6.ay	7.ay	8.ay
Zaman (ay)								
2G-AChE	97,01	93,19	91,97	86,09	83,12	80,21	78,99	75,80
2G-H-Pt(II)-AChE	95,27	91,07	88,67	85,62	81,77	78,58	74,46	70,15
2G-NO ₂ -Pt(II)-AChE	95,98	92,65	90,42	87,58	84,23	80,98	76,36	72,76
2G-CH ₃ -Pt(II)-AChE	95,04	92,55	88,87	84,90	78,49	71,45	65,75	61,55
2G-H-Pt(IV)-AChE	94,84	89,62	85,53	82,85	79,69	75,26	70,73	67,01
2G-NO ₂ -Pt(IV)-AChE	94,30	90,16	87,43	84,01	80,42	77,85	72,26	65,90
2G-CH ₃ -Pt(IV)-AChE	93,99	88,54	82,78	75,67	68,73	64,87	60,87	56,32

5.4. Pestisitlerin İmmobilize Asetilkolinesteraz Enzimine Etkisi

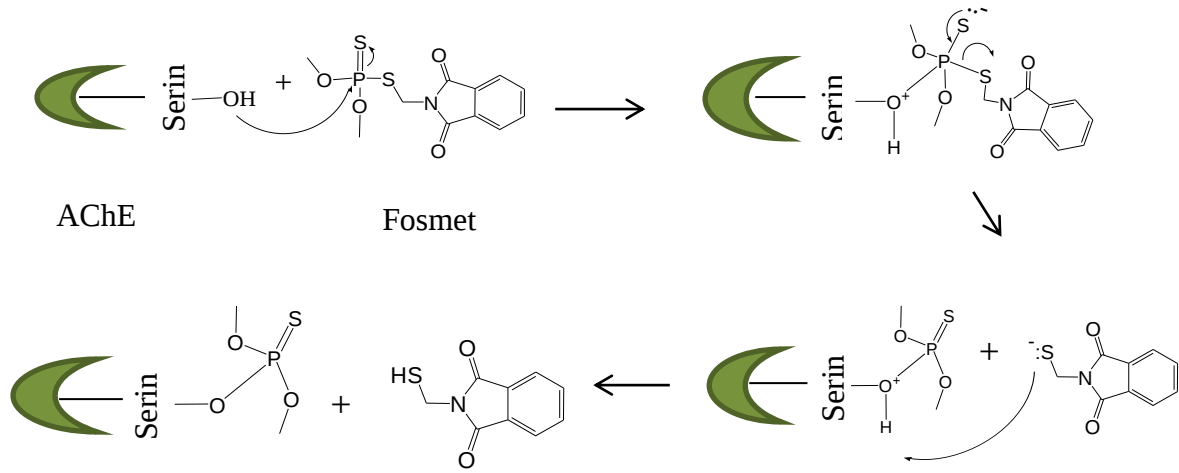
Dendrimerlere immobilize edilen AChE enziminin fosmet, karbaril ve diklofop-metil ile olan inhibisyon etkisini incelemek için Bölüm 4.12.6.'da anlatıldığı gibi işlemler yapıldı. Çalışılan immobilize dendrimerlerin pestisit analizi için, absorbans değerinin % 50'ye düşmesi için gereken pestisit miktarları μL cinsinden hesaplandı. Bu değerler Çizelge 5.11.'de verildi.

Çizelge 5.11. İmmobilize enzimlerin absorbans değerlerinin % 50'ye düşmesi için gereken pestisit miktarları (μL)

İmmobilize Dendrimer		Pestisit	Fosmet	Karbaril	Diklofop-metil
2G-AChE	Absorbans değerinin % 50'ye düşmesi için harcanan pestisit miktarı (μL)		54,98	40,42	90,69
2G-H-Pt(II)-AChE			48,53	26,58	63,16
2G-NO ₂ -Pt(II)-AChE			30,71	33,89	40,01
2G-CH ₃ -Pt(II)-AChE			47,08	24,69	44,98
2G-H-Pt(IV)-AChE			67,48	36,73	72,31
2G-NO ₂ -Pt(IV)-AChE			34,77	27,85	45,38
2G-CH ₃ -Pt(IV)-AChE			66,81	34,94	78,85

5.4.1. İmmobilize dendrimerlerin fosmet ile olan inhibisyon sonuçlarının değerlendirilmesi

Organofosfatlı bileşikler, asetilkolinesteraz enziminin aktif bölgesinde bulunan serin aminoasidinin hidroksil grubuna kovalent bağ ile bağlanarak enzimi inhibe etmektedir. Oluşan kovalent bağ zayıf ise inhibisyon geri dönüşümlü olabilir. Fakat fosfat molekülünden bir grup ayrılırsa inhibisyon geri dönüşümsüz hale gelir (Şekil 5.29.). Geri dönüşümsüz olan bu mekanizma, her bileşik için farklı ürünler oluşturacağı gibi tepkime süreleri de farklılık gösterebilir. Aşağıda enzim ve “fosmet” arasında mümkün olabilen inhibisyon mekanizması verildi.



İnhibe AChE

Şekil 5.29. AChE enzimi ve fosmet arasında gerçekleşen inhibisyon mekanizması

Ellman metoduna göre AChE enziminin substrat ile verdiği tepkimenin mekanizması Şekil 4.12.'de verilmektedir. Tepkime sonucunda oluşan ürün ile ortama katılan renklendirici 5,5-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) arasındaki tepkime sonucu sarı renkli bileşik (5-merkapt-2-nitrobenzoik asit) meydana gelmektedir. Bu bileşiğin maksimum absorbands yaptığı dalga boyu 412 nm'dir. Enzim aktivitesi bu dalga boyundaki absorbands değişiminin izlemesi ile belirlendi.

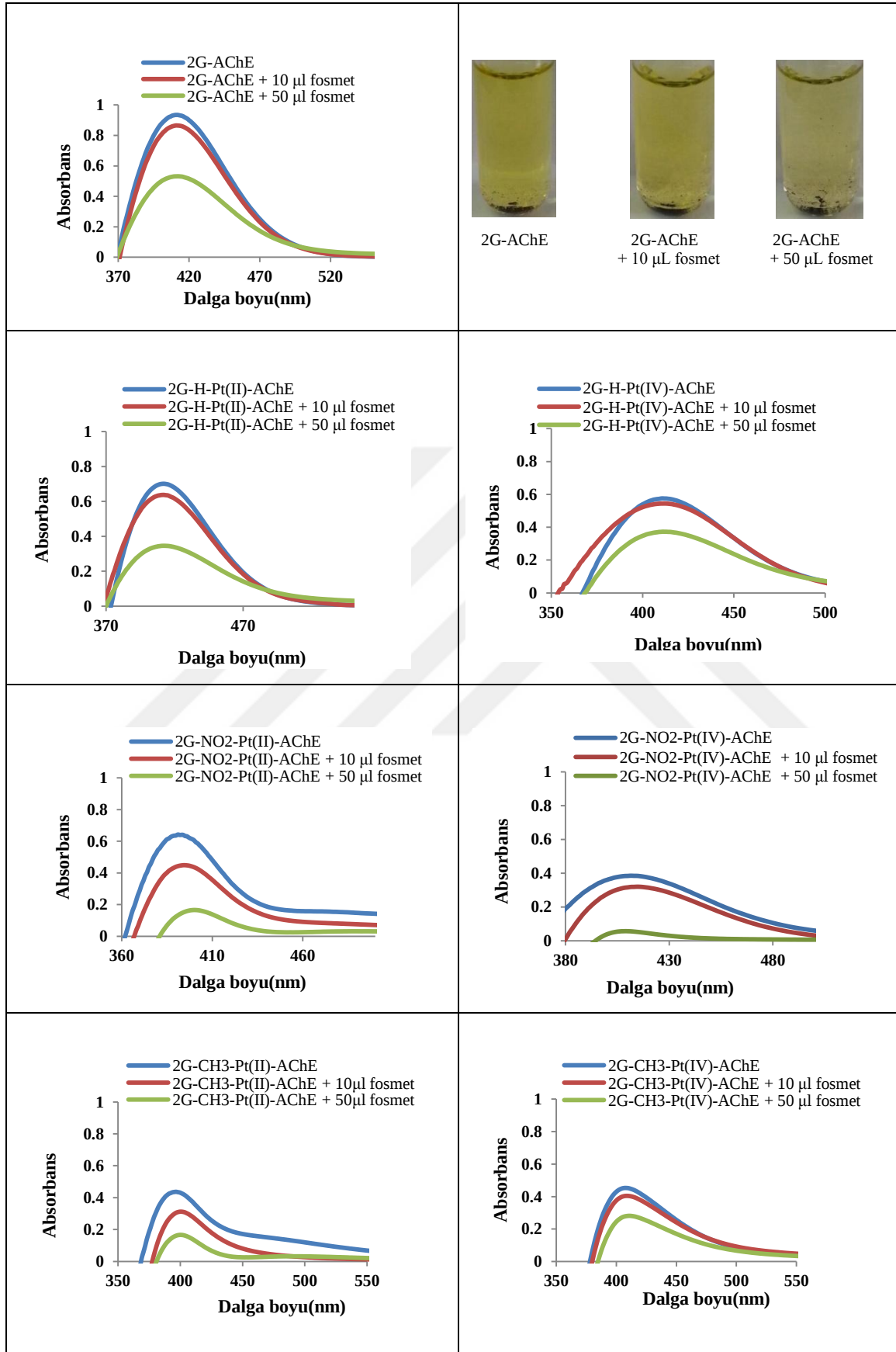
Şekil 5.30.'da immobilize dendrimerlerin bulunduğu ortama 10 ve 50 µl pestisit ilavesi sonucunda absorbands şiddetindeki değişimler kaydedildi. Aynı zamanda Şekil 5.31.'de enzim aktivitesinin yarıya düşmesi için gerekli pestisit miktarları hesaplandı. Elde edilen grafiklerin, kalibrasyon grafiği olarak kullanılabilirliğini araştırmak için derişimini bildiğimiz ($1,86 \times 10^{-7}$ M) fosmet çözeltisinden 22 µl alınıp immobilize 2G-CH₃-Pt(IV)-AChE bulunduğu ortama ilave edilerek Bölüm 4.12.6.'daki işlemler uygulandı. Elde edilen UV-GB spektrumundaki absorbands değerinden (A: 0,367) yararlanarak pestisit miktarına geçildi. Ortama ilave edilen pestisit miktarıyla deney sonucunda bulunan pestisit miktarının (22,06 µl) birbirine çok yakın değerler olduğu tespit edildi. Böylece grafiklerin kalibrasyon grafiği olarak kullanılabilirliği, bu sayede immobilize destek kullanılarak bitkilerde bu pestisitlerden ne kadar bulunduğunu pratik olarak belirlenebileceği ön görüldü. Şekil 5.31.'de 2G-CH₃-Pt(IV)-AChE immobilize dendrimerine ait grafiğin üzerinde yukarıda belirtilen pratik uygulamaya ait bulunan absorbands ve pestisit değeri işaretlendi (mor çizgi).

Grafikler incelendiğinde genel olarak Pt(II) iyonu içeren dendrimerlere immobilize olan enzimin fosmet ile olan inhibisyon etkileşimi, Pt(IV) iyonu içeren immobilize dendrimerlerle olan inhibisyon etkileşiminden daha fazla olduğu görüldü. Bununda nedeninin K_m değerinden ziyade, dendrimerlerin düzlemsel yapıya sahip olarak enzimin üç boyutlu yapısının korunmasıyla substrat ve pestisit rekabetine imkan sağladığı, bu rekabette fosmetin üstün gelmesi sonucunda inhibisyonun meydana geldiği yorumu yapıldı.

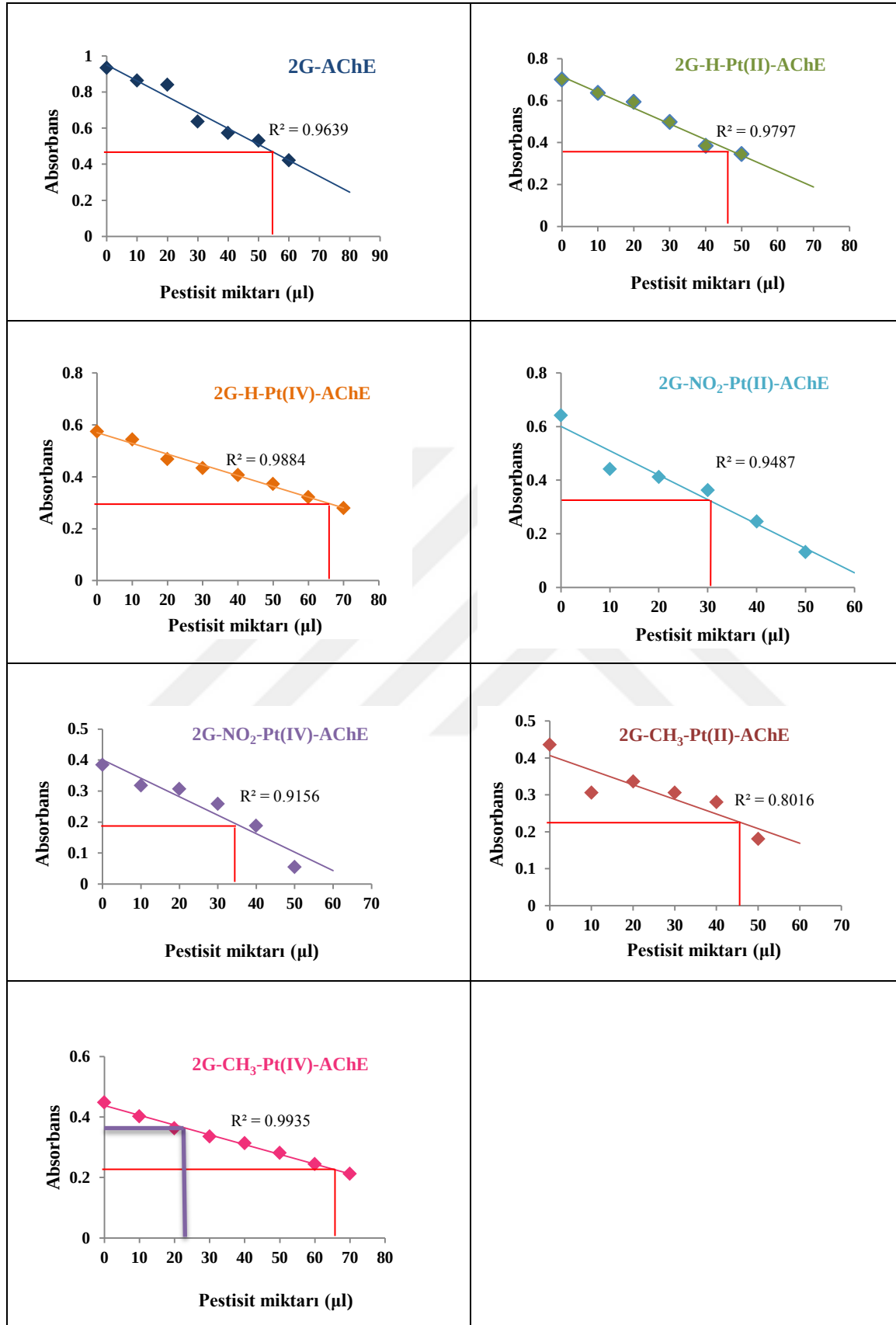
İmmobilize dendrimerler kendi aralarında kıyaslandığında, 2G-NO₂-Pt(II)'nin en etkili olduğu belirlendi. Az miktarda 2G-NO₂-Pt(II)-AChE desteğinin kullanılmasıyla pestisit tayininin yapılabilceği sonucuna varıldı (30,71 µL) . Enzim aktivitesinin yarıya düşmesi için gerekli fosmet miktarının en fazla olduğu dendrimer ise 2G-H-Pt(IV)-AChE olarak belirlendi (67,48 µL).

Çizelge 5.12. İmmobilize dendrimerlere eklenen pestisit (fosmet) hacimleri (µL) ve ölçülen absorbans değerleri

İmmobilize Dendrimerlerin		Eklenen Pestisit (fosmet) Hacimleri (µL)					
Sembolü		-	10	20	30	40	50
2G-AChE	Absorbans Değerleri	0,934	0,864	0,841	0,637	0,574	0,531
2G-H-Pt(II)-AChE		0,701	0,637	0,594	0,498	0,385	0,346
2G-NO ₂ -Pt(II)-AChE		0,642	0,442	0,412	0,363	0,246	0,132
2G-CH ₃ -Pt(II)-AChE		0,436	0,306	0,336	0,306	0,280	0,181
2G-H-Pt(IV)-AChE		0,574	0,544	0,468	0,434	0,407	0,372
2G-NO ₂ -Pt(IV)-AChE		0,385	0,318	0,307	0,259	0,188	0,055
2G-CH ₃ -Pt(IV)-AChE		0,448	0,402	0,363	0,336	0,313	0,281



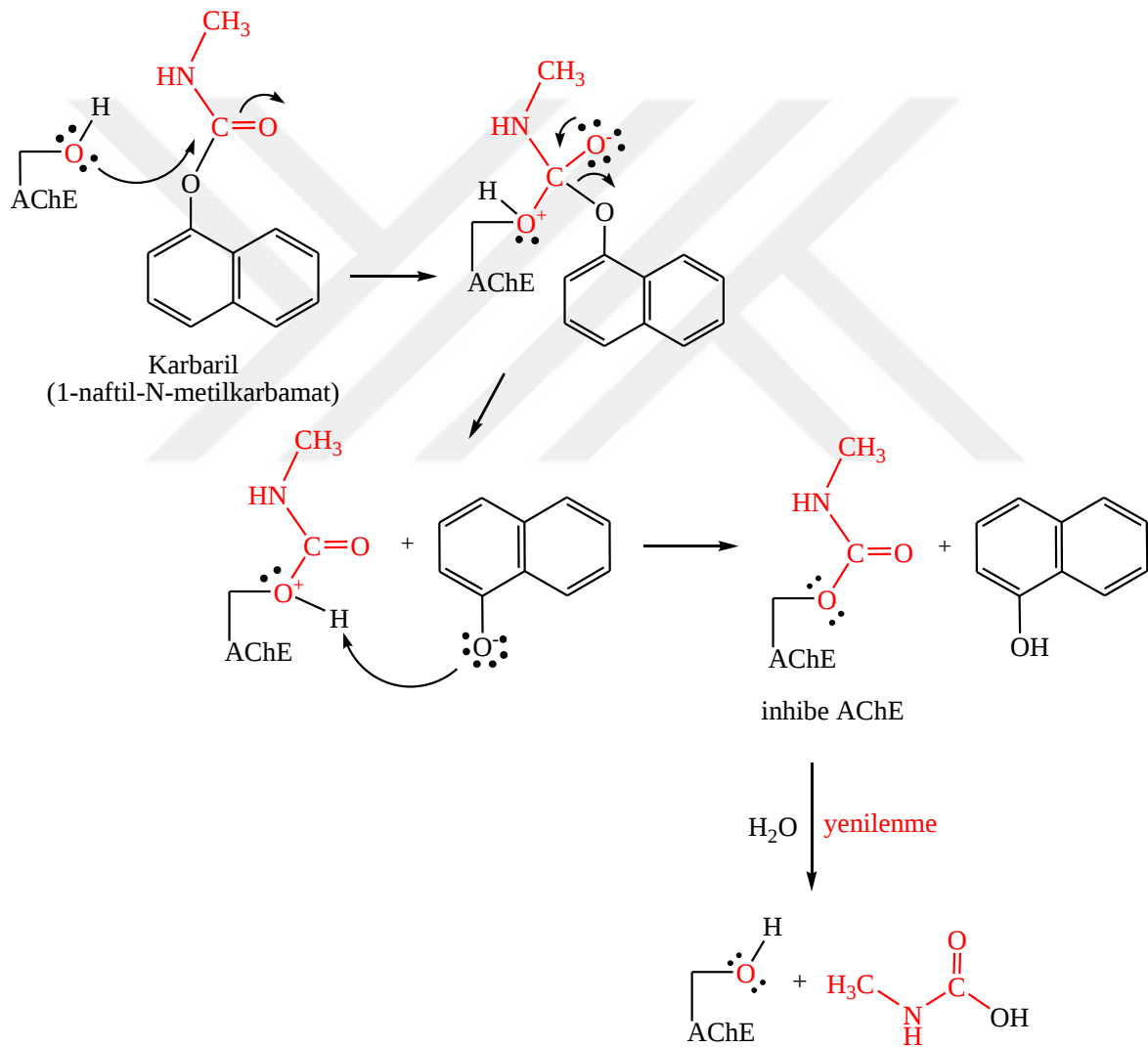
Şekil 5.30. Çalışılan immobilize dendrimerlerin fosmet eklenmesi sonucunda değişen absorbans grafikleri



Şekil 5.31. İmmobilize dendrimerler üzerine ilave edilen fosmet miktarlarına karşı okunan absorbans değerleri

5.4.2. İmmobilize dendrimerlerin karbaril ile olan inhibisyon sonuçlarının değerlendirilmesi

Karbamat grubu insektisitler doğrudan etkili olan AChE inhibitörleridir. Bilindiği gibi hem organik fosforlu hem de karbamat grubu insektisitler AChE'ı inhibe etmektedir. Ancak organik fosforlu insektisitlerin tersine karbamat grubu insektisitlerin inhibisyonu geri dönüşümlüdür. Bu nedenle toksik etki şiddetleri daha düşük olur. Şekil 5.32.'de karbaril (1-naftil-N-metilkarbamat) ile AChE arasında öngörülen inhibisyon mekanizması verildi.



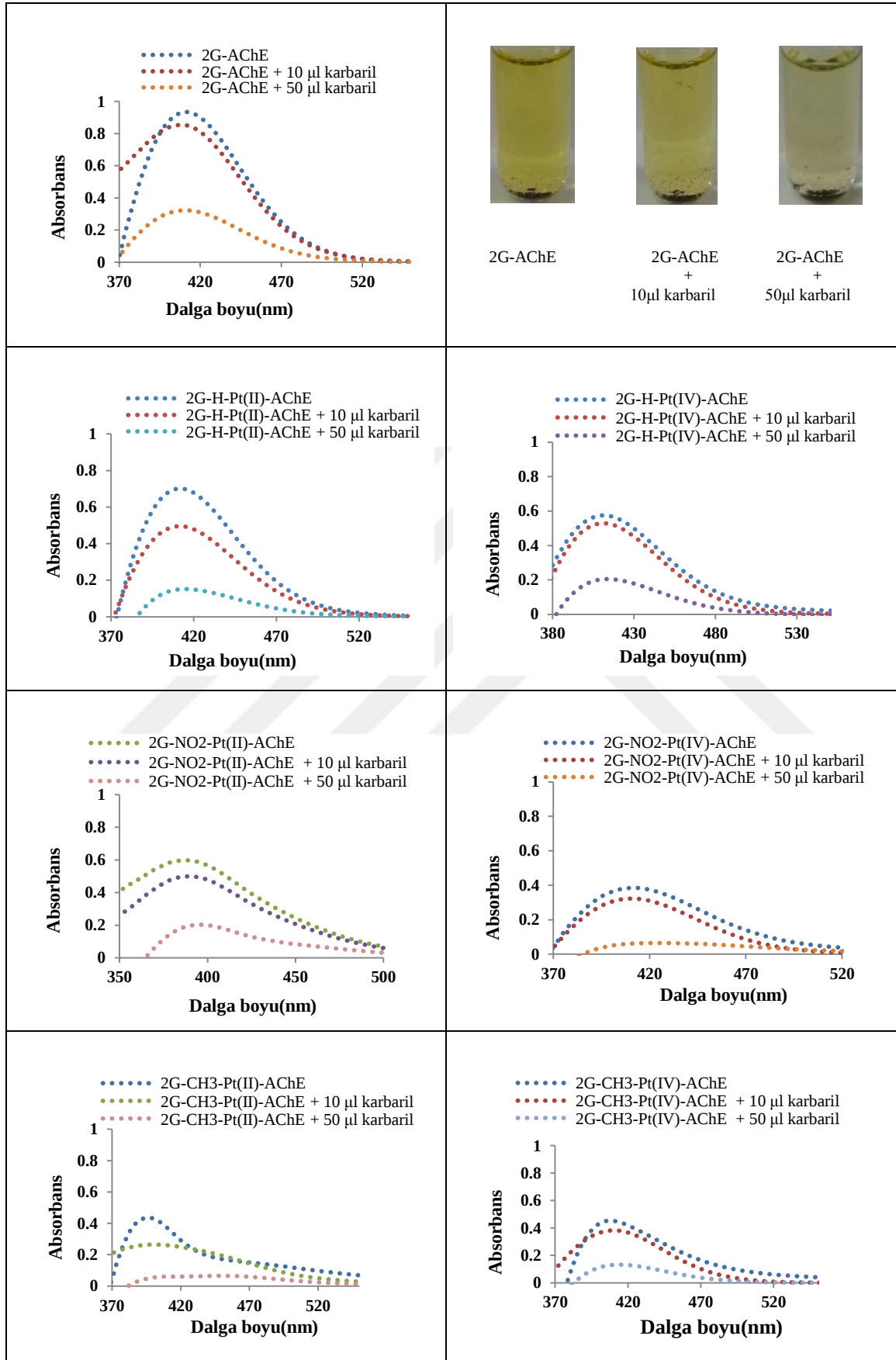
Şekil 5.32. AChE ile karbaril (1-naftil-N-metilkarbamat) arasında gerçekleşen inhibisyon mekanizması

İmmobilize dendrimerlerin karbaril ile olan inhibisyon tepkimesi sonucunda absorbands şiddetindeki değişim Şekil 5.33.'de, enzim aktivitesinin yarıya düşmesi için gerekli pestisit

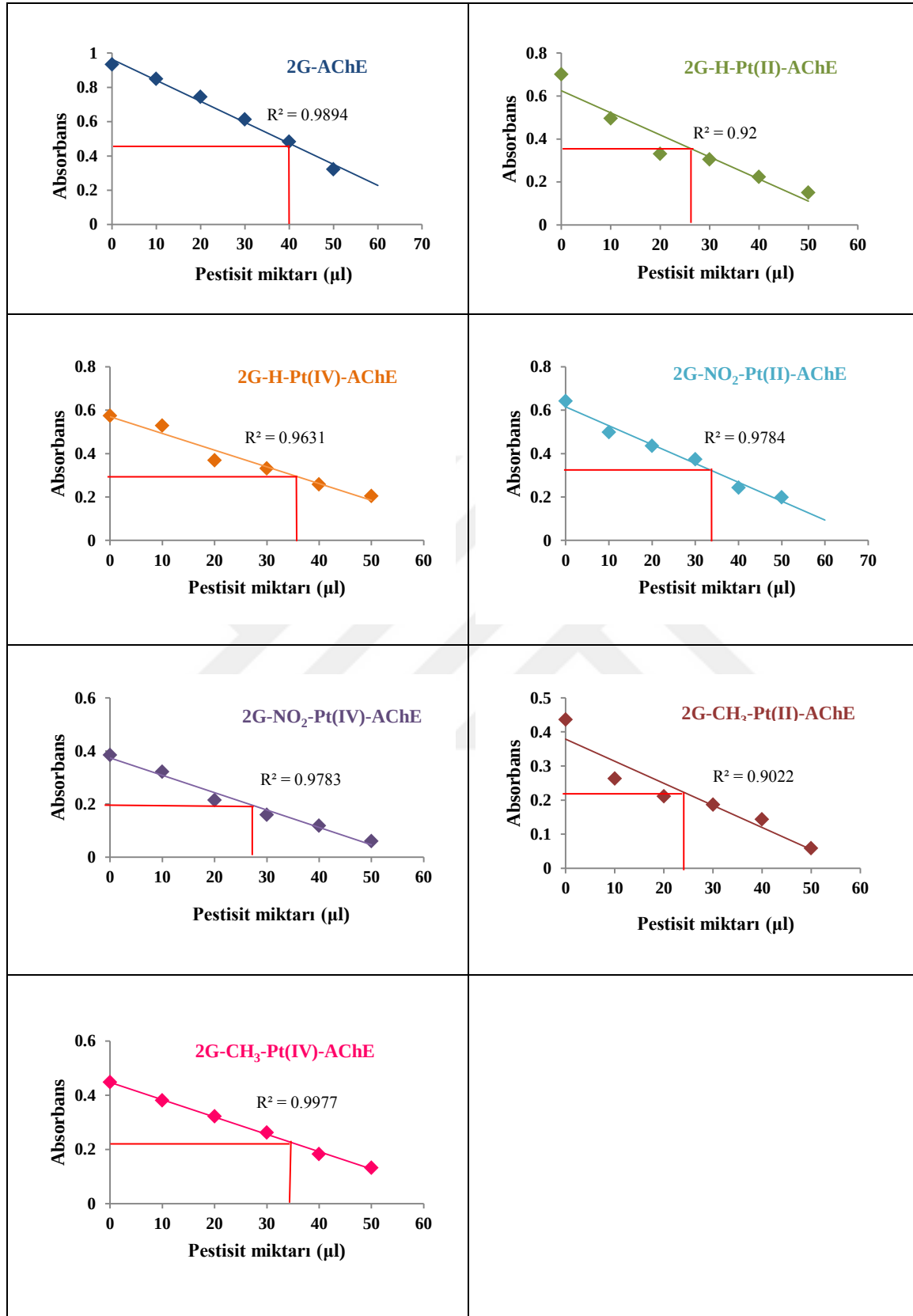
miktarlarına ait kalibrasyon grafikleri ise Şekil 5.34.'de verildi. Karbaril miktarını belirlemek için kullanılan immobilize destekler kendi aralarında kıyaslandığında Pt(II), Pt(IV) ve fonksiyonel grupların çok fazla etkilerinin olmadığı ve enzim aktivitesinin yarıya düşmesi için gerekli pestisit miktarlarının her bir immobilize dendrimer için birbirine yakın olduğu belirlendi.

Çizelge 5.13. İmmobilize dendrimerlere eklenen pestisit (karbaril) hacimleri (μL) ve ölçülen absorbans değerleri

İmmobilize Dendrimerlerin Sembolü		Eklenen Pestisit (karbaril) Hacimleri (μL)					
		-	10	20	30	40	50
<i>2G-AChE</i>	<i>Absorbans Değerleri</i>	0,934	0,850	0,744	0,613	0,483	0,322
<i>2G-H-Pt(II)-AChE</i>		0,701	0,495	0,331	0,304	0,223	0,150
<i>2G-NO₂-Pt(II)-AChE</i>		0,642	0,498	0,435	0,373	0,243	0,198
<i>2G-CH₃-Pt(II)-AChE</i>		0,436	0,263	0,211	0,187	0,144	0,059
<i>2G-H-Pt(IV)-AChE</i>		0,574	0,528	0,368	0,331	0,258	0,204
<i>2G-NO₂-Pt(IV)-AChE</i>		0,385	0,322	0,215	0,160	0,119	0,061
<i>2G-CH₃-Pt(IV)-AChE</i>		0,448	0,381	0,322	0,262	0,182	0,132



Şekil 5.33. Çalışılan immobilize dendrimerlerin karbaril eklenmesi sonucunda değişen absorbans grafikleri

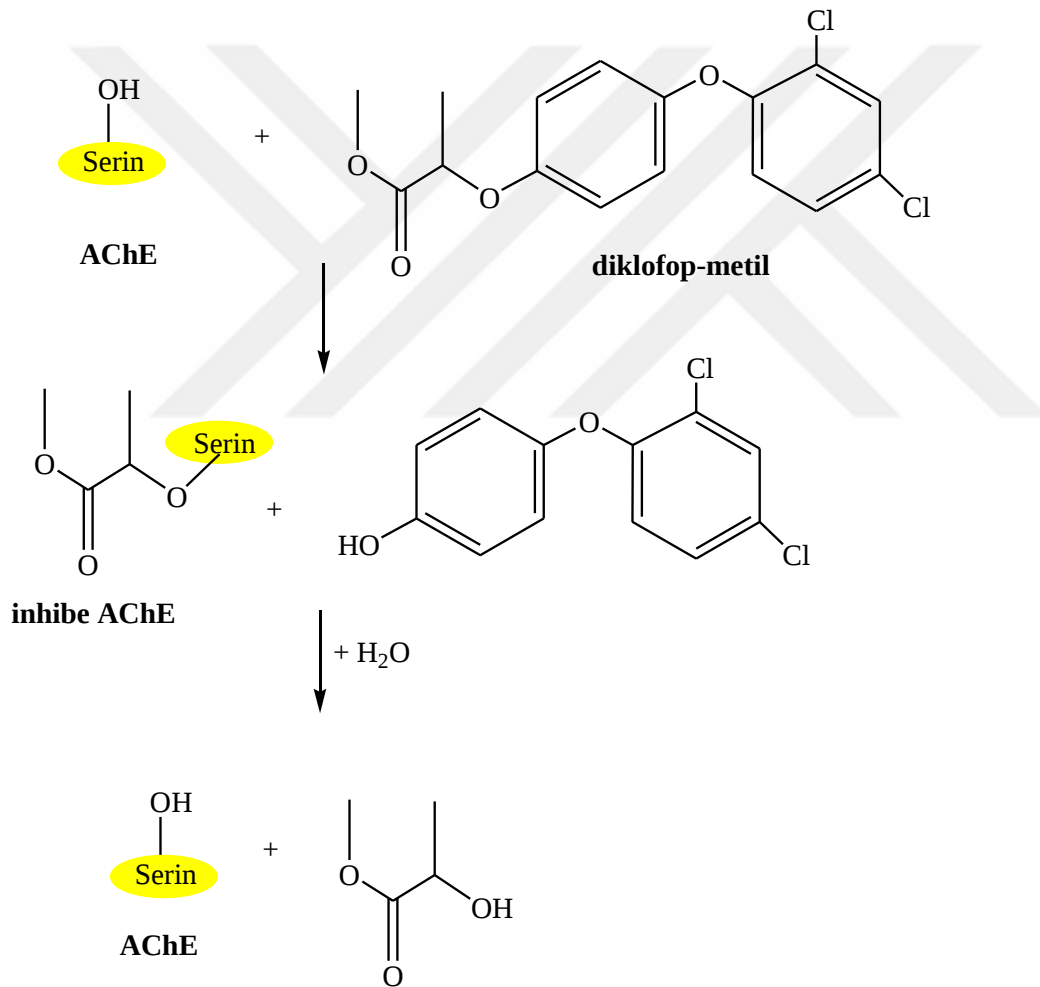


Şekil 5.34. İmmobilize dendrimerler üzerine ilave edilen karbaril miktarlarına karşı okunan absorbans değerleri

5.4.3. İmmobilize dendrimerlerin diklofop-metil ile olan inhibisyon sonuçlarının değerlendirilmesi

AChE aktivitesi, herbisit toksisitesinin bir biyobelirteçi olarak kullanılmaktadır. Bu tür biyobelirteçler günümüzde önem arz etmektedir.

Doktora çalışması kapsamında kullanılan herbisit, diklofop-metil olup immobilize AChE ile tepkimeye girmesi için Bölüm 4.12.6.'da anlatılan deneysel yöntem uygulanarak absorbans değerlerindeki azalma kaydedi. Şekil 5.35.'de diklofop-metil ile AChE arasında öngörülen inhibisyon mekanizması verildi.



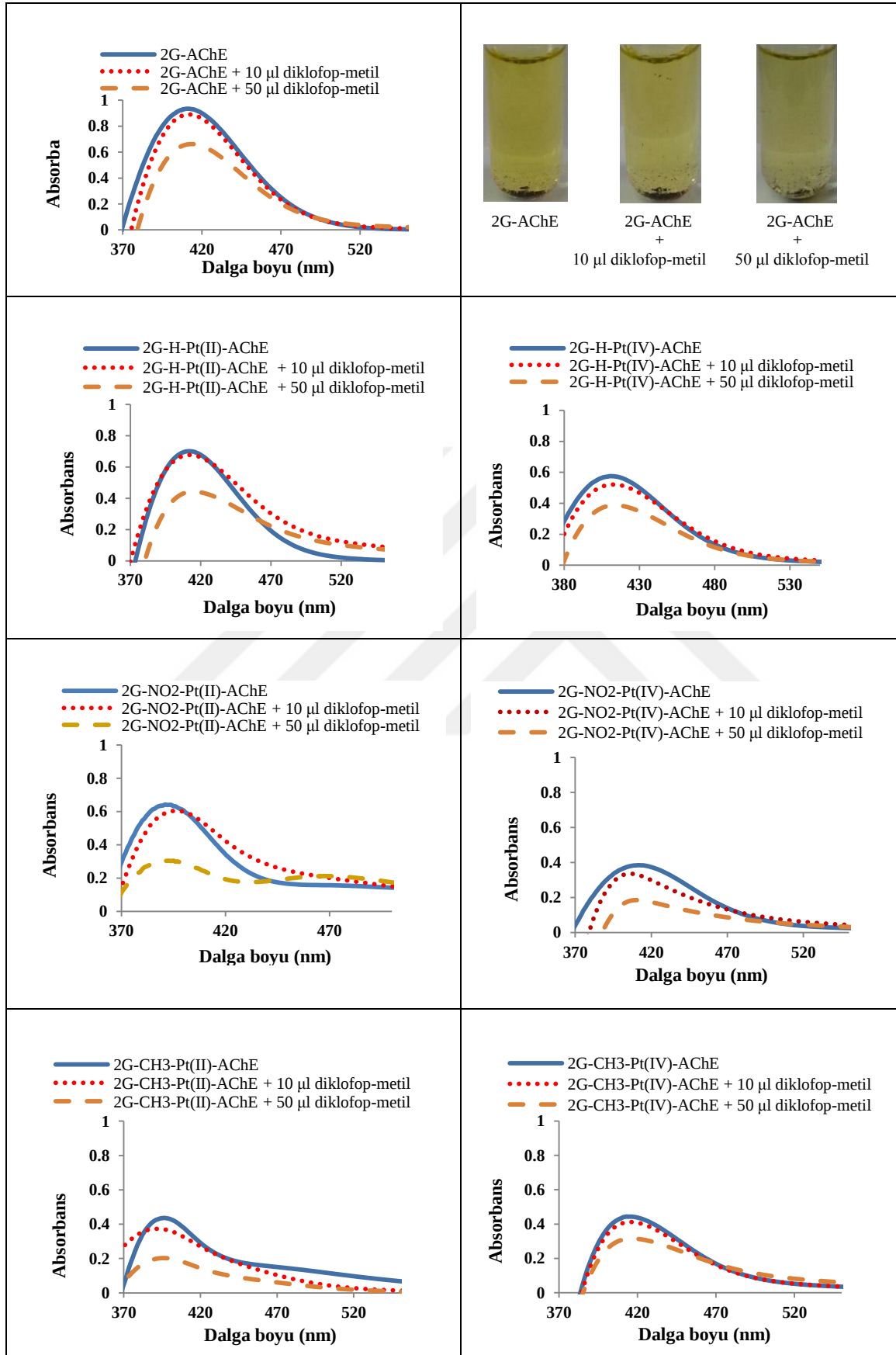
Şekil 5.35. AChE ile diklofop-metil arasında gerçekleşen inhibisyon tepkimesi

İmmobilize dendrimerlerin diklofop-metil ile olan inhibisyon tepkimesi sonucunda absorbans şiddetindeki değişim Şekil 5.36.'da, enzim aktivitesinin yarıya düşmesi için gerekli pestisit miktarlarına ait kalibrasyon grafikleri ise Şekil 5.37.'de verildi. İmmobilize

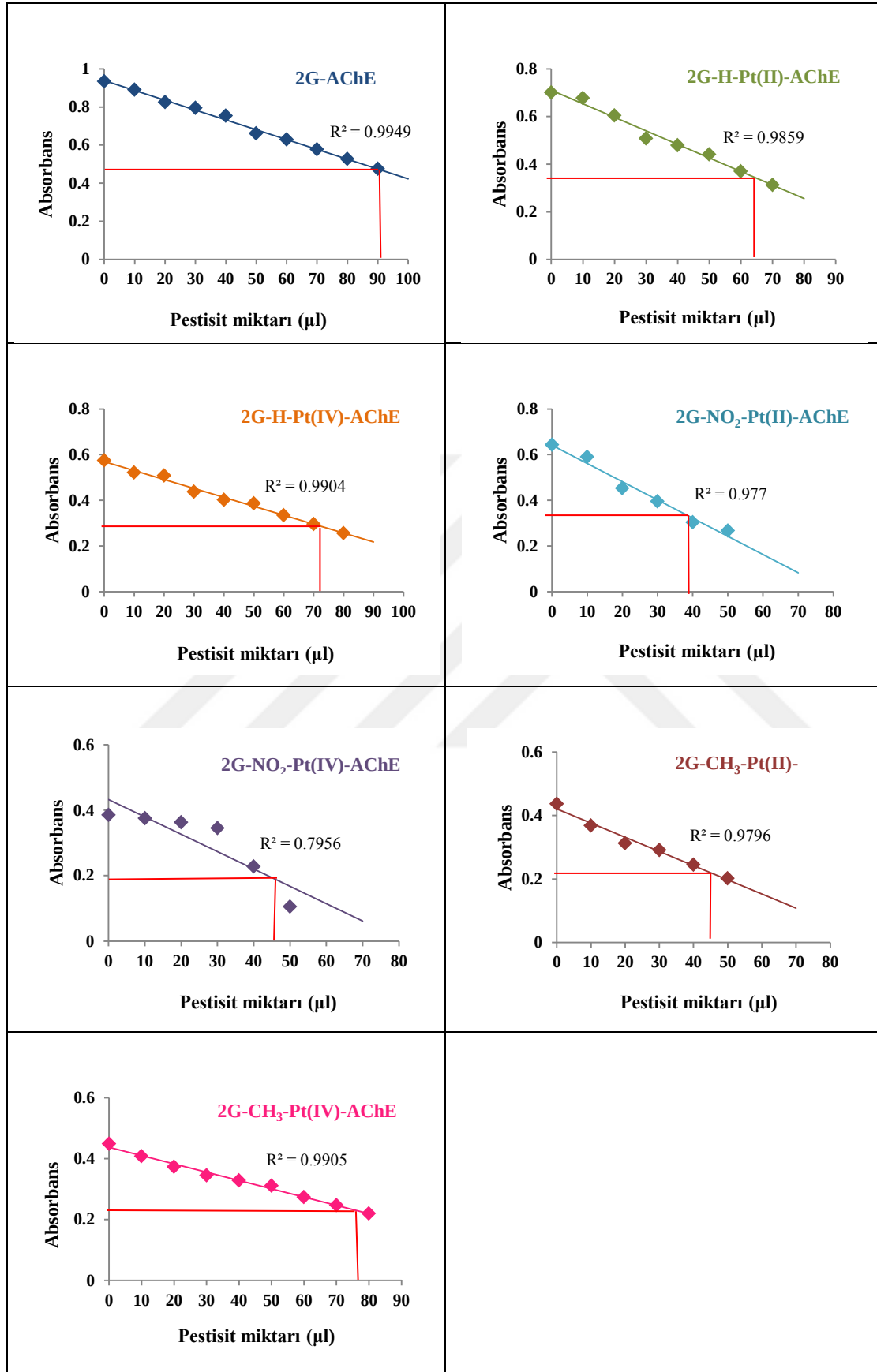
dendrimerler kendi aralarında kıyaslandığında Pt(II) iyonu içerenlerin daha az herbisit ile enzim aktivitelerinin yarıya düştüğü görülürken 2G ligandı için bu değerin oldukça fazla olduğu tespit edildi (90,69 μL). Bu yüzden diklofop-metilin belirlenmesinde 2G ligandının kullanılmasının ekonomik olmayacağı sonucuna varıldı. Kalibrasyon grafikleri incelendiğinde 2G-NO₂-Pt(II)-AChE dendrimerinin enzim aktivitesinin yarıya düşmesi için gerekli pestisit miktarının en düşük olduğu belirlendi (40,01 μL). Pt(II) iyonu içeren dendrimerlere immobilize olan enzimin herbisit ile olan inhibisyon etkileşimi, Pt(IV) iyonu içeren immobilize dendrimerlerle olan inhibisyon etkileşiminden daha fazla olduğu görüldü. Bunun nedeninin, Pt(II) dendrimerlerinin düzlemsel yapıya sahip olması ve enzim ile etkileşmesi sonucunda enzimin üç boyutlu yapısının korunmasında etkili olduğu, böylece substrat ve pestisit rekabetine imkan sağladığı, bu rekabette herbisitün üstün gelerek inhibisyonun meydana geldiği yorumu yapıldı.

Çizelge 5.14. İmmobilize dendrimerlere eklenen pestisit (diklofop-metil) hacimleri (μL) ve ölçülen absorbens değerleri

İmmobilize Dendrimerlerin Sembolü		Eklenen Pestisit (diklofop-metil) Hacimleri (μL)					
		-	10	20	30	40	50
2G-AChE	Absorbans Değerleri	0,934	0,890	0,825	0,795	0,754	0,661
2G-H-Pt(II)-AChE		0,701	0,677	0,604	0,508	0,479	0,441
2G-NO ₂ -Pt(II)-AChE		0,643	0,589	0,453	0,395	0,304	0,267
2G-CH ₃ -Pt(II)-AChE		0,436	0,368	0,312	0,291	0,245	0,202
2G-H-Pt(IV)-AChE		0,574	0,521	0,508	0,437	0,402	0,386
2G-NO ₂ -Pt(IV)-AChE		0,385	0,327	0,290	0,266	0,237	0,185
2G-CH ₃ -Pt(IV)-AChE		0,448	0,408	0,373	0,345	0,328	0,311



Şekil 5.36. Çalışılan immobilize dendrimerlerin diklofop-metil eklenmesi sonucunda değişen absorbans grafikleri



Şekil 5.37. İmmobilize dendrimerler üzerine ilave edilen diklofop-metil miktarlarına karşı okunan absorbans değerleri

6. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ VE ÖNERİLER

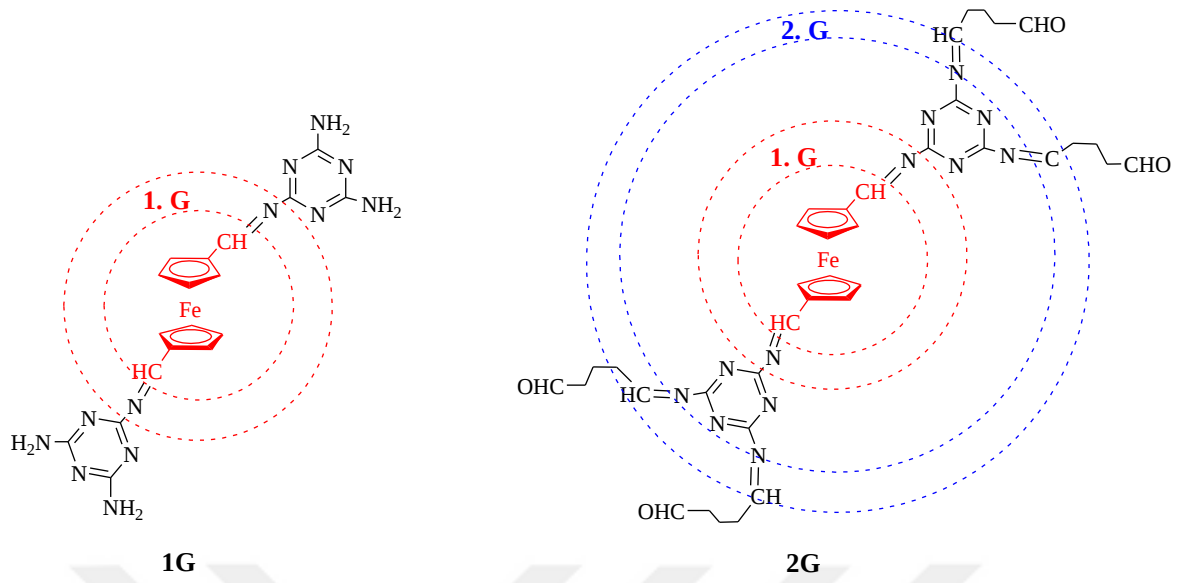
Sunulan çalışma iki bölümden oluşmaktadır. İlk bölüm, ferrosen çekirdekli birinci ve ikinci jenerasyon dendrimerler ile ikinci jenerasyon dendrimerin Pt(II) ve Pt(IV) komplekslerinin sentezi ve karakterizasyonu üzerinedir. İkinci bölüm ise ikinci jenerasyon dendrimeri ve onun Pt(II) ve Pt(IV) komplekslerine β -Glukoz oksidaz (GOx) ve asetilkolinesteraz (AChE) enzimlerinin immobilizasyonu olup immobilize enzimler için optimizasyon (pH ve sıcaklık belirlenmesi) çalışması, kinetik parametrelerinin (K_m ve V_{mak}) belirlenmesi üzerinedir. Ayrıca immobilize GOx enzimi için, yapay idrar ortamında glukoz tayini, immobilize AChE enzimi için ise pestisit tayinine yönelik pratik uygulamalar yapılmıştır.

6.1. Karakterizasyona ait değerlendirmeler

Sentezlenen bileşiklerin yapıları FTIR, UV-Vis, 1H -NMR, AAS, LC-MS, MALDI-TOF MS, termal analiz, molar iletkenlik ve magnetik susceptibilite ölçümleri ile aydınlatıldı. Analiz bulguları ve literatür bilgileri dikkate alınarak ligand ve kompleksler için yapısal formüller önerildi.

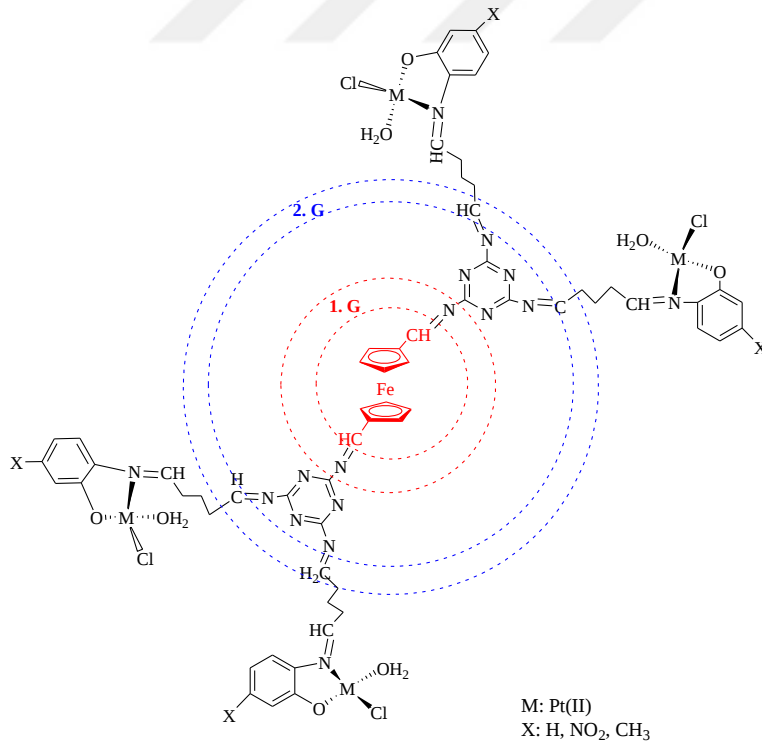
Birinci jenerasyon dendrimerinin (1G), erime noktası 260 °C olarak belirlenirken ikinci jenerasyon dendrimeri (2G) ile metal içeren dendrimerlerin (2G-H-Pt(II), 2G-H-Pt(IV), 2G-NO₂-Pt(II), 2G-NO₂-Pt(IV), 2G-CH₃-Pt(II), 2G-CH₃-Pt(IV)) 300 °C'den daha yüksek sıcaklıklarda bozunduğu belirlendi. Erime/bozunma noktalarına ait bu sonucun, artan mol kütleleri ile ilgili olabileceği yorumu yapıldı.

FTIR, UV-Vis, 1H -NMR, AAS, LC-MS, MALDI-TOF MS, magnetik susceptibilite bulguları ile literatür bilgileri dikkate alınarak 1G ve 2G dendrimerleri için yapısal formüller Şekil 6.1.'deki gibi önerildi.

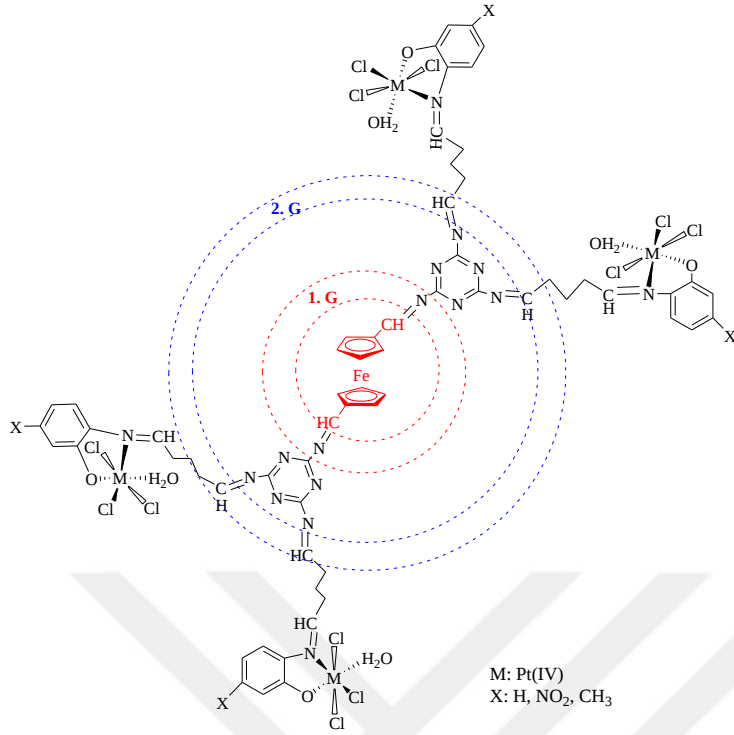


Şekil 6.1. 1G ve 2G dendrimeri için önerilen yapı

Genişletilmiş ikinci jenerasyon dendrimerlerine ait tüm karakterizasyonlar birlikte değerlendirildiğinde, Şekil 6.2.-6.3.'deki gibi yapıların olduğu önerildi.



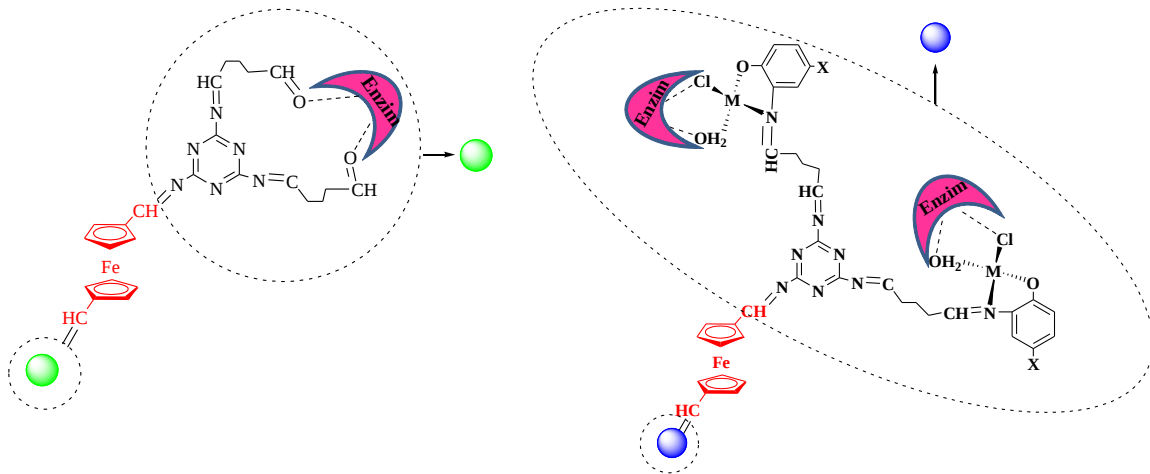
Şekil 6.2. Pt(II) içeren genişletilmiş ikinci jenerasyon dendrimer için önerilen yapı



Şekil 6.3. Pt(IV) içeren genişletilmiş ikinci jenerasyon dendrimer için önerilen yapı

6.2. İmmobilizasyon çalışmalarına ait değerlendirmeler

Tez kapsamında, sentezlenen ikinci jenerasyon dendrimer (2G) ile genişletilmiş ikinci jenerasyon dendrimerlere β -Glukoz oksidaz (GOx) ve asetilkolinesteraz (AChE) enzimleri ayrı ayrı immobilize edildi. Şekil 6.4.'de immobilize dendrimerlerin şematik gösterimi verilmektedir.



Şekil 6.4. İmmobilize dendrimerlerin şematik gösterimi

Çalışılan dendrimerlere enzimlerin immobilizasyonunun, adsorpsiyon, kovalent bağ ya da hidrojen bağlarının oluşumuyla gerçekleştiği söylenebilir.

β -Glukoz oksidaz (GOx) enzim immobilizasyon sonuçları değerlendirildiğinde, immobilize dendrimerlerin optimum pH değerleri 4, 6 ve 8, optimum sıcaklık değerleri ise 40, 50, 60, 70 ve 80 °C olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre;

1. Yüksek sıcaklıkta (70 °C) ve bazik ortamda (pH 8) kullanılacak en uygun dendrimer. 2G-H-Pt(II)-GOx'dir (K_m : 4,85 mM) .
2. Yüksek sıcaklık (60 °C) ve asidik (pH 6) ortama uygun immobilize dendrimer 2G-NO₂-Pt(IV)-GOx'dir (K_m : 20,56 mM).
3. Düşük sıcaklık (40 °C) ve asidik ortama (pH 4) uygun immobilize dendrimer 2G-NO₂-Pt(II)-GOx'dir (K_m : 33,88 mM).
4. Düşük sıcaklık (40 °C) ve bazik ortama (pH 8) uygun immobilize dendrimer 2G-GOx'dir (K_m : 8,35 mM).

Sonuç olarak, düşük sıcaklık (40 °C) ve bazik ortamda glukoz oksidaz enzimi ile çalışılacak ise immobilize 2G dendrimerinin kullanılması uygundur. Bunun yanı sıra asidik ortam ve yüksek sıcaklıklardaki aktiflik tayini için immobilize platin dendrimerlerinin kullanılması uygundur.

İmmobilize dendrimerlerin yapay idrar ortamında tekrar kullanılabilirliği incelendiğinde 2G-NO₂-Pt(IV)-GOx'in diğer dendrimerlerden daha iyi sonuç verdiği belirlendi. Bu immobilize dendrimerin 10 tekrar sonunda bile % 50 civarında aktifliğini koruduğu belirlendi.

Asetilkolinesteraz (AChE) enzim immobilizasyon sonuçları değerlendirildiğinde, immobilize dendrimerlerin optimum pH değeri 8, optimum sıcaklık değerleri ise 40, 50 ve 60 °C olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre;

1. Çalışılan immobilize dendrimerlerden en düşük K_m (0,20 mM) değeri pH 8'de ve 60 °C'de olan 2G-AChE dendrimeridir. Fakat serbest enzimle (K_m : 0,995 mM)

kıyaslandığında daha düşük sıcaklıkta en düşük K_m değeri (0,30 mM) 2G-NO₂-Pt(II)-AChE dendrimerine aittir.

2. Yüksek sıcaklık (60 °C) ve bazik (pH 8) ortama uygun immobilize dendrimer 2G-AChE'dir.
3. Düşük sıcaklık (40 °C) ve bazik ortama (pH 8) uygun immobilize dendrimer 2G-NO₂-Pt(II)-AChE' dir.

Sonuç olarak, enzim aktifliği üzerine düşük sıcaklık (40 °C) ve bazik ortamda çalışılacak ise 2G-NO₂-Pt(II) dendrimerinin immobilize edilmesi uygundur.

İmmobilize dendrimerin, enzim-substrat veya enzim-pestisit ile olan reaksiyonlardan hangisinin baskın olduğu % inhibisyon değerine göre yorumlandı. Bu yorum meydana gelen ürünün renk şiddetine bağlı olarak yapıldı. Buna göre;

1. Enzim-substrat etkileşimi sonucunda oluşan reaksiyondaki (Şekil 4.12.) ürünün sarı rengi şiddetli olarak görünüyorsa, enzim-substrat etkileşimi baskındır.



A



B



C

Resim 6.1. (A) Enzim-substrat etkileşimi baskın, (B) Enzim-substrat etkileşimi zayıf, (C) Enzim-pestisit etkileşimi baskın

2. Enzim-pestisit etkileşimi Şekil 4.12.'de verilen reaksiyona göre oluşan ürünün sarı renginin şiddetinde bir azalma veya renksizleşme görünüyorsa, enzim-pestisit etkileşimi baskındır.

Enzim-pestisit etkileşiminin incelenmesi üzerine olan çalışmanın sonucunda immobilize dendrimerlerin pestisitlerle olan etkileşim kuvveti karbaril (1-naftil-N-metilkarbamat) > fosmet > dikolofop-metil sırasında olduğu görüldü.

Çalışılan immobilize dendrimerler içerisinde 2G-CH₃-Pt(II)-AChE dendrimerin inhibisyonunda daha etkili olduğu görüldü.

6.3. Öneriler

Tez kapsamında, ferrosen içeren yeni dendrimerler sentezlenmiştir. Ferrosenin elektron sağlamada bir medyatör olarak rol oynadığı bu çalışmada da öngörüldü. Bu tür dendrimerlerin, elektron transferinin önemli olduğu diğer enzim çalışmalarında da kullanılabileceği öngörüldü. Bunun yanı sıra ferrosen içeren dendrimerler bazı hastalıkların (yumurtalık kanseri) teşhis ve tedavisinde kullanılabileceği söylenebilir.

Sentezlenen 2G dendrimerine farklı gruplar bağlayarak, çalışılan enzimin desteğe daha iyi tutunması sağlanabilir. Böylece serbest enzime göre, depolama kararlılığı, tekrarlanabilirliği ve kinetik parametreleri geliştirilebilir.

İmmobilize enzimin serbest enzime göre farklı pH ve sıcaklıklarda çalışması avantaj olarak değerlendirilebilir. Saflaştırma maliyeti yüksek olan serbest enzimlerin, bu tür materyaller üzerine immobilize edilmesi sayesinde endüstriye ekonomik katkılar sağlayabilir.

Dendrimerlere immobilize olan asetilkolinesteraz (AChE) enziminin çalışılan üç pestisit tayinine olumlu cevap vermesinden dolayı diğer pestisitlerin de tayininin yapılabileceği söylenebilir. Glukoz oksidaz (GOx) enzimi ile immobilize olan dendrimerin, yapay idrar ortamındaki glukozun tayinde kullanılabilir olması, glukozun belirlenmesinde yeni bir materyalin tasarlanmasını mümkün kılabilir.

KAYNAKLAR

1. Froehling, P. E. (2001). Dendrimers and dyes-a review. *Dyes and Pigments*, 48, 187-195.
2. İnternet: Sinir Hücresinin (Nöronun) Yapısı ve Görevleri. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.bilimvesaglik.com%2Fsinir-sistemi%2Fsinir-hucresinin-noronun-yapisi-ve-gorevleri.html&date=2016-11-29>, Son Erişim Tarihi: 29.11.2016.
3. Newkome, G. R., Yao, Z. Q., Baker, G. R., Gupta, V. K. (1985). Micelles. Part 1. Cascade molecules: a new approach to micelles. A [27]-arborol. *Journal of Organic Chemistry*, 50, 2003-2004.
4. Liu, L. J., Shi, S. H., Zhuo, R. X., Lu, Z. R. (1998). Preparation of dendrimers from macromolecular cores and papain immobilization. *Chinese Chemical Letters*, 9, 263-264.
5. Alvarez, J., Sun, L., Crooks, R. M. (2002). Electroactive composite dendrimer films containing thiophene-terminated poly(amidoamine) dendrimers cross-linked by poly(3-methylthiophene). *Chemistry of Materials*, 14, 3995-4001.
6. Armada, M. P. G., Losada, J., Zamora, M., Alonso, B., Cuadrado, I., Casado, C. M. (2006). Electrocatalytical properties of polymethylferrocenyl dendrimers and their applications in biosensing. *Bioelectrochemistry*, 69, 65-73.
7. Frasconi, M., Deriu, D., D'Annibale, A., Mazzei, F. (2009). Nanostructured materials based on the integration of ferrocenyl-tethered dendrimer and redox proteins on self-assembled monolayers: an efficient biosensor interface. *Nanotechnology*, 20, 505501-505509.
8. Yetim, K. N., Özkan, H. E., Daniş, B., Tümtürk, H., Sarı, N. (2015). 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.
9. Dhull, V., Gahlaut, A., Dilbaghi, N., Hooda V. (2013). Acetylcholinesterase Biosensors for Electrochemical Detection of Organophosphorus Compounds: A Review. *Biochemistry Research International*, 2013, 1-18.
10. Andres, R. T., Narayanaswamy, R. (1997). Fibre-Optic Pesticide Biosensor Based on Covalently Immobilized Acetylcholinesterase and Thymol Blue. *Talanta*, 44 (8), 1335-1352.
11. Cram, D. J., Cram, J. M. (1974). Host-Guest Chemistry: Complexes between organic compounds simulate the substrate selectivity of enzymes. *Science*, 183(4127), 803-809.
12. Pedersen, C. J. (1988). The Discovery of Crown Ethers. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 27, 1021-1027.

13. Lehn, J. M. (1978). Cryptates: the chemistry of macropolycyclic inclusion complexes. *Accounts of Chemical Research*, 11 (2), 49-57.
14. Lehn, J. M. (1978). Cryptates: inclusion complexes of macropolycyclic receptor molecules. *Pure and Applied Chemistry*, 50, 871-892.
15. Lehn, J. M. (1985). Supramolecular Chemistry: Receptors, Catalysts and Carriers. *Science*, 227, 849-856.
16. Lehn, J.-M. (1988). Supramolecular chemistry - scope and perspectives molecules, supermolecules, and molecular devices. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 27, 89-112.
17. Vögtle, F. Weber, E. (1974). Octopus molecules. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 13, 814-816.
18. Murakami, Y. Nakano, A. Akiyoshi, K. Fukuya, K. (1981). Syntheses of macrocyclic enzyme models. Part 4. Preparation and characterization of cationic octopus azaparacyclophanes. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1, 2800-2808.
19. Buhleier, E., Wehner, W., Vögtle, F. (1978). "Cascade"- and "nonskid-chain-like" syntheses of molecular cavity topologies. *Synthesis*, 9(2), 155-158.
20. Denkewalter, R. G., Kolc J., Lukasavage, W. J. (1981), Molecular-size Nanocage For Catalysis: Shell Cross-linked Carbamate. *Journal of the American Chemical Society*, 4, 289-872.
21. Tomalia, D. A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J., Smith, P. (1986). Dendritic macromolecules: synthesis of starburst dendrimers. *Macromolecules*, 19, 2466–2468.
22. Tomalia, D. A., Hall, M., Hedstrand, D. (1987). Starburst dendrimers. III. The importance of branch junction symmetry in the development of topological shell molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 109 (5), 1601–1603.
23. Tomalia, D. A., Berry, V., Hall, M., Hedstrand, D. M. (1987). Starburst dendrimers. 4. Covalently fixed unimolecular assemblages reminiscent of spheroidal micelles. *Macromolecules*, 20 (5), 1164–1167.
24. Newkome, G. R., Yao, Z., Baker, G. R., Gupta, V. K., Russo, P. S., Saunders, M. J. (1986). Cascade molecules: Synthesis and characterization of a venzene[9] 3-arborol. *Journal of the American Chemical Society*, 108(4), 849-850.
25. Pushkar, S., Philip, A., Pathak, K., Pathak, D. (2006). Dendrimers: Nanotechnology derived novel polymers in drug delivery. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 40 (3), 153-158.
26. Sakthivel, T., Florence, A. T. (2003). Adsorption of amphipathic dendrons on polystyrene nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 254, 23-26.
27. Boas, U., Christensen, J. B., Heegaard, P. M. H. (2006). Dendrimers: Design, synthesis and chemical properties. *Journal of Materials Chemistry*, 16, 3785-3798.

28. Klajnert, B., Bryszewska, M. (2001). Dendrimers: properties and applications. *Acta Biochimica Polonica*, 48, 199-208.
29. Fréchet, J. M. J. (1994). Functional polymers and dendrimers: Reactivity, molecular architecture, and interfacial energy. *Science*, 263, 1710-1715.
30. Mourey, T. H., Turner, S. R., Rubenstein, M., Fréchet, M. J., Hawker, C. J., Wooley, K. L. (1992). Unique behaviour of dendritic macromolecules:intrinsic viscosity of polyether dendrimers. *Macromolecules*, 25(9), 2401-2406.
31. Zhang, L., Gu, F. X., Chan, J. M., Wang, A. Z., Langer, R. S., and Farokhzad, O. C. (2008). Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 83, 761-769.
32. Lee, J. H. and Nan, A. (2012). Review Article, Combination drug delivery approaches in, metastatic breast cancer. *Journal of Drug Delivery*, 2012, 1-17.
33. Roberts, J. C., Bhalgat, M. K., Zera, R. T. (1996). Preliminary biological evaluation of polyaminoamine (PAMAM) Starburst dendrimers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 30, 53-65.
34. Karabulut, B., Kerimoğlu, O., Uğurlu, T. (2015). Dendrimerler-ilaç taşıyıcı sistemler, *MÜSBED*, Derleme, 1(1), 31-40.
35. Hodge, P. (1993). Polymer science branches out. *Nature*, 362, 18-19.
36. Hawker, C. J., Fréchet, J. M. J. (1990). Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *Journal of the American Chemical Society*, 112, 7638-7647.
37. Colinger, M. (2002). Biological applications of dendrimers. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6, 742-748.
38. Welch, P. M., Welch, C. F. (2009). Tecto-Dendrimers: A study of covalently bound nanospheres. *Macromolecules*, 42, 7571-7578.
39. Dvornic, P. R., Li, J., de Leuze-Jallouli, A. M., Reeves, S. D., Owen, M. J. (2002). Nanostructured dendrimer-based networks with hydrophilic polyamidoamine and hydrophobic organosilicon domains. *Macromolecules*, 35, 9323-9333.
40. Hawker, C., Fréchet, J. M. J. (1990). A new convergent approach to monodisperse dendritic macromolecules. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 15, 1010-1013.
41. Hawker, C. J., Fréchet, J. M. J. (1990). Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *Journal of the American Chemical Society*, 112(21), 7638-7647.
42. Hawker, C. J., Wooley, K. L., Fréchet, J. M. J. (1993). Unimolecular micelles and globular amphiphiles: dendritic macromolecules as novel recyclable solubilization agents. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 12, 1287-1297.

43. Piotti, M. E., Rivera, Jr. F., Bond, R., Hawker, C. J., Frechet, J. M. J. (1999). Synthesis and catalytic activity of unimolecular dendritic reverse micelles with 'internal' functional groups. *Journal of the American Chemical Society*, 121, 9471-9472.
44. Deb, A. K., Das, S. C., Saha, A., Wayu, M. B., Marksberry, M. H., Baltz, R. J., Chusuei, C. C. (2016). Ascorbic acid, acetaminophen, and hydrogen peroxide detection using a dendrimer-encapsulated Pt nanoparticle carbon nanotube composite. *Journal of Applied Electrochemistry*, 46, 289-298.
45. Hackbarth, C. J., Chambers, H. F. (1993). blaI and blaR1 regulate beta-lactamase and PBP 2a production in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(5), 1144-1149.
46. Yang, J., Shen, H., Zhang, X., Tao, Y., Xiang, H., Xie, G. (2016). A novel platform for high sensitivity determination of Pbp2a based on gold nanoparticles composited graphitized mesoporous carbon and doxorubicin loaded hollow gold nanospheres. *Biosensors and Bioelectronics*, 77, 1119-1125.
47. Tang, M. C., Tsang, D. P. K., Wong, Y. C., Chan, M. Y., Wong, K. M. C., Yam, V. W. W. (2014). Bipolar gold(III) complexes for solution-processable organic light-emitting devices with a small efficiency roll-off. *Journal of the American Chemical Society*, 136, 17861-17868.
48. Dufès, C., Uchegbu, I.F., Schätzlein, A.G. (2005). Dendrimers in gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 2177-2202.
49. Tomalia, D.A. (2005). Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic polymer chemistry. *Progress in Polymer Science*, 30, 294-324.
50. Park, D. W., Hoffman, A. S., Pun, S., Stayton, P. S. (2005). Design and development of polymers for gene delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 581-593.
51. Wang, F., Hu, K., Y. Cheng, Y. (2016). Structure–activity relationship of dendrimers engineered with twenty common amino acids in gene delivery. *Acta Biomaterialia*, 29, 94-102.
52. Sánchez-Nieves, J., Fransen, P., Pulido, D., Lorente, R., Muñoz-Fernández, M., Albericio, F., Royo, M., Gómez, R., Javier de la Mata, F. (2014). Amphiphilic cationic carbosilane-peg dendrimers: Synthesis and applications in gene therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 76, 43-52.
53. Kesharwani, P., Tekade, R. K., Jain, N. K. (2014). Generation dependent cancer targeting potential of poly(propyleneimine) dendrimer. *Biomaterials*, 35, 5539-5548.
54. Korani, A., Salimi, A. (2013). Fabrication of high performance bioanode based on fruit fulassociation of dendrimer and carbon nanotube used for design O₂/glucose membrane-less biofuel cell with improved bilirubine oxidase biocathode. *Biosensors and Bioelectronics*, 50, 186-193.
55. Crespilho, F. N., Ghica, M. E., Florescu, M., Nart, F. C., Oliveira Jr, O. N., Brett, C. M. A. (2006). A strategy for enzyme immobilization on layer-by-layer dendrimer-gold nanoparticle electrocatalytic membrane incorporating redox mediator. *Electrochemistry Communications*, 8, 1665-1670.

56. Shen, W.-J., Zhuo, Y., Chai, Y.-Q., Yang, Z.-H., Han, J., Yuan, R. (2015). Enzyme-free electrochemical immunosensor based on host-guest nanonets catalyzing amplification for procalcitonin detection. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7, 4127-4134.
57. Wilkinson, G., Rosenblum, M., Whiting, M. C., Woodward, R. B. (1952). The structure of Iron bis-cyclopentadienyl, *Journal of the American Chemical Society*, 74 (8), 2125-2126.
58. Kealy, T. J., Pauson, P. L. (1951). A New type of organo-iron compound. *Nature*, 168, 1039-1040.
59. Baş, S. Z., Maltasa, E., Sennik, B., Yilmaz, F. (2014). Design of an electrochemical biosensing system for xanthine detection and a study on binding interaction of ketoconazole with xanthine oxidase. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 444, 40-47.
60. Douglass, I. B. (1937). Acylselenoureas. *Journal of the American Chemical Society*, 59 (4), 740-742.
61. Hussain, R. A., Badshah, A., Sohail, M., Lal, B., Akbar, K. (2013). Synthesis, chemical characterization, DNA binding and antioxidant studies of ferrocene incorporated selenoure. *Journal of Molecular Structure*, 1048, 367-374.
62. Denga, K., Zhou, J., Li, X. (2013). Noncovalent nanohybrid of ferrocene with chemically reduced graphene oxide and its application to dual biosensor for hydrogen peroxide and choline. *Electrochimica Acta*, 95, 18-23.
63. Bourigua, S., El Ichi, S., Korri-Youssouf, H., Maaref, A., Dzyadevych, S., Renault, N. J. (2011). Electrochemical sensing of trimethylamine based on polypyrrole-flavin-containing monooxygenase (FMO₃) and ferrocene as redox probe for evaluation of fish freshness. *Biosensors and Bioelectronics*, 28, 105-111.
64. Deng, L., Wang, L., Yu, H., Wang, J., Dong, X., Li, J., Tan, Q., Huo, J. (2007). Synthesis and electrochemical properties of phloroglucin-based ferrocenyl compounds and their application in anion recognition. *Journal of Applied Polymer Science*, 107, 1539-1546.
65. De Jong, E. R., Manoury, E., Daran, J. C., Turrin, C. O., Chiffre, J., Sournia-Saquet, A., Knoll, W., Majoral, J. P., Caminade, A. M. (2012). Synthesis and characterization of water-soluble ferrocene-dendrimers. *Journal of Organometallic Chemistry*, 718, 22-30.
66. Enríquez, A., González-Vadillo, A. M., Martín-Montero, I., Bruña, S., Leemans, L., and Cuadrado, I. (2014). Efficient thiol-yne click chemistry of redox-active ethynylferrocene. *Organometallics*, 33, 7307-7317.
67. Bruña, S., Martínez-Montero, I., González-Vadillo, A. M., Martín-Fernández, C., Montero-Campillo, M. M., MÓ, O., Cuadrado, I. (2015). Ferrocene and silicon-containing oxathiacrown macrocycles and linear oligo-oxathioethers obtained via thiol-ene chemistry of a redox-active bifunctional vinyl-disiloxane. *Macromolecules*, 48, 6955-6969.

68. Lease, N., Vasilevski, V., Carreira, M., de Almeida, A., Sanau, M., Hirva, P., Casini, A., Contel, M. (2013). Potential anticancer heterometallic Fe-Au and Fe-Pd agents: initial mechanistic insights. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56, 5806-5818.
69. Govender, P., Lemmerhirt, H., Hutton, A. T., Therrien, B., Bednarski, P. J., Smith, G. S. (2014). First- and second-generation heterometallic dendrimers containing ferrocenyl–ruthenium(II)–arene motifs: Synthesis, structure, electrochemistry, and preliminary cell proliferation studies. *Organometallics*, 33, 5535-5545.
70. Wiseman, A. (1987). *The application of enzymes in industry* (Second Edition). U.K.: Handbook of Enzymes Biotechnology, 274-373.
71. 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.
72. Uludağ, Y. B. (2000). *İmmobilize glukomilaz ile maltodekstrinden glukoz üretimi*, Yüksek Lisans Tezi, Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli.
73. Varavinit, S., Chaokasema, N., Shobsngob, S. (2002). Immobilization of a thermostable alpha-amylase. *ScienceAsia*, 28: 247-251.
74. Tükel, S.S., Alptekin, Ö. (2004). Immobilization and kinetics of catalase onto magnesium silicate. *Process Biochemistry*, 39, 2149-2155.
75. Mohamada, N. R., Marzukia, N. H. C., Buanga, N. A., Huyopb F., AbdulWahab, R. (2015). Review; Agriculture and environmental biotechnology, An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 29(2), 205-220.
76. Jegannathan, K. R., Abang, S., Poncelet, D., Chan, E. S., Ravindra, P. (2008). Production of biodiesel using immobilized lipase a critical review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28, 253-264.
77. Sheldon, R. A. (2007). Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349, 1289-1307.
78. Nobuaki, S., Shunsuke, K., Kazuhiro, U., Toshihisa, U., Kai, K. (2014). Preparation of an enzyme/inorganic nanosheet/magnetic bead complex and its enzymatic activity. *Journal of Materials Science*, 49, 8010-8015.
79. Eldin, M. S. M., Schroën, C. G. P. H., Janssen, A. E. M., Mita, D. G., Tramper, J. (2000). Immobilization of penicillin G acylase onto chemically grafted nylon particles. *Journal of the Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10, 445-451.
80. Albayrak, N., Yang, S.T. (2002). Immobilization of beta-galactosidase on fibrous matrix by polyethyleneimine for production of galacto-oligosaccharides from lactose. *Biotechnology Progress*, 18, 240-251.
81. Subramanian, A., Kennel, S. J., Oden, P. I., Jacobson, K. B., Woodward, J., Doktycz, M. J. (1999). Comparison of techniques for enzyme immobilization on silicon

- supports - Effect of cross-linker chain length on enzyme activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(1), 26-34.
82. Quijcho, F. A., Richards, F. M. (1964). Intermolecular cross-linking of protein in crystalline state-carboxypeptidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 52, 833-839.
 83. Wang, A.M., Liu, M.Q., Wang, H., Zhou, C., Du, Z. Q., Zhu, S. M., Shen, S. B., Ouyang, P. K. (2008). Improving enzyme immobilization in mesocellular siliceous foams by microwave irradiation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106, 286-291.
 84. Sperinde, J. J., Griffith, L. G. (1997). Synthesis and characterization of enzymatically-crosslinked poly(ethylene glycol) hydrogels. *Macromolecules*, 30, 5255-5264.
 85. Datta, S., Rene C. L., Rajaram, Y. R.S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotechnology*, 3(1), 1-9.
 86. Gorecka, E., Jastrzebska, M. (2011). Immobilization techniques and biopolymer carriers. *Biotechnology and Food Science*, 75, 65-86.
 87. Aksoy, S., Tümtürk, H., Hasirci, N. (1998). Stability of α -amylase immobilized on poly(methyl methacrylate-acrylic acid) microspheres. *Journal of Biotechnology*, 60, 37-46.
 88. Karube, I., Yugeta, Y. and Suzuki, S. (1977). Electric field control of lipase membrane activity. *Biotechnology and Bioengineering*, 19, 1493-1501.
 89. Kumar, R. S. S., Vishwanath, K. S., Singh, S. A., Rao, A. G. A. (2006). Entrapment of α -amylase in alginate beads: Single step protocol for purification and thermal stabilization. *Process Biochemistry*, 41, 2282-2288.
 90. Vaillant, F., Millan, A., Millan, P., Dornier, M., Decloux, M., Reynees, M. (2000). Co-immobilized pectinase and endocellulase on chitin and nylon supports. *Process Biochemistry*, 35, 989-996.
 91. Kapoor, M., Kuhad, R. C. (2007). Immobilization of xylanase from *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in production of xylo-oligosaccharides. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 142, 125-138.
 92. Hsieh, H. J., Liu, P. C., Liao, W. J. (2000). Immobilization of invertase via carbohydrate moiety on chitosan to enhance its thermal stability. *Biotechnology Letters*, 22, 1459-1464.
 93. Katwa, L. C., Ramakrishna, M., Rao, M. R. R. (1981). Spectrophotometric assay of immobilized tannase. *Journal of Biosciences*, 3, 135-142.
 94. Al-Adhami, A. J. H., Bryjak, J., Greb-Markiewicz, B., Peczyńska-Czoch, W. (2002). Immobilization of wood-rotting fungi laccases on modified cellulose and acrylic carriers. *Process Biochemistry*, 37, 1387-1394.
 95. Kumari, A., Kayastha, A. M. (2011). Immobilization of soybean (*Glycine max*) α -amylase onto chitosan and amberlite MB-150 beads: optimization and characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69, 8-14.

96. Xing, G. W., Li, X. W., Tian, G. L., Ye, Y. H. (2000). Enzymatic peptide synthesis in organic solvent with different zeolites as immobilization matrices. *Tetrahedron*, 56, 3517-3522.
97. Huang, L., Cheng, Z. M. (2008). Immobilization of lipase on chemically modified bimodal ceramic foams for olive oil hydrolysis. *Chemical Engineering Journal*, 144, 103-109.
98. Soleimani, M., Khani, A., Najafzadeh, K. (2011). α -Amylase immobilization on the silica nanoparticles for cleaning performance towards starch soils in laundry detergents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74, 1-5.
99. Daoud, F. B. O., Kaddour, S., Sadoun T. (2010). Adsorption of cellulase *Aspergillus niger* on a commercial activated carbon: kinetics and equilibrium studies. *Colloid Surface B Biointerfaces*, 75, 93-99.
100. Kumar, A. G., Perinbam, K., Kamatchi, P., Nagesh, N., Sekaran, G. (2010). In situ immobilization of acid protease on mesoporous activated carbon packed column for the production of protein hydrolysates. *Bioresource Technology*, 101, 1377-1379.
101. Ramani, K., Karthikeyan S., Boopathy R., Kennedy L. J., Mandal, A. B., Sekaran, G. (2012). Surface functionalized mesoporous activated carbon for the immobilization of acidic lipase and their application to hydrolysis of waste cooked oil: isotherm and kinetic studies. *Process Biochemistry*, 47, 435-445.
102. Hanft, F., Koehler, P. (2006). Studies on the effect of glucose oxidase in bread making. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1699-1704.
103. Wong, C. M., Wong, K. H., and Dong, X. (2008). Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 927-938.
104. Wilson, R., Turner, A. P. F. (1992). Glucose oxidase: an ideal enzyme, Review article. *Biosensors and Bioelectronics*, 7, 165-185.
105. Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S., Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase-An overview. *Biotechnology Advances*, 27, 489-501.
106. 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*, 55, 969-977.
107. Wang, X., Zhang, Y., Banks, C. E., Chen, Q. and Ji, X. (2010). Non-enzymatic amperometric glucose biosensor based on nickel hexacyanoferrate nanoparticle film modified electrodes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 78, 363-366.
108. Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., Vallette, F-M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology*, 41(1), 31-91.
109. Nordberg, A. (2006). Mechanisms behind the neuroprotective actions of cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 20, 12-18.

110. Sussman, J.L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., Silman, I. (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**, 253, 872-879.
111. Bajda, M., Wiğckowska, A., Hebda, M., Guzior, N., Sottriffer, C. A., Malawska, B. (2013). Structure-based search for new inhibitors of cholinesterases. **International Journal of Molecular Sciences**, 14, 5608-5632.
112. Ballard, C. G., Greig, N. H., Guillozet-Bongaarts, A. L., Enz, A., Darvesh, S. (2005). Cholinesterases: Roles in the brain during health and disease. **Current Alzheimer Research**, 2, 307-318.
113. Pohanka, M. (2011). Cholinesterases, A target of pharmacology and toxicology. **Biomedical Papers**, 155, 219-223.
114. Alp, H., Aytekin, İ., Atakişi, O., Ogün, M. (2011). Ratlarda akut malathion toksisitesinin neden olduğu oksidatif stres üzerine kafeik asit fenetil ester (CAPE) ve elajik asit (EA)'ın etkiler. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 6(2), 117-124.
115. Vural, N. (1996). *Toksikoloji*. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 73, 342-373.
116. Uzun, F. G. (2007). *Malathion'un ratlarda nefrotoksik etkisi ve vitamin c ve e'nin koruyucu rolü*. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
117. Telefoncu A. (1996). An amperometric biosensör for the determination of organophosphorus pesticides. **Turkish Journal of Chemistry**, 20(3), 253-257.
118. Aldridge W. N., Reiner E. (1969). Acetylcholinesterase. Two types of inhibition by an organophosphorus compound: one the formation of phosphorylated enzyme and the other analogous to inhibition by substrate. **Biochemical Journal**, 115(2), 147-162.
119. Fukuto T. R. (1990). Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. **Environ Health Perspect**, 87, 245-254.
120. Barak, D., Ordentlich, A., Kaplan, D., Barak, R., Mizrahi, D. (2000). Evidence for P-N bond scission in phosphoramidate nerve agent adducts of human acetylcholinesterase. **Biochemistry**, 39(5), 1156-1161.
121. Küçükkılınç, T. T. (2014). Potential use of acetylcholinesterase as a bioscavenger in organophosphate poisoning. **Turkish Journal of Biochemistry**, 39 (2), 126-131.
122. Cass, E. G., Davis, G., Francis, G. D., Hill, H. A. O., Aston, W. J., Higgins, I. J., Plotkin, E. V., Scott, L. D. L., Turner, A. P. F. (1984). Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. **Analytical Chemistry**, 56(4), 667-671.
123. Koide, S., Yokoyama, K. (1999). Electrochemical characterization of an enzyme electrode based on a ferrocene-containing redox polymer. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 468, 193-201.

124. Dursun, F., Ozoner, S. K., Demirci, A., Gorur, M., Yilmaz, F., Erhan, E. (2012). Vinylferrocene copolymers based biosensors for phenol derivatives. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87, 95-104.
125. Alonso, B., Armada, P. G., Losada J., Cuadrado, I., González, B., Casado, C. M. (2004). Amperometric enzyme electrodes for aerobic and anaerobic glucose monitoring prepared by glucose oxidase immobilized in mixed ferrocene-cobaltocenium dendrimers. *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 1617-1625.
126. Pesántez, D. E., Castracane, J., Gadre, A. P. (2012). Continuous glucose microsensor with a nanoscale conducting matrix and redox mediator. *Electrochimica Acta*, 65, 196-203.
127. Yılmaz, Ö., Demirkol, D. O., Gülcemal, S., Kılınç, A., Timur, S., Çetinkaya, B. (2012). Chitosan-ferrocene film as a platform for flow injection analysis applications of glucose oxidase and *Gluconobacter oxydans* biosensors. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 100, 62-68.
128. Crepaldi, L. B., Aquino Neto, S., Cardoso, F. P., Ciancaglini, P., De Andrade A.R. (2014). Ferrocene entrapped in polypyrrole film and PAMAM dendrimers as matrix for mediated glucose/O₂biofuel cell. *Electrochimica Acta*, 136, 52-58.
129. Peng, H., Huang, Z., Zheng, Y., Chen, W., Liu, A., Lin, X. (2014). A novel nanocomposite matrix based on graphene oxide and ferrocene-branched organically modified sol-gel/chitosan for biosensor application. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 18, 1941-1949.
130. Deng, H., Teo, A. K. L., Gao, Z. (2014). An interference-free glucose biosensor based on a novel low potentialredox polymer mediator. *Sensors and Actuators B*, 191, 522-528.
131. Barquero-Quirós, M., Domínguez-Renedo, O., Alonso-Lomillo, M. A., Arcos-Martínez, M. J. (2014). Acetylcholinesterase inhibition-based biosensor for Aluminum(III) chronoamperometric determination in aqueous media. *Sensors*, 14, 8203-8216.
132. Liang, M., Fan, K., Pan, Y., Jiang, H., Wang, F., Yang, D., Lu, D., Feng, J., Zhao, J., Yang, L. (2013). Fe₃O₄ magnetic nanoparticle peroxidase mimetic-based colorimetric assay for the rapid detection of organophosphorus pesticide and nerve agent. *Analytical Chemistry*, 85, 308-312.
133. Saa, L., Virel, A., Sanchez-Lopez, J., Pavlov, V. (2010). Analytical applications of enzymatic growth of quantum dots. *Chemistry - A European Journal*, 16, 6187-6192.
134. Yi, Y., Deng, J., Zhang, Y., Li, H., Yao, S.(2013). Label-free Si quantum dots as photoluminescence probes for glucose detection. *Chemical Communications*, 49, 612-614.
135. Snejdarkova, M., Svobodova, L., Evtugyn, G., Budnikov, H., Karyakin, A., Nikolelis, D. P., and Hianik, T. (2004). Acetylcholinesterase sensors based on gold electrodes modified with dendrimer and polyaniline a comparative research. *Analytica Chimica Acta*, 514, 79-88.

136. Qian, S., Lin, H. (2015). Colorimetric sensor array for detection and identification of organophosphorus and carbamate pesticides. *Analytical Chemistry*, 87, 5395-5400.
137. Wang, F., Liu, X., Lu, C.-H., Willner, I. (2013). Cysteine-mediated aggregation of nanoparticles: the development of a H₂O₂ sensor and oxidase-based biosensors. *American Chemical Society Nano*, 7, 7278-7286.
138. Lee, J. H., Han, Y. D., Song, S. Y., Kim, T. D., Yoon, H. C. (2010). Biosensor for organophosphorus pesticides based on the acetylcholine esterase inhibition mediated by choline oxidase bioelectrocatalysis. *BioChip Journal*, 4(3), 223-229.
139. Chaure, S., Paul, D., Vadagma, P., Ray, A. K. (2010). Spectroscopic investigation of sulfonate phthalocyanine to probe enzyme reactions for heavy metals detection. *Journal of Hazardous Materials*, 173, 253-257.
140. Nunes, G. S., Barceló, D., (1998) Electrochemical biosensors for pesticide determination in food samples, *Analisis Magazine*, 26, 156-159.
141. Kalab, T., Skladal, P. (1991). Disposable multichannel immunosensors for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using acetylcholinesterase as an enzyme label. *Electroanalysis*, 9, 293-297.
142. Valer, E., Ramon-Azcon, J., Sanchez, F.-J., Marco, M.-P., Rodriguez, A. (2008). Conductimetric immunosensor for atrazine detection based on antibodies labelled with gold nanoparticles. *Sensors and Actuators B*, 134, 95-103.
143. Nie, Z., Nijhuis, C. A., Gong, J., Chen, X., Kumachev, A., Martinez A. W., Narovlyanskya, Whitesides, M., G. M. (2010). Electrochemical sensing in paper-based microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 10, 477-483.
144. Geary, W.S. (1970). The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. *Coordination Chemistry Reviews*, 7, 81-122.
145. Trinder, P. (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry*, 6, 24-27.
146. Johnson, K. A., Goody, R. S. (2011). The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *Biochemistry*, 50, 8264-8269.
147. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. JR. and Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
148. Popenoe, D. D., Deinhammer, R. S., Porter, M. D. (1992). Infrared spectroelectrochemical characterization of ferrocene-terminated alkanethiolate monolayers at gold. *Langmuir*, 8, 2521-2530.
149. Erdik, E., Obalı, M., Yüksekışık, N., Öktemer, A., Pekel, T., İhsanoğlu, E. (2001). *Denel Organik Kimya* (Dördüncü Baskı). Ankara: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Döner Sermaye İşletmesi Yayınları, 732-738.

150. Mathiyalagan, K., Gopal, S., Ramasamy, E., Vennila T. (2012). In-vitro antimicrobial screening of ferrocene derived compounds. *International Journal of ChemTech Research*, 4, 1775-1781.
151. Uysal, Ş., Koç Z. E. (2010). Synthesis and characterization of dendrimeric melamine cored [salen/salophFe(III)] and [salen/salophCr(III)] capped complexes and their magnetic behaviors. *Journal of Hazardous Materials*, 175, 532-539.
152. Uysal, Ş., Uçan, İ. (2009). The synthesis and characterization of melamine based Schiff bases and its trinuclear [salen/salophenFe(III)] and [salen/salophenCr(III)] capped complexes. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 65, 299-304.
153. Trivedi, R., Deepthi, S. B., Giribabu, L., Sridhar, B., Sujitha, P., Kumar, C. G., Ramakrishna, K. V. S. (2012). Synthesis, crystal structure, electronic spectroscopy, electrochemistry and biological studies of carbohydrate containing ferrocene amides. *Applied Organometallic Chemistry*, 26, 369-376.
154. Pattanayak, P., Parua, S. P., Patra, D., Pratihari, J. L., Brandão, P., Felix, V., Chattopadhyay, S. (2014). Synthesis, characterizations and structure of orthometallated Pt(II) and Pt(IV) complexes: Oxidative addition to C,N,N,O coordinated Pt(II) complexes. *Polyhedron*, 70, 1-5.
155. Al-Saif. F. A., Refat, M. S. (2012). Ten metal complexes of vitamin B3/niacin: Spectroscopic, thermal, antibacterial, antifungal, cytotoxicity and antitumor studies of Mn(II), Fe(III), 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.
156. Halim, M. A., Nessa, S. A., Rahman, A. K. L., Chowdhury, D. A. and Salam, M. A. (2005). Studies on Diazocoupling Products of Dioxomolybdenum (VI) Chelates of β -diketones. *Journal of Applied Sciences*, 5, 1027-1031.
157. Gaballa, A. S., Asker, M. S., Barakat, A. S., Teleb, S. M. (2007). Synthesis, characterization and biological activity of some platinum(II) complexes with Schiff bases derived from salicylaldehyde, 2-furaldehyde and phenylenediamine *Spectrochimica Acta Part A*, 67, 114-121.
158. Li, L.-J., Fu, B., Qiao, Y., Wang, C., Huang, Y.-Y., Liu, C.-C., Tian, C., Du, J.-L. (2014). Synthesis, characterization and cytotoxicity studies of platinum(II) complexes with reduced amino acid ester Schiff-bases as ligands, *Inorganica Chimica Acta*, 419, 135-140.
159. Andrews, M. A., Chang, T. C. T., Cheng, C. W. F., Emge, T. J., Kelly, K. P., Koetzle, T. F. (1984). Synthesis, characterization, and equilibria of palladium(II) nitrile, alkene, and heterometallacyclopentane complexes involved in metal nitro catalyzed alkene oxidation reactions. *Journal of the American Chemical Society*, 106, 5913-5920.
160. Leskovac, V., Trivić, S., Wohlfahrt, G., Kandrak, J., Pericin, D. (2005). Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(4), 731-750.

161. Özkan, H. E., Yetim, K. N., Nartop, D., Sarı, N. (2015). Influence of load on the recycling stability of nanospheres attached platinum ion for determination of glucose. ***Journal of Industrial and Engineering Chemistry***, 25, 180-185.

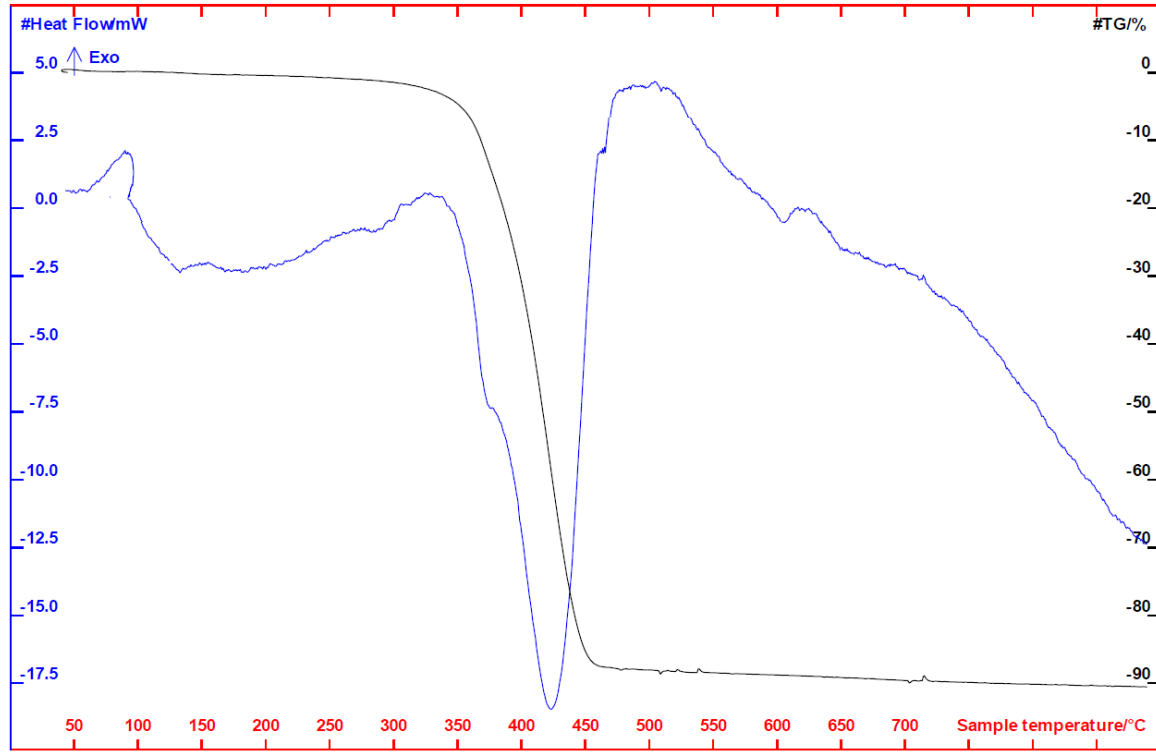




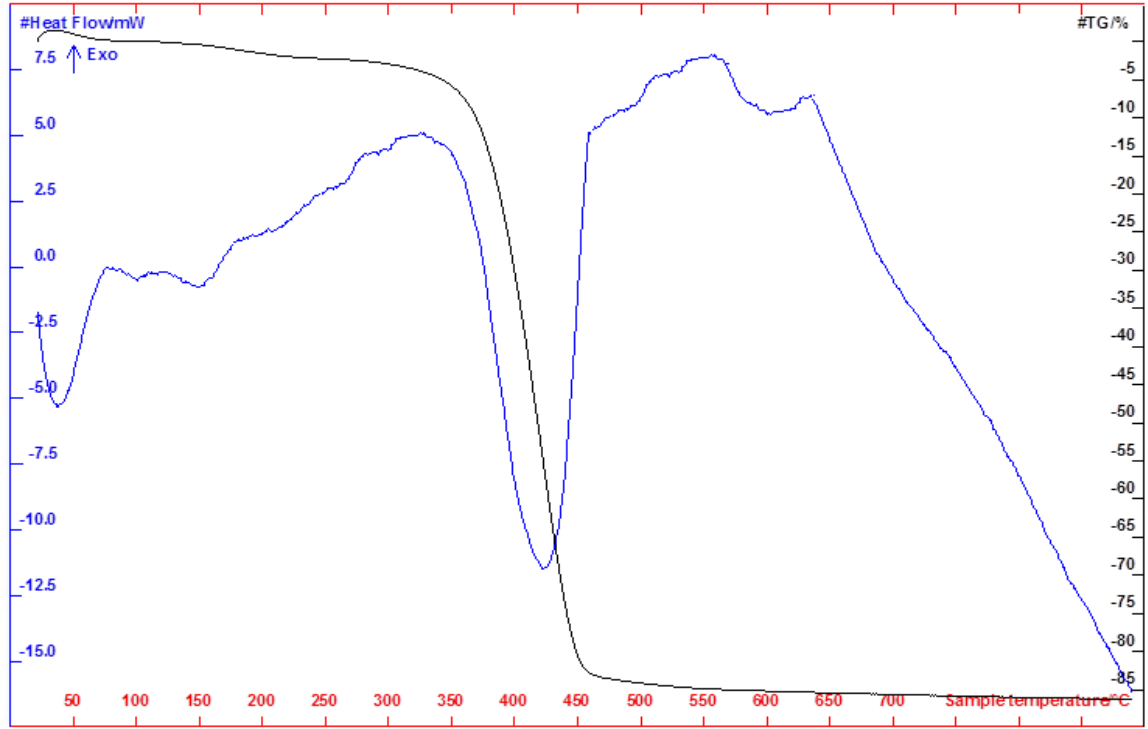
EKLER

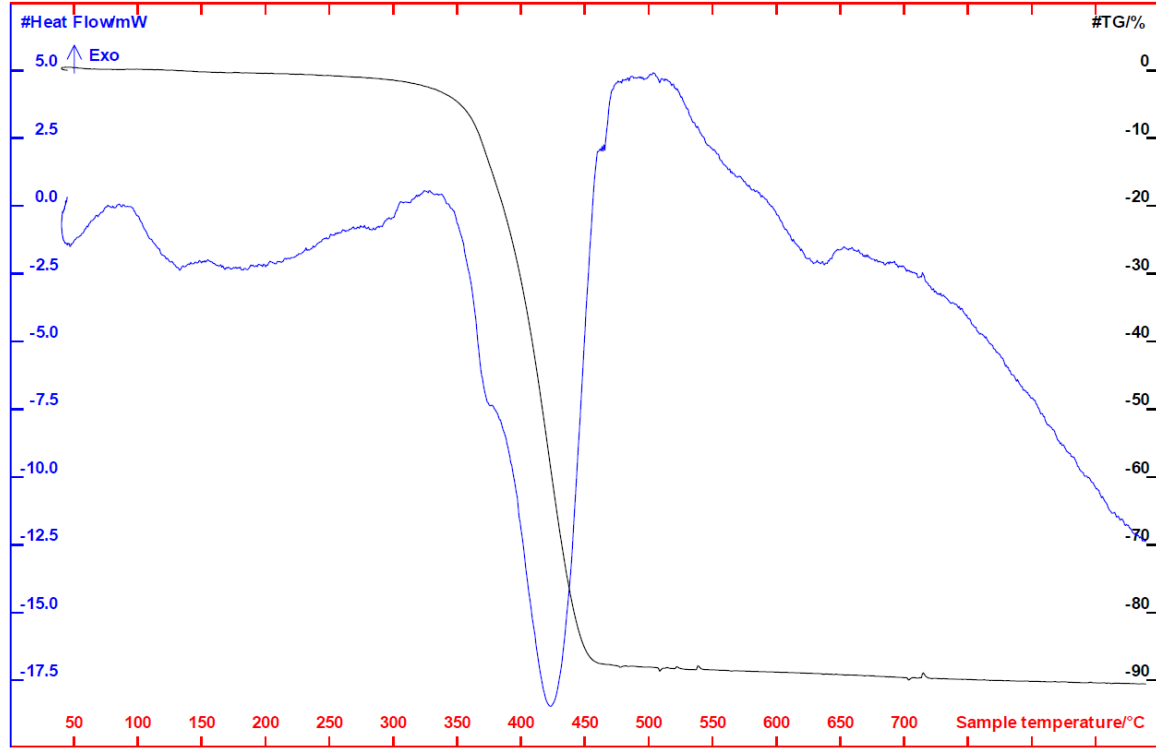


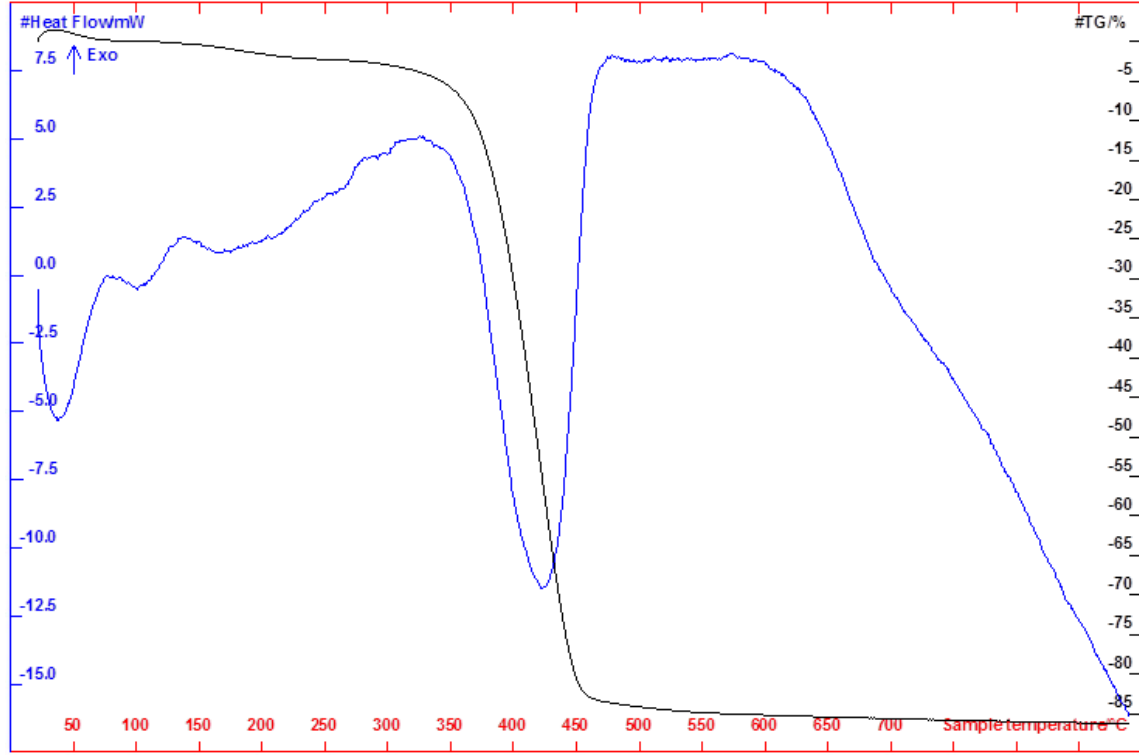
EK-1. 2G-H-Pt(II) dendrimerinin TGA eğrisi

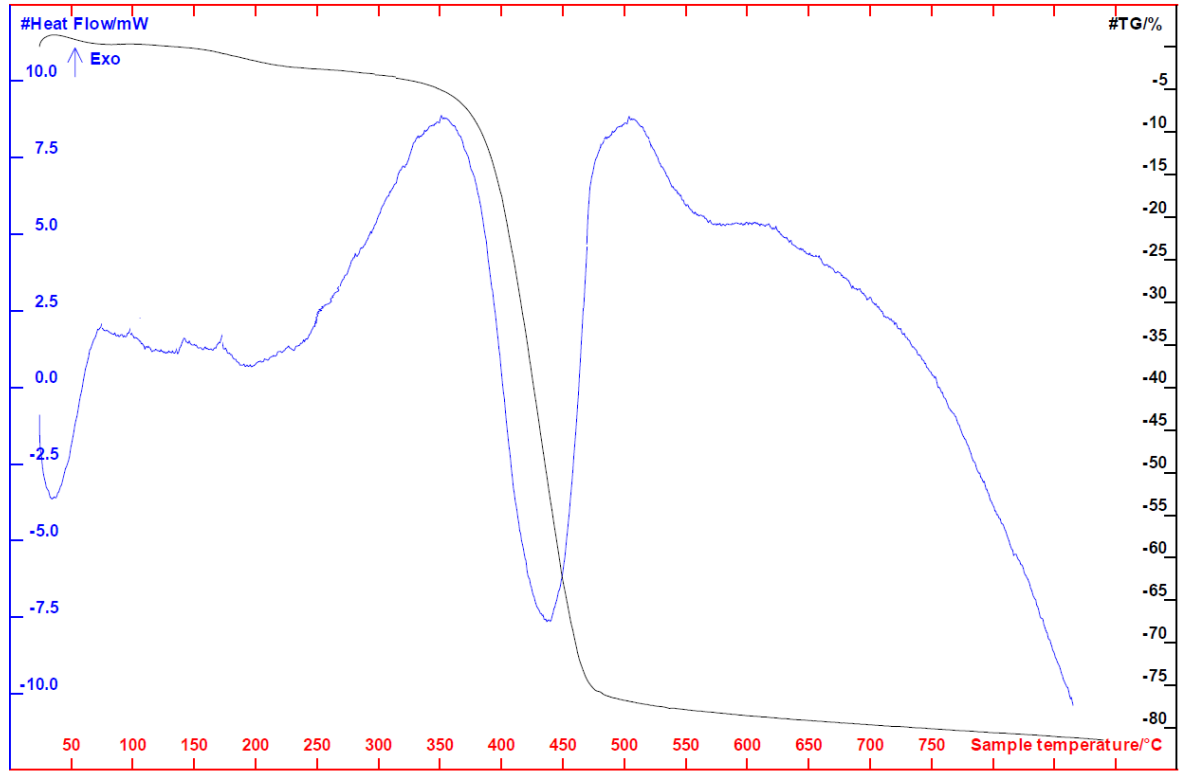


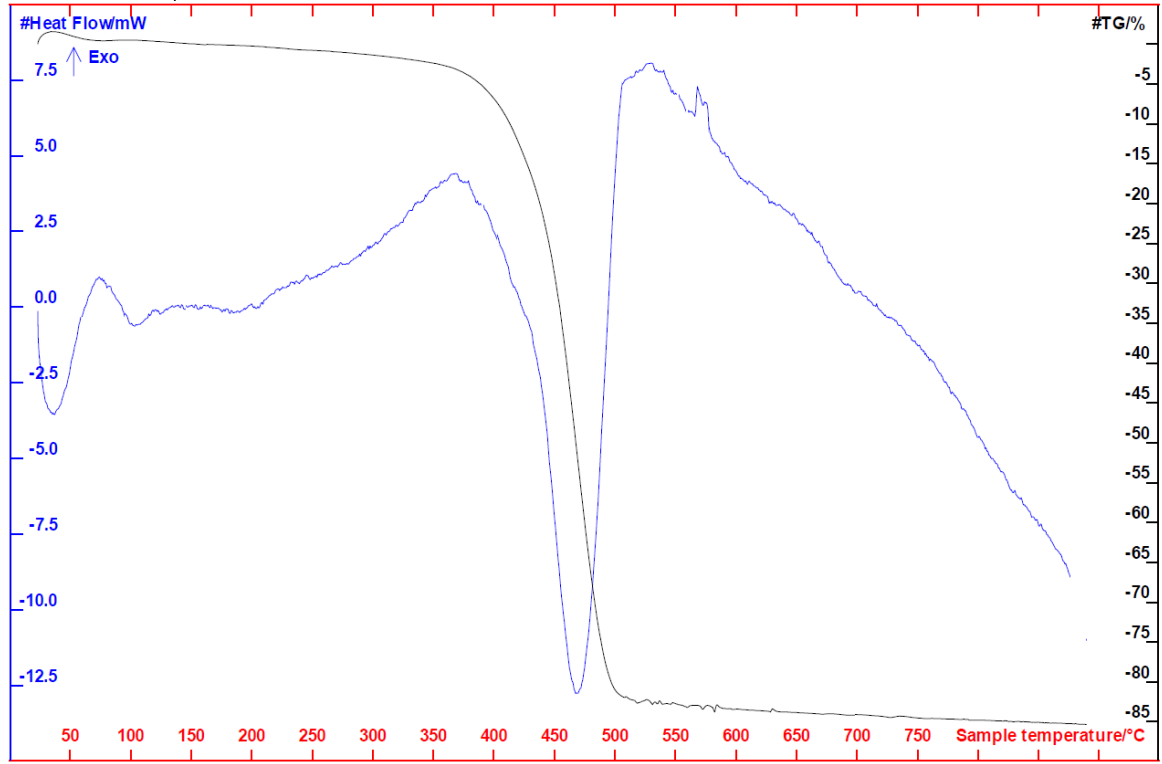
EK-2. 2G-H-Pt(IV) dendrimerinin TGA eğrisi



EK-3. 2G-NO₂-Pt(II) dendrimerinin TGA eğrisi

EK-4. 2G-NO₂-Pt(IV) dendrimerinin TGA eğrisi

EK-5. 2G-CH₃-Pt(II) dendrimerinin TGA eğrisi

EK-6. 2G-CH₃-Pt(IV) dendrimerinin TGA eğrisi

Article

Polystyrene Attached Pt(IV)–Azomethine, Synthesis and Immobilization of Glucose Oxidase Enzyme

Nurşen Sarı ^{1,*}, Esin Antepli ¹, Dilek Nartop ² and Nurdan Kurnaz Yetim ^{1,3}

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Gazi University, Ankara 06500, Turkey; E-Mails: esinantpl@hotmail.com (E.A.); nurdankurnaz@gazi.edu.tr (N.K.Y.)

² Department of Chemistry, Faculty of Arts and Science, Nevşehir University, Nevşehir 50300, Turkey; E-Mail: dileknartop@nevsehir.edu.tr

³ Department of Chemistry, Faculty of Science, Kırklareli University, Kırklareli 39999, Turkey

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: nursens@gazi.edu.tr; Tel./Fax: +90-031-2202-1157.

Received: 16 July 2012; in revised form: 27 August 2012 / Accepted: 3 September 2012 /

Published: 19 September 2012

Abstract: Modified polystyrene with Pt(IV)–azomethine (APS–Sch–Pt) was synthesized by means of condensation and demonstrated to be a promising enzyme support by studying the enzymatic properties of glucose oxidase enzyme (GOx) immobilized on it. The characteristics of the immobilized glucose oxidase (APS–Sch–Pt–GOx) enzyme showed two optimum pH values that were pH = 4.0 and pH = 7. The insertion of stable Pt(IV)–azomethine spacers between the polystyrene backbone and the immobilized GOx, (APS–Sch–Pt–GOx), increases the enzymes' activity and improves their affinity towards the substrate even at pH = 4. The influence of temperature, reusability and storage capacity on the free and immobilized glucose oxidase enzyme was investigated. The storage stability of the immobilized glucose oxidase was shown to be eleven months in dry conditions at +4 °C.

Keywords: Pt(IV)–azomethine; Polystyrene; glucose oxidase enzyme; two optimum pH

1. Introduction

Enzymes are used as biocatalysts in the chemical, pharmaceutical and food industries and as specific ligands in clinical and chemical analyses [1]. Glucose oxidase (GOx) is a commercially

Spectroscopic characterization of novel D-amino acid-Schiff bases and their Cr(III) and Ni(II) complexes as antimicrobial agents

Nurgen Sarı · Nihat Pişkin · Hatice Öğütcü ·
Nurdan KurnazReceived: 9 January 2012 / Accepted: 21 March 2012 / Published online: 15 April 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract The aim of this work was to investigate the antibacterial and antifungal activities of novel D-amino acid-Schiff bases including fluorine atom and their Cr(III) and Ni(II) complexes. All these substances have been examined for antibacterial activity against pathogenic strains *Listeria monocytogenes* 4b ATCC19115, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC12228, *Salmonella typhi* H NCTC 901.8394, *Brucella abortus* (A.99, UK-1995) RSKK03026, *Staphylococcus epidermidis* sp., *Micrococcus luteus* ATCC9341, and *Shigella dysenteriae* typ 10 NCTC 9351, and antifungal activity against *Candida albicans* Y-1200-NIH, Tokyo. The antimicrobial test results of these amino acid-Schiff base complexes exhibited better activity than some known antibiotics. In particular, diamagnetic Ni(II) complexes were more potent bactericides than all of the substances synthesized.

Keywords Schiff bases · Antimicrobial activity · Fluorine atom · Ni(II) complex · Cr(III) complex · Diamagnetic

Introduction

Schiff bases appear to be important intermediates in a number of enzymatic reactions involving enzyme interaction with an amino or a carbonyl group of a substrate. In bioinorganic chemistry, the interest in the Schiff base complexes derives from their ability to provide synthetic models for metal-containing sites in metalloproteins and to contribute to developments in medicinal chemistry. Thus, Schiff bases and their complexes have a variety of applications in biological, clinical, and analytical fields (Egloff *et al.*, 2009; Ellis *et al.*, 1997). Recently, there has been considerable interest in the chemistry of amino acid-Schiff base compounds due to their potential in nuclear medicine applications (Abram and Alberto, 2006; Gharagozloo and Boghaei, 2008).

However, the drug resistances against antibacterial agents may pose a problem in their use with medical purpose (Singh *et al.*, 2006). 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. Amino acid-Schiff bases have N and O atoms as their basic elements. Schiff base derivatives containing donor atom can act as good chelating agents for the transition of metal ions (Avaji *et al.*, 2008; Takeuchi *et al.*, 1999; Sari *et al.*, 2008). Amino acid-Schiff base metal complexes have found wide applications in corrosion inhibitors (Negm and Zaki, 2009), tumor radio-imaging agents (Wang *et al.*, 2005), and pharmacologically active compounds (Wang *et al.*, 2007). However, no studies have been carried out on Schiff bases and their metal complexes derived from amino acid-Schiff bases including fluorine. This study aimed to fill in this gap. Novel amino acid-Schiff bases derivatives were investigated to find out the antibacterial properties of Schiff bases and

N. Sarı (✉) · N. Pişkin · N. Kurnaz
Department of Chemistry, Faculty of Science,
Gazi University, 06500 Teşvikiyekülli, Ankara, Turkey
e-mail: nurgen.sari@gazi.edu.tr

H. Öğütcü
Department of Biology, Faculty of Arts and Science,
Abdül Evren University, Kırşehir, Turkey

N. Kurnaz
Department of Chemistry, Faculty of Science,
Kırıkkale University, Kırıkkale, Turkey



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Biosensors and Bioelectronics

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/bios



Preparation of carbon paste electrodes including poly(styrene) attached glycine-Pt(IV) for amperometric detection of glucose

Soner Dönmez^a, Fatma Arslan^{b,*}, Nurşen Sarı^b, Nurdan Kurnaz Yetim^{b,c}, Halit Arslan^b

^aDepartment of Chemistry, Faculty of Sciences and Art, Nevşehir University, 50300 Nevşehir, Turkey

^bDepartment of Chemistry, Faculty of Sciences, Gazı University, 06500 Beşiközü, Ankara, Turkey

^cDepartment of Chemistry, Faculty of Sciences and Art, Kırıkkale University, Kırıkkale, Turkey



ARTICLE INFO

Article history:
Received 5 August 2013
Received in revised form 28 October 2013
Accepted 29 October 2013
Available online 8 November 2013

Keywords:
Biosensor
Carbon paste
Glucose oxidase
Nanoparticle
Pt(IV) complexes

ABSTRACT

In this study, a novel carbon paste electrode that is sensitive to glucose was prepared using the nanoparticles modified (4-Formyl-3-methoxyphenoxymethyl) with polystyrene (PMPS) with L-Glycine-Pt(IV) complexes. Polymeric nanoparticles having Pt(IV) ion were prepared from (4-Formyl-3-methoxyphenoxymethyl) polystyrene, glycine and PtCl₄ by template method. Glucose oxidase enzyme was immobilized to a modified carbon paste electrode (MCPE) by cross-linking with glutaraldehyde. Determination of glucose was carried out by oxidation of enzymatically produced H₂O₂ at 0.5 V vs. Ag/AgCl. Effects of pH and temperature were investigated, and optimum parameters were found to be 8.0 and 55 °C, respectively. Linear working range of the electrode was 5.0 × 10⁻⁶–1.0 × 10⁻³ M, R² = 0.997. Storage stability and operational stability of the enzyme electrode were also studied. Glucose biosensor gave perfect reproducible results after 10 measurements with 2.3% relative standard deviation. Also, it had good storage stability (gave 53.57% of the initial amperometric response at the end of 33th day).

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Determination of glucose is important in many areas, from clinical studies to industrial productions. Rapid determination of blood sugar for treatment and control of diabetes is significant. Thus, numerous efforts have devoted to develop glucose biosensors with fast and accurate response (Kulys et al., 1995; Çolak et al., 2012).

Composite carbon paste electrodes have been extensively used for electroanalytical applications since their introduction by Adams (1958) due to their intrinsic advantages including low background current, renewable or disposable electrochemical interface and low cost of fabrication (Boujita et al., 1999).

For determination of glucose, electrochemical glucose biosensors using carbon paste electrodes have been prepared (Comba et al., 2010; Jianping et al., 2009; Xiaoli et al., 2005; Arslan et al., 2012). Most of the electrochemical glucose biosensors are based on glucose oxidase (GOx) enzyme, which catalyzes the oxidation of glucose to gluconolactone which is hydrolyzed to gluconic acid and hydrogen peroxide. Quantification of glucose can be achieved via electrochemical detection of the enzymatically released

H₂O₂ (Arslan et al., 2011; Yoo and Lee, 2010; Norouzi et al., 2010).

Glucose + O₂ → H₂O₂ + gluconic acid

H₂O₂ → O₂ + 2H⁺ + 2e⁻

Glucose oxidase enzyme is immobilized on a material to prepare glucose biosensor. To date, different methods have been used for enzyme immobilization (Janeček 1993; Moyo et al., 2012). In view of these, nanocomposite and nanoparticle structures have attracted great attention in preparing advanced materials. Among them, Chengyan Wang and co-workers reported gold nanocomposite films for a glucose biosensor which had high activity (Wang et al., 2011). Noble metal nanoparticles have been extensively utilized due to their extraordinary catalytic activities in both oxidation and reduction reactions. Among them, Pt nanoparticles were one of the mostly used for immobilization of enzymes for the construction of biosensors due to their unique properties such as electrocatalytic ability (Yen et al., 2011). Li et al. (2010, 2011) decorated the magnetic composite of ferric oxide with Pt nanoparticles to construct an amperometric glucose biosensor. Because of excellent performance of Pt in the detection of hydrogen peroxide, platinum electrode and platinum nanostructure modified electrodes have been widely used to immobilize enzyme for the fabrication of biosensors (Li et al., 2011). Among recent advances in nanomaterials for biosensing applications, polymeric nanoplateform materials have gained significant interest for the potential

* Corresponding author. Tel.: +90 312 201518; fax: +90 312 212 2279.
E-mail address: fatma@gazi.edu.tr (F. Arslan).

0956-5663/\$ - see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2013.10.099>



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,*}

^aDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Gazî University, Teknikokullar, Ankara 06500, Türkiye

^bDepartment of Chemistry, Faculty of Sciences and Art, Kırklareli University, Kırklareli, Türkiye

^cDepartment of Chemistry, Faculty of Arts and Science, Nevşehir University, 2000 Eski Mh. Zühre 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 perfect 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: +90 312 212 22 79.
E-mail address: nurshen@gazi.edu.tr (N. Sarı).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2014.10.031

1236-086X/© 2014 The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

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

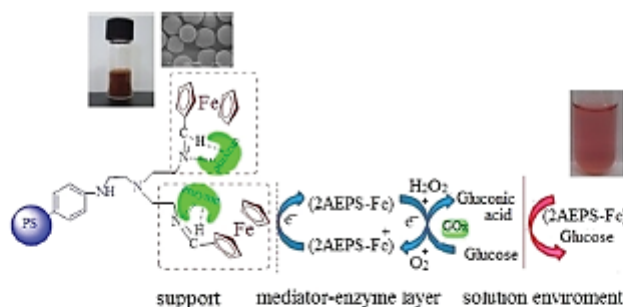
NURDAN KURNAZ YETİM^{1,2}, ELVAN HASANOĞLU ÖZKAN¹, BÜŞRA DANIŞ¹, HAYRETTİN TÜMTÜRK¹, and NURŞEN SARI¹

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

²Kırklareli University, Faculty of Arts and Sciences, 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 (GOD) 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: nursem@gazi.edu.tr

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

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]



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 authors²⁻⁴ 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 bond 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-Benzylxybenzaldehyde (polymer-bound), tryptophan, acetylcholinesterase (Type C3389, from electric eel, 518 units per mg, 10 KU), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), acetylthiocholine iodide and 1-naphthyl-N-methylcarbamate were purchased

^aDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Gazi University, 06500 Teknikokulları, Ankara, Turkey. E-mail: narsen@gazi.edu.tr; Fax: 030-312-312 22 779; Tel: 030-312-312 11 57

^bKırıkkale University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Chemistry, Kırıkkale, Turkey

EK-13. V. Biyoteknoloji kongresi kitapçık kapak sayfası görüntüsü

178th OMICS Group Conference

June 2014 Volume 3, Issue 5

ISSN: 2155-952X

Journal of Biotechnology & Biomaterials

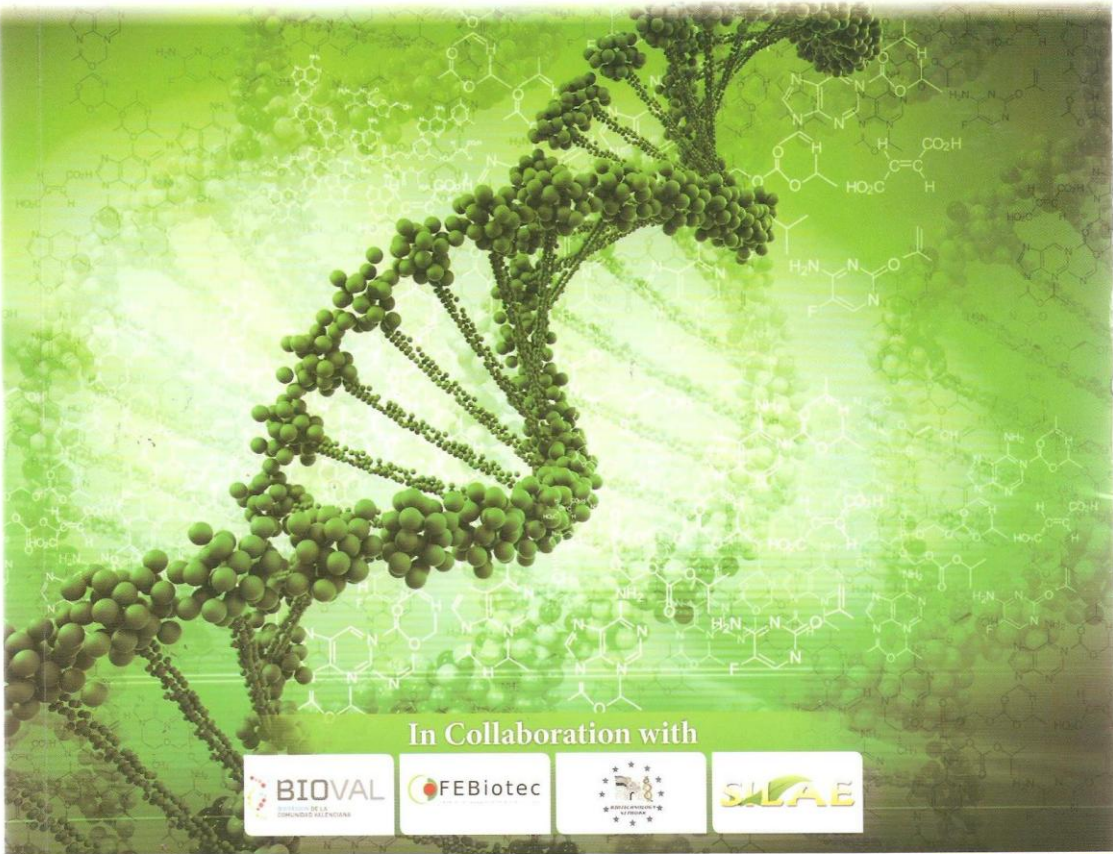
Open Access

Proceedings of 5th World Congress on

OMICS Group
Conferences
Accelerating Scientific Discovery

Biotechnology

June 25-27, 2014 Valencia Conference Centre, Valencia, Spain



In Collaboration with

BIOVAL
CONSEJO REGULADOR DE VALLE DE LA LINDOSA

FEBiotec

PARADIGMA DE INNOVACIÓN

SILAE

"Organize your Events at OMICS Group Conferences"

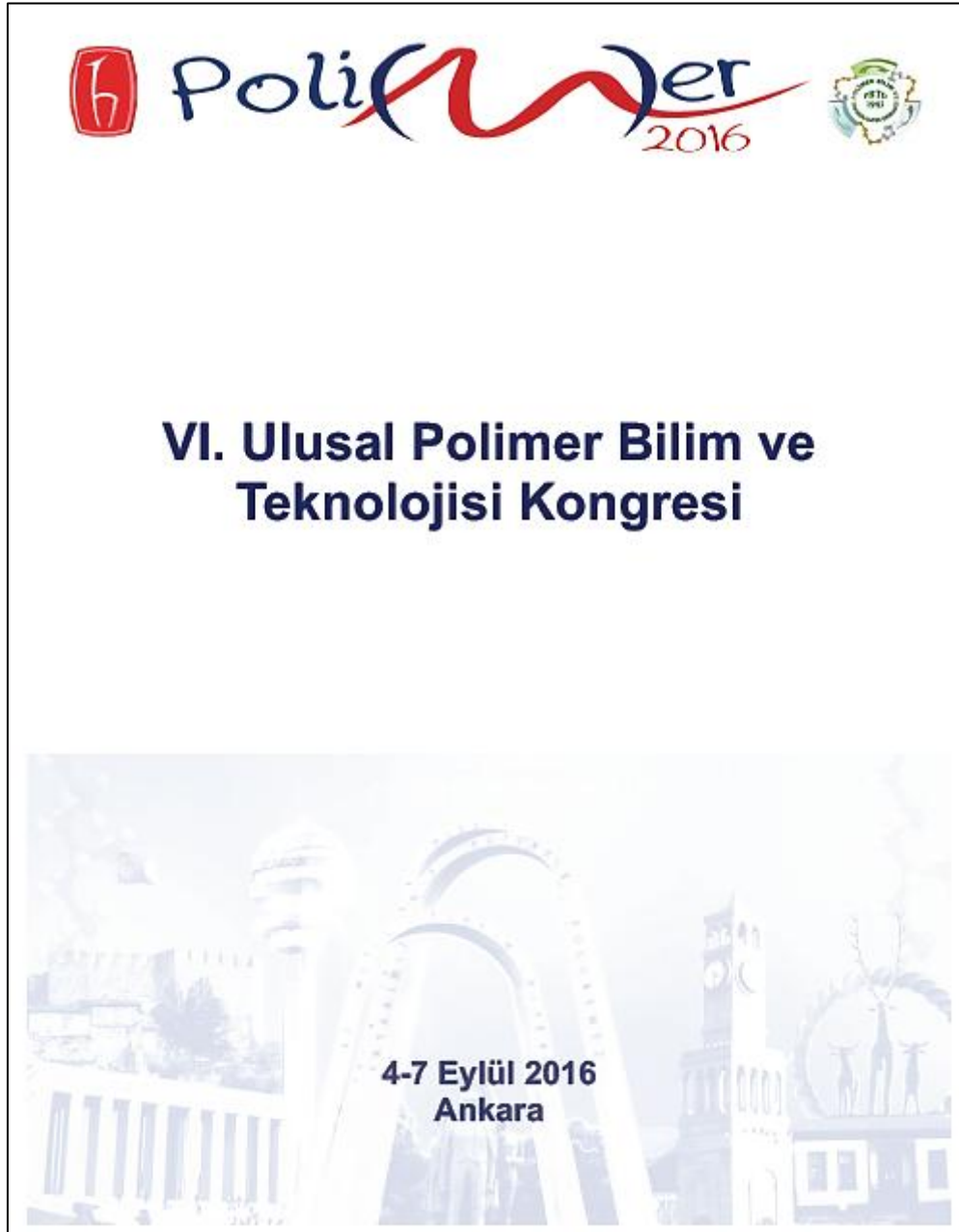
Proposals are invited for organizing Symposia/Workshops at OMICS Group Conferences or OMICS Group will sponsor small events at your universities in related areas under the title of your own. These proposals can be sent to respective conference mail ids or to symposia@omiconline.org

OMICS Group Conferences
5716 Corsa Ave., Suite 110, Westlake
Los Angeles, CA 91362-7354, USA
Phone: +1-650-268-9744
Fax: +1-650-618-1414
Toll free: +1-800-216-6499
Email: biotechnology2014@omicsgroup.us

EK-14. V. biyoteknoloji kongresi sözel sunum özeti

 OMICS Group Conferences Accelerating Scientific Discovery Nurden Kurnaz Yetim et al., J Biotechnol Biomater 2014, 3:5 http://dx.doi.org/10.4172/2155-952X.01.027 5th World Congress on Biotechnology June 25-27, 2014 Valencia Conference Centre, Valencia, Spain	New nanospheres attached Pt(II)-Schiff bases for investigation of glucose oxidase enzyme as biocatalysts Nurden Kurnaz Yetim^{1*}, Elvan Hocaoglu Özkan², Dilak Nurtop and Nurgen San ¹Gazi University, Türkiye ²Kırıkkale University, Türkiye ³Sakarya University, Türkiye New nanospheres support based was prepared and characterized for immobilization of glucose oxidase from <i>Aspergillus niger</i>. Nanoparticles (APS-SalPt(II)) modified (aminomethyl) polystyrene (APS) with 5-methyl salicylaldehyde were synthesized by means of template method and investigated the enzymatic properties of glucose oxidase enzyme (GOx) immobilized on it. Modified poly(styrene) was characterized IR spectra, Gel permeation chromatography and Scanning electron microscopy. Immobilized GOx on to (APS-SalPt(II)) showed one optimum pH and temperature. Kinetic parameters were studied for free GOx and immobilized glucose oxidase optimum at pH= 8.0 and two optimum temperature (30 and 70 °C). V_{max}/K_m values were calculated from Lineweaver-Burk plots for immobilized GOx to the (APS-SalPt(II)) supports, 3.7, 24.9 and 2.6, 14.5 mMmin⁻¹/mM respectively for 30 and 70°C. Biography Nurden Kurnaz Yetim graduated with maximum score in Chemistry Department in 2007 at Mide University. She holds a Master degree in Inorganic Chemistry the Mide University in Mide, Türkiye (2008). She has published 3 papers in reputed journals. Currently, she is working as a Research Assistant at Gazi University and she is a PhD candidate at the Gazi University under the direction of Assoc. Prof. Dr. Nurgen San. nurdenkurnaz@gazi.edu.tr
J Biotechnol Biomater 2014 ISSN: 2155-952X, IJBM an open access journal Biotechnology-2014 June 25-27, 2014 Volume 3, Issue 5 Page 03	

EK-15. VI. Ulusal polimer bilim ve teknolojisi kongresi kitapçık kapak sayfası görüntüsü



EK-16. VI. Ulusal polimer bilim ve teknolojisi kongresi sözel sunum özeti



S-37

AChE Enzimi Tutturulmuş Destek Polimerin (FMPS) Elma Kurduna Karşı Kullanılan Pestisitlerin Tayininde Kullanılması

Nurcan KURNAZ YETİM^{1,2}, Elvan HASANOĞLU ÖZKAN¹, Nurşen SARI¹

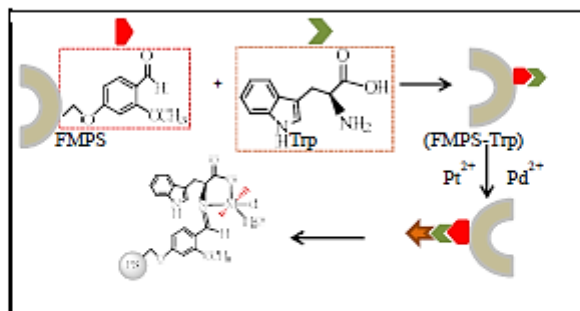
¹Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, 06500 Teknikokullar, Ankara

²Kırklareli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Kırklareli
nurdankurnaz@gazi.edu.tr

Son yıllarda tarım sektöründe ürün verimin artırılmasına yönelik çalışmalar hızla yaygınlaşmakta ve daha küçük tarım alanlarında uygun türlerinin seçimini kapsayan uygulamalar giderek önem kazanmaktadır. Bu durum, pestisitlerin hedefe yönelik kullanımını artırmıştır. Tarımda yaygın olarak organofosfatlı pestisitler kullanılmaktadır. Tüm organofosfatlar oksijen, karbon, sülfür ve azot bileşiklerini farklı kombinasyonlarda içeren, fosfat esterleridir. Ancak pestisitlerin diğer tüm kimyasallar gibi insan ve çevre sağlığını tehdit ettikleri bilinen bir gerçektir [1]. Bu nedenle pestisit tayini büyük önem taşımaktadır. Asetilkolinesteraz enzimi pestisit tayininde kullanılmaktadır. Kolin esterazların, organofosfat(PX) ve karbamat inhibitörleri ile reaksiyonları substratların verdiği reaksiyon ile oldukça benzerdir. Ancak fosforülmüş enzim(EP) oldukça kararlı olup tersinir olmayan bir inhibisyon oluşmaktadır.



Bu çalışmada, nanoküreler üzerine Pt(II) ve Pd(II) kompleksleri hazırlanarak AChE enzimi immobilize edilmiş ve hazırlanan destekler organofosfatlı pestisit varlığının tayininde kullanılmıştır. Tayinde, kolinesterazın organofosfatlı pestisitler ile verdiği tersinir olmayan inhibisyon reaksiyonundan yararlanarak UV spektrofotometrisindeki absorpsiyon azalmaları dikkate alınmıştır.



Kaynaklar

[1] Sternberg, S. S. The carcinogenesis, Mutagenesis and teratogenesis of insecticides: Review of studies in animals and man, *Pharmac. Ther.*, 6, 147-166, 1979.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : KURNAZ YETİM, Nurdan
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 25.06.1985, Düzce
 Medeni hali : Evli
 e-mail : nurdankurnaz81@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi /Fen Bilimleri Enstitüsü	Devam Ediyor
Yüksek lisans	Niğde Üniversitesi /Fen Bilimleri Enstitüsü	2009
Lisans	Niğde Üniversitesi /Fen Edebiyat Fakültesi	2007
Lise	Düzce Lisesi (Y.D.A.)	2002

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2010-Halen	Kırklareli Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Akademik Faaliyetler

Tez Kapsamı Dışında Yayımlanan Makaleler

1. Yetim, N. K., Özkan, E. H., Danış B., Tümtürk H., Sarı N. (2015). 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.
2. Özkan, E. H., Yetim, N. K., 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.
3. Dönmez, S., Arslan, F., Sarı, N., Yetim, N. K., Arslan, H. (2014). Preparation of carbon paste electrodes including poly(styrene) attached glycine-Pt(IV) for amperometric detection of glucose, *Biosensors and Bioelectronics*, 54, 146-150.

4. Özkan, E. H., Yetim, N. K., Nartop, D., Sarı, N. (2015). Influence of load on the recycling stability of nanospheres attached platinum ion for determination of glucose, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 25, 180-185.
5. Sarı, N., Pişkin, N., Ögütçü, H., Kurnaz, N. (2013). Spectroscopic characterization of novel D-amino acid-Schiff bases and their Cr(III) and Ni(II) complexes as antimicrobial agents. *Medicinal Chemistry Research*, 22, 580-587.
6. Sarı, N., Antepli, E., Nartop, D., Yetim, N. K. (2012). Polystyrene Attached Pt(IV)–Azomethine, Synthesis and Immobilization of Glucose Oxidase Enzyme, *International Journal of Molecular Sciences- IJMS*, 13, 11870-11880.
7. Sarı, N., Bağcıoğlu, Z. N., Yetim, N. K., Özkan, E. H., Nartop, D. (2013). New Supports for Use of Glucose Oxidase Enzyme as Biocatalysis. *W. A. Science, Engineering and Technology*, 78, 949-953.

Tez Kapsamında Katılınan Ulusal ve Uluslararası Kongreler

1. N. Kurnaz Yetim, N. Sarı, 2016. Dendrimers: Synthesis, Immobilization and Applications of Pesticide, *46th IUPAC World Polymer Congress (MACRO 2016)*, İSTANBUL
2. N. Kurnaz Yetim, N. Sarı, 2015. Investigation of The Kinetic Parameters of The GOx Enzyme Immobilized Dendrimer Molecules, *International Conference on Chemical and Biochemical Engineering*, FRANSA
3. Nurdan Kurnaz Yetim, Nurşen Sarı, 2014. Dendritic Molecules with Two-Generation Including Ferrocene by Condensation Method; Investigation of Glucose Oxidase Enzyme as Biocatalysts, *BIT's International Symposium of Enzyme & Biocatalysis* ÇİN HALK CUMHURİYETİ
4. Nurdan Kurnaz Yetim, Elvan Hasanoğlu Özkan, Büşra Danış, Hayrettin Tümtürk, Nurşen Sarı, 2015. Çift Ferrosen İçeren Nano Boyuttaki Küreler Üzerine Enzim Çalışması, 5. *Ulusal Anorganik Kongresi*, MERSİN

Tez Kapsamı Dışında Katılınan Ulusal ve Uluslararası Kongreler

1. 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*, ANKARA
2. Elvan Hasanoğlu Özkan, Nurdan Kurnaz Yetim, Nurşen Sarı, Ali Dışli, 2016. The

Effect of para and meta Positions in Immobilized New Supports for Determination Phosphate, *3rd International Congress on Biosensors*, ANKARA

3. 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*, İSTANBUL
4. 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*, İSTANBUL
5. Nurdan Kurnaz Yetim, Nurşen Sarı, 2016. Dendrimers: Synthesis, Immobilization and Applications of Pesticide, *46th IUPAC Macro 2016 World Polymer Congress*, İSTANBUL
6. Nurdan KURNAZ YETİM, Elvan HASANOĞLU ÖZKAN, Nurşen SARI, 2016. AChE Enzimi Tutturulmuş Destek Polimerin (FMPS) Elma Kurduna Karşı Kullanılan Pestisit Tayininde Kullanılması (**Sözel Sunum**), *VI. Ulusal Polimer Bilim ve Teknoloji Kongresi*, ANKARA
7. 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*, ANKARA
8. 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*, ANKARA
9. Nurdan Kurnaz Yetim, Elvan Hasanoğlu Özkan, Hayrettin Tümtürk, Nurşen SARI, 2015. Asetilkolin Esteraz Enziminin Tekrar Kullanım Sayısında Pt(II) ve Pt(IV) İyonlarının Etkisi, *5. Ulusal Anorganik Kongresi*, MERSİN
10. Elvan Hasanoğlu Özkan, Nurdan Kurnaz Yetim, Nurşen Sarı, Hayrettin Tümtürk, 2015. Pt(II) Koordinasyon Polimerlerinin Hazırlanması, Toksik Bileşiklerin Analizinde AChE'in Kullanımı için Önemli Parametrelerinin Araştırılması, *V. Ulusal Anorganik Kimya Kongresi*, MERSİN
11. Elvan Hasanoğlu Özkan, Nurdan Kurnaz Yetim, Esengül Çiftçi, Nurşen Sarı, 2015. İmmobilize GOx'un Lineweaver-Burk Grafiğinden Yararlanılarak Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi, *V. Ulusal Anorganik Kimya Kongresi*, MERSİN

12. E. Hasanoğlu Özkan, N. Kurnaz Yetim, N. Sarı, O. Eren, H. Ögütçü, 2015. Attaching the Support of Platinum(II) Complex and Antifungal Activities, *International Symposium on Pharmaceutical Sciences*, ANKARA
13. 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*, ANKARA
14. 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*, ANKARA
15. 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*, ANKARA
16. N. Kurnaz Yetim, E. Hasanoğlu Özkan, N. Sarı, H. Tümtürk, 2015. Use of Nanospheres as Support Material for Enzyme Immobilization, *11th Nanoscience and Nanotechnology Conference*, ANKARA
17. E. Hasanoğlu Özkan, N. Kurnaz Yetim, N. Sarı, , 2015. Performance on the Recycling Stability of Ferrocene-Tagged Sphere for Determination of Glucose (Oral Presentation), *International Conference on Chemical and Biochemical Engineering*, FRANSA
18. 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*, FRANSA
19. 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*, ADANA
20. Büşra Daniş, Elvan H. Özkan, Nurdan K. Yetim, Nurşen Sarı, 2014. Nanokürelere Çift Ferrosen Takılması ve Biyokataliz Özelliklerinin Araştırılması, *5. Kimya Öğrenci Kongresi*, İSTANBUL
21. Esengül Çiftçi, Nurdan K. Yetim, Elvan H. Özkan, Nurşen Sarı, 2014. Nanokürelere Takılı aminoasit içerikli Ferrosenin, Glukoz Tayininde Kullanımı için Optimum Şartların Belirlenmesi, *5. Kimya Öğrenci Kongresi*, İSTANBUL
22. Nurdan Kurnaz Yetim, Elvan Hasanoğlu Özkan, Dilek Nartop, Nurşen Sarı, 2014. New Nanospheres Attached Pt(II) for Investigation of Glucose Oxidase Enzyme as

- Biocatalysts (**Sözel Sunum**), *5th World Congress on Biotechnology*, Valencia, İSPANYA
23. Hatice Öğütçü, 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*, Valencia, İSPANYA
 24. Elvan Hasanoğlu Özkan, Nurdan Kurnaz Yetim, Dilek Nartop, Nursen Sarı, 2014. Attached of Pt(IV)-Schiff Base Complexes on Nanoplatfroms; Covalent Immobilization of Glucose Oxidase Enzyme as Biocatalysts, *5th World Congress on Biotechnology*, Valencia, İSPANYA
 25. Nurdan Kurnaz Yetim, Nurşen Sarı, Hatice Öğütçü, Aliye Altundaş, 2013. Bruselloz ve Tifoid'e Karşı Etkili Kükürt İçeren Schiff Bazları ve Pt(II) ve Pt(IV) Kompleksler, *4. Anorganik Kimya Kongresi*, TOKAT
 26. 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*, İSTANBUL
 27. Emre KIZIL, Elvan HASANOĞLU ÖZKAN, Hatice ÖĞÜTÇÜ, Güleray AĞAR, Nurdan KURNAZ YETİM, Nurşen SARI, İffet ŞAKIYAN, 2013. Antibakteriyel Özellik Gösteren Schiff Bazı ve Mn(II) Komplekslerinin Antimutajenik Etkisinin Belirlenmesi, *XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi*, İZMİR
 28. Esra BOZKIR, Nurdan KURNAZ, Nurşen SARI, 2012. Ni(II) ve Cr(III) İyonlarını İçeren Koordinasyon Polimerlerinin SEM-EDX ile Yapı Tayini, *IV. Polimer Bilim ve Teknoloji Kongresi*, ÇANAKKALE
 29. Esra BOZKIR, Nurşen SARI, Nurdan KURNAZ, 2012. Antimikrobiyal Ajan Olarak Kullanılabilecek (Aminometil)polistirenin Modifikasyonu ve Karakterizasyonu, *IV. Polimer Bilim ve Teknoloji Kongresi*, ÇANAKKALE
 30. Nurşen Sarı, Nurdan Kurnaz, Hatice Öğütçü, 2012. Comparison Antibacterial and Antifungal Properties of Between Diamagnetic and Paramagnetic Ni(II) Complexes, *10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-10)*, ANKARA
 31. Nurdan Kurnaz, Hatice Öğütçü, Nurşen Sarı, 2012. Novel Cr(III) Complexes of D-Aminoacid-Schiff Bases as Antimicrobial Agents, *10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-10)*, ANKARA
 32. Nurdan Kurnaz, Nihat Pişkin, Elvan Hasanoğlu, Nurşen Sarı, Hatice Öğütçü, 2011. Synthesis of azomethine-Cr(III) complexes and evaluation of the in vitro antibakteriyel

against *Microoccus Luteus* and *Brucella Abortus*, *1st International Symposium of Secondary Metabolites: Chemical, Biological and Biotechnological Properties (ISSMET2011)*, DENİZLİ

33. Elvan Hasanoğlu, Nihat Pişkin, Nurdan Kurnaz, Hatice Ögütçü, Nurşen Sarı, 2011. Synthesis and biological evaluation of Schiff bases-Ni(II) complexes as antibacteriyal agents, *1st International Symposium of Secondary Metabolites: Chemical, Biological and Biotechnological Properties (ISSMET2011)*, DENİZLİ

Ödül - Proje - Buluş

Proje

1. Yeni dendrimer ve dendron sentezi, onların biyokataliz araştırmaları (tamamlandı) (2016) Gazi Üniversitesi BAP
2. Antifungal ajan olarak yeni Pt(II) ve Pt(IV) komplekslerinin sentezi ve karakterizasyonu (tamamlandı) (2013)

Patent

Biyokataliz Uygulamalarında Kenger Sakızı İçerikli Doğal Destek Materyali ve Hazırlanması, 2014 10229 (2016)



GAZİ GELECEKTİR..