



T.C.

BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

BİYOMÜHENDİSLİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**PESTİSİT TAYİNİ UYGULAMALARI İÇİN MODİFİYE MANYETİK
NANOPARTİKÜL ÜZERİNE İMMOBİLİZE EDİLEN KOLİNESTERAZLARIN
KARAKTERİZASYONU VE KİNETİK PARAMETRELERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEMANUR BAŞARAN

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. MESUT IŞIK

BİLECİK, 2026

10827674

T.C.

BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

BİYOMÜHENDİSLİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**PESTİSİT TAYİNİ UYGULAMALARI İÇİN MODİFİYE MANYETİK
NANOPARTİKÜL ÜZERİNE İMMOBİLİZE EDİLEN KOLİNESTERAZLARIN
KARAKTERİZASYONU VE KİNETİK PARAMETRELERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEMANUR BAŞARAN

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. MESUT IŞIK

BİLECİK, 2026

10827674

BEYAN

“Pestisit Tayini Uygulamaları İçin Modifiye Manyetik Nanopartikül Üzerine İmmobilize Edilen Kolinesterazların Karakterizasyonu ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi” adlı yüksek lisans tezinin hazırlık ve yazım aşamasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Faaliyetlerinde Üretken Yapay Zekâ Kullanımına Dair Etik Rehberine uygun olarak tez hazırladığımı, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel etik kurallarına uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, çalışmamın herhangi bir kısmının başka bir tez olarak sunulmadığını, aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim. Bu çalışma 1649B022400942 başvuru numaralı 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı ile desteklenmiştir.

Semanur BAŞARAN

.../.../...

İmza

	YAPAY ZEKÂ KULLANIMINA İLİŞKİN ÖĞRENCİ BEYAN FORMU	BŞEÜ-KAYSİS Belge	DFR-516
		İlk Yayın Tarihi/Sayısı	30.04.2026/16
		Revizyon Tarihi	00
		Revizyon No.su	00
		Toplam Sayfa	1

Bölüm I. Yapay Zekâ Kullanım Durumu

- ☐ Bu tezin/projenin yazım süreçlerinde yapay zekâ tabanlı araçlardan **faýdalandım**.
- ☐ Bu tezin/projenin yazım süreçlerinde yapay zekâ tabanlı herhangi bir araçtan **faýdalanmadım**.

Bölüm II. Yapay Zekâ Kullanım Detayları

**Bu bölüm yalnızca yapay zekâ kullanımı beyan edilmiş ise doldurulacaktır. Aksi durumda boş bırakılmalıdır.*

Tezinizde/projenizde kullandığınız yapay zekâ araçlarını ve sürümünü listeleyiniz:

**Yapay zekâ araçlarını tezin/projenin aşağıdaki aşamalarında ilgili amaçlar için kullandım.
(Birden fazla seçenek işaretlenebilir):**

- ☐ Cümle oluşturma
- ☐ Literatür tarama
- ☐ Çeviri
- ☐ Düzenleme/dil kontrolü
- ☐ Veri işleme ve analizi
- ☐ Veri görselleştirme
- ☐ Görüntü üretme
- ☐ Kaynakça düzenleme
- ☐ Diğer (Belirtiniz):.....

Bu çalışmada yapay zekâ kullanımı **Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Faaliyetlerinde Üretken Yapay Zekâ Kullanımına Dair Etik Rehber**'e ve akademik dürüstlük ilkelerine uygun şekilde gerçekleştirilmiş olup yapay zekâ araçlarından alınan destek, etik kurallar ve kaynak gösterme esaslarına uygun biçimde belirtilmiştir. Yapay zekâ kullanımı, çalışmanın özgünlüğüne, bilimsel etik kurallarına ve ilgili mevzuata aykırı olmayacak biçimde gerçekleştirilmiştir. Usulsüz yapay zekâ kullanımı (örneğin: kaynak göstermeksizin metin üretimi, otomatik içerik üretiminin özgün eser gibi sunulması, yanıltıcı kaynak gösterimi vb.) tarafımdan kesinlikle yapılmamıştır. Yapay zekâ araçlarının sağladığı bilgilerin doğruluğunu kontrol ettiğimi, yanlış veya eksik bilgi bulunması halinde tüm sorumluluğun tarafıma ait olduğunu; ayrıca çalışmamla ilgili bu beyana aykırı bir durumun herhangi bir zamanda tespit edilmesi durumunda ortaya çıkabilecek akademik ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi beyan ederim.

Semanur BAŞARAN

.../.../...

İmza

ÖN SÖZ

Yüksek lisans bilimsel araştırmaların yanı sıra; bir öğrenciyi akademik ve sosyal yaşama hazırlamak için çıkılan temel basamaklardan biridir. Bu basamakta en iyi şekilde öğrenim sağlayabilmek için bilgi ve tecrübeleriyle bana rehber olan, akademik hayatıma yön veren ve tabularımın yıkılmasını sağlayıp sağlam adımlarla yeniliklere açık hale getiren, çalışma motivasyonumun düşmesine izin vermeyen, her yönde, her alanda kıymetli destekleriyle beni aydınlığa çıkaran danışman hocam Prof. Dr. Mesut IŞIK’a sonsuz teşekkür ederim.

Bu tezi gerçekleştirirken bana “1649B022400942 başvuru numaralı 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı” ile destek sağlayan TÜBİTAK’a şükranlarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımı yaparken hem teorik hem de deneysel olarak benden yardımlarını esirgemeyen Öğr. Gör. Bilge ÇİFTÇİ’ye ve Öğr. Gör. Olgun ÇIRAK’a; her zaman daima benim yanımda olan anneme, babama ve ablam Zeynep OĞUZ ile kardeşim Muhammet Ali Başaran’a; bu tez çalışması sırasında tüm zorluklara karşı motivasyon ve moralimin düşmesine izin vermeyip beni yalnız bırakmayan kendisine çok saygı duyduğum Hamit KARADAĞ’a, maddi manevi her anda benim yanımda olmaya çalışan hayat tecrübeleriyle benim ayakları üzerinde durabilen güçlü bir kadın olmam için her koşulda beni motive eden Ayfer ve Meryem POLAT’a, beni her daim dinleyen, bana zaman ayıran beni olduğum gibi kabul edip eğitim hayatımda ve geleceğe dair her adımda doğru şekilde yönlendirmeye çalışıp vazgeçmemem için bana yol gösteren değerli arkadaşlarım Hakan ve Nurhan ÇEVİK’e, Aytaç ve İrem ÜNAL’a, Merve Nur AK’a, Muhammed Talha KANDEMİR ve Tırpan Erdem ALTINTAŞ’a çok çok teşekkür ederim.

Son olarak bu çalışmada her şeye rağmen yarıda bırakmayıp tamamladığım için de kendime teşekkürü bir borç bilerek yaptığım çalışmanın literatüre ve gelecek için yeni yapılan proje ve araştırmalara ön ayak olmasını temenni ederim.

ÖZET

Enzimler, birçok biyokimyasal ve kimyasal reaksiyonu katalize eden biyolojik katalizörlerdir. Üretim kolaylığı, substrat özgüllüğü ve yeşil kimya özellikleri nedeniyle bu biyokatalizörler çeşitli alanlarda yaygın olarak da kullanılmaktadır. Ancak biyokatalizördeki stabilite ve geri kazanım sorunu endüstriyel uygulamaları kısıtlamaktadır. Bu durumları iyileştirmek ve enzimi daha işlevsel hale getirmek için birçok yöntem başvurulmaktadır. Bu yöntemlerden biri de yüksek verimlilik ve stabilite artışı sağlayan enzim immobilizasyonu yöntemidir. İmmobilize enzimler, serbest enzime göre gelişmiş stabilite, reaksiyon karışımından ayrılma kolaylığı, enzim tüketiminde tasarruf ve genellikle geliştirilmiş aktivite gibi çeşitli faydalar sunduğu bilinmektedir. Enzim immobilizasyonu; enzim moleküllerinin, substratın ya da ürünlerin mevcut durumundan farklı bir katı matris/destek ile hareketsizleştirilmesi olarak tanımlanabilir. Enzim immobilizasyonu için matris veya destek materyali olarak genellikle inert polimerler ve inorganik malzemeler kullanılmaktadır. Bu çalışma kapsamında Fe_3O_4 manyetik nanopartikülleri (MNP'ler) sentezlenmiş ve kolinesteraz enzimleri, çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit (GA) kullanılarak fonksiyonelleştirilmiş MNP'ler üzerine immobilize edilmiştir. İmmobilize enzimler ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{GA}/\text{AChE}/\text{BChE}$), taramalı elektron mikroskopu-enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (SEM-EDX) ve FT-IR ile karakterize edilmiştir. İmmobilize edilen bu kolinesteraz enzimlerinin kinetik parametreleri, stabilitesi ve pestisit tayinindeki uygulamaların serbest enzime kıyasla üstünlükleri belirlenmiştir. Serbest ve immobilize enzimlerin optimum pH aktivitesi, pH 5–11 aralığında belirlenmiştir. En yüksek aktivite serbest AChE ve BChE için pH 8'de, immobilize AChE ve BChE için ise pH 10'da gözlenmiştir. Kinetik parametreler incelendiğinde, immobilize AChE için K_m ve $V_{\max}$ değerleri sırasıyla 0,446 mM ve 0,659 EU mL^{-1} olarak bulunurken, serbest AChE için bu değerler sırasıyla 0,163 mM ve 0,965 EU mL^{-1} olarak; immobilize BChE için ise K_m ve $V_{\max}$ değerleri sırasıyla 0,438 mM ve 0,527 EU mL^{-1} olarak hesaplanırken, serbest BChE için bu değerler sırasıyla 0,177 mM ve 0,587 EU mL^{-1} olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan takrin inhibitörünün enzime bağlanma afinitesinin immobilize enzimde serbest enzime kıyasla daha düşük olduğu görülmüştür. Depolama stabilitesi çalışmalarında, 4 °C'de 40 gün boyunca saklanan immobilize AChE'nin başlangıç aktivitesinin %96,2'sini koruduğu, buna karşılık serbest enzimin ise %83,2'sini koruduğu belirlenmiştir. BChE enzimi için ise bu değerler immobilize enzim için %79.2 iken serbest enzim için %55,7'dir. Ayrıca, 20 tekrarlı kullanım testi sonucunda immobilize AChE ve BChE'nin başlangıç aktivitesinin %95'inden fazlasını koruduğu tespit edilmiştir. Pestisit tayini uygulamasında ise nicosulfuronun farklı konsantrasyonda kolinesteraz enzimleri üzerindeki % inhibisyon değerleri ölçülmüştür.

Bu % inhibisyon değerlerine bağlı olarak gerçek numunedeki (mısıır) nicosülfuron miktarı spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. İmmobilizasyon işlemi sonucunda enzimin elde ettiği yüksek stabilite ve tekrar kullanılabilirlik, gelecekteki biyoteknolojik uygulamalara yönelik çalışmalara önemli katkılar sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: Kolinesterazlar, manyetik nanopartikül, immobilizasyon, stabilite, kinetik parametre, pestisit tayini

ABSTRACT

Enzymes are biological catalysts that catalyze a wide range of biochemical and chemical reactions. Owing to their ease of production, substrate specificity, and environmentally friendly characteristics, these biocatalysts are widely used in various fields. However, limitations associated with enzyme stability and recovery restrict their industrial applications. Several approaches have been developed to overcome these limitations and improve enzyme functionality. One such approach is enzyme immobilization, which can provide enhanced stability and improved operational efficiency. Compared with free enzymes, immobilized enzymes offer several advantages, including enhanced stability, ease of separation from reaction mixtures, reduced enzyme consumption, and, in some cases, improved catalytic activity. Enzyme immobilization can be defined as the confinement or attachment of enzyme molecules to a solid matrix or support, thereby restricting their mobility relative to that of the substrate or product. In enzyme immobilization, inert polymers and inorganic materials are commonly used as matrices or support materials. In the present study, Fe₃O₄ magnetic nanoparticles (MNPs) were synthesized, and cholinesterase enzymes were immobilized onto functionalized nanoparticles using glutaraldehyde (GA) as a cross-linking agent. The immobilized enzymes (Fe₃O₄@SiO₂-NH₂/GA/AChE/BChE) were characterized using scanning electron microscopy coupled with energy-dispersive X-ray spectroscopy (SEM–EDX) and Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). The kinetic parameters and stability of the immobilized cholinesterase enzymes were investigated, and their advantages over the corresponding free enzymes in pesticide determination were evaluated. The optimum pH values for the activities of both free and immobilized enzymes were investigated over the pH range of 5–11. The highest activities of free AChE and BChE were observed at pH 8, whereas those of immobilized AChE and BChE were observed at pH 10. Regarding the kinetic parameters, the (K_m) and ($V_{\max}$) values of immobilized AChE were determined to be 0.446 mM and 0.659 EU mL⁻¹, respectively, whereas the corresponding values for free AChE were 0.163 mM and 0.965 EU mL⁻¹. Similarly, the (K_m) and ($V_{\max}$) values of immobilized BChE were calculated to be 0.438 mM and 0.527 EU mL⁻¹, respectively, compared with 0.177 mM and 0.587 EU mL⁻¹ for free BChE. The binding affinity of tacrine, which was used as a positive control inhibitor, was found to be lower for the immobilized enzymes than for the corresponding free enzymes. Storage stability studies demonstrated that immobilized AChE retained 96.2% of its initial activity after 40 days of storage at 4 °C, whereas free AChE retained 83.2%. For BChE, the residual activities of the immobilized and free enzymes were 79.2% and 55.7%, respectively. Furthermore, reusability tests involving 20 consecutive cycles revealed that both immobilized

AChE and BChE retained more than 95% of their initial activities. In the pesticide determination application, the percentage inhibition of cholinesterase activity was measured at different concentrations of nicosulfuron. Based on these inhibition values, the amount of nicosulfuron in a real maize sample was determined spectrophotometrically. The enhanced stability and reusability achieved through enzyme immobilization may make a significant contribution to future research and development in biotechnology applications.

Keywords: Cholinesterases, magnetic nanoparticles, immobilization, stability, kinetic parameters, pesticide determination

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖN SÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL/KAVRAMSAL TEMELLER.....	5
2.1. Enzimler	5
2.1.2. Enzimlerin kimyasal yapısı.....	7
2.1.3 Enzimlerin katalizasyonu	8
2.1.4. Enzim kinetiği	9
2.1.5. Enzim immobilizasyonu	10
2.1.5.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	13
2.1.5.2. Enzim immobilizasyonunda kullanılan destek materyalleri	18
2.3. Nicosülfuron	29
2.4. Literatür özeti	31
3. MATERYAL/METOT.....	35
3.1. Kimyasallar ve kullanılan cihazlar	35
3.1.2 Çözeltilerin hazırlanması.....	36
3.2. Manyetik nanopartikül sentezi ve karakterizasyonu	36
3.2.1. Manyetik nanopartikülün fonksiyonelleşmesi:.....	36
3.3. Enzim immobilizasyonu, karakterizasyonu ve kinetik parametreler.....	37
3.3.1. İmmobilize AChE ve BChE enzimlerinin karakterizasyonu	37
3.3.2. Aktivite tayini.....	38
3.3.3. Kinetik parametrelerin belirlenmesi	38
3.4. Stabilite çalışmaları	39
3.4.1. Optimum ve stabil pH'ın belirlenmesi	39
3.4.2. Optimum termal parametrelerin belirlenmesi.....	39
3.4.3. Operasyonel stabilite	39

3.4.4. Depolama stabilitesi.....	40
3.5. Nicosulfuron tayini uygulaması.....	40
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	41
4.1. İşlevselleştirilmiş MNP’lerde AChE ve BChE’nin karakterizasyonu ve immobilizasyonunun değerlendirilmesi.....	42
4.2. Stabilité çalışmalarının değerlendirilmesi.....	47
4.2.1. Optimum ve stabil pH analizlerinin değerlendirilmesi.....	47
4.2.2. İmmobilize ve serbest enzimlerin termal parametrelerinin değerlendirilmesi	49
4.2.3. Kararlılık ve yeniden kullanılabilirliğin değerlendirilmesi.....	50
4.4. Pestisit tayininde uygulanabilirlik	55
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	57
KAYNAKÇA	59

TABLÖLER LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Enzim immobilizasyonunda avantaj ve dezavantajlar.....	12
Tablo 2.2. Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları	35
Tablo 2.3. Serbest ve immobilize enzimlerin kinetik parametreleri	53
Tablo 2.4. Pestisit tayin uygulaması	56

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. AChE ve BChE'nin $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{GA}$ üzerine GA aracılığıyla çapraz bağlama yöntemiyle immobilizasyonu (başaran ve ışık., 2025).	4
Şekil 2.1. Enzimlerin kimyasal yapısı.....	8
Şekil 2.2. Enzimlerin katalizasyonunun gösterimi.....	9
Şekil 2.3. Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	13
Şekil 4.1. AChE ve BChE'nin $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{GA}$ üzerine GA aracılığıyla çapraz bağlama yöntemiyle immobilizasyonu. fonksiyonelleştirilmiş mnp'ler üzerine immobilize edilen enzimin aktivitesi 20–80 saniye aralığında ölçülmüştür. zamanla sarı rengin artması, katalitik aktivitenin varlığını göstermektedir. 80 saniyenin (4) sonunda mnp'ler bir mıknatıs yardımıyla toplanarak ortamdan uzaklaştırılmış ve tekrar kullanılmak üzere ayrılmıştır; ardından enzim aktiviteleri ölçülmüştür. burada, 3 dakikanın sonunda 5, enzim immobilizasyonu yapılmamış mnp'leri ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{Ga}$), 6 ise enzim immobilizasyonu yapılmış mnp'leri ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{Ga}/\text{AChE}/\text{BChE}$) temsil etmektedir.....	42
Şekil 4.2. İmmobilizasyon sonrası (A,C) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{GA}$ ve (B,D) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{GA}/\text{AChE}$ 'nin SEM-EDX analizi.....	44
Şekil 4.3. İmmobilizasyon sonrası (A,C) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{GA}$ ve (B,D) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{GA}/\text{BChE}$ 'nin SEM-EDX analizi.....	45
Şekil 4.4. İmmobilizasyon öncesi (a:MNP/TEOS/APTES/GA), sonrası (b:MNP/TEOS/APTES/GA/AChE ve c:MNP/TEOS/APTES/GA/BChE) FT-IR spektrumları	46
Şekil 4.5. Serbest ve İmmobilize enzimlerin optimum pH grafiği	47
Şekil 4.6. Serbest ve İmmobilize AChE'nin pH stabilitesi	48
Şekil 4.7. İmmobilize ve serbest enzimlerin optimum sıcaklık grafikleri	50
Şekil 4.8. Serbest ve immobilize AChE ve BChE enzimleri 60 günlük depolama stabilitesi grafikleri.....	51
Şekil 4.9. İmmobilize AChE (a) ve İmmobilize BChE (b)'nin 20 ardışık reaksiyon döngüsü grafikleri.....	52

SİMGELER LİSTESİ

AChE : Asetilkolinesteraz

BChE : Bütirilkolinesteraz

ATCh: Asetilkolin iyodat

BTCh: Bütiriltiyokolin iyodat

GA : Gluteraldehit

MNP : Manyetik Nanopartikül

APTES: 3-aminopropiltrietoksisilan

TEOS: Tetra Ortosilikat

EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

DTNB: 5,5-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik asit)

EDX : Enerji Dağılımlı X-ışını

FT-IR: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi

HRP: Horseradish Peroxidase

1.GİRİŞ

Geçmişten günümüze yeşil kimya ve sürdürülebilir üretim teknolojilerini geliştirmek için atılan adımlarla çevre dostu, ekonomik avantajlara sahip yöntemlere olan talepler artmıştır. Bu talepler doğrultusunda biyokatalizör prosesleri öne çıkmaya başlamıştır. Böylelikle biyokatalizör olarak da bilinen enzimler üzerine çalışmalara yönelim artmıştır. Enzimler, canlı hücreler tarafından üretilen ve hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar dahil olmak üzere çok çeşitli türlerde bulunan proteinlerdir (Kuo vd., 2022). Yüksek katalitik aktivite, yüksek seçicilik, özgüllük ve biyolojik bozunabilirlik gibi avantajlarına sahip katalizörlerdir. Ayrıca, hafif pH, sıcaklık ve basınçta da çalışabilmektedir. Ancak, enzimler ilk denemeden sonra geri kazanılamaz ve yeniden kullanılamaz, bu da ekonomik açıdan dezavantaj oluşturmaktadır (Liu vd., 2018).

Enzimler hücresel ortamda çalışacak şekilde değişim göstermesi nedeniyle genellikle organik çözücüler, pH ve yüksek sıcaklıklara karşı duyarlıdırlar. Bu durum katalitik aktiviteyi oldukça düşürmektedir. Genellikle sulu ortamda orta sıcaklık ve pH altında çalışan süreçlerin tasarlanması arzu edilir, ancak bazı durumlarda daha yüksek derecelerde işlem koşulları gereklidir. Örneğin, substrat çözünürlüğünü artırmak için yüksek sıcaklık veya organik çözücü kullanımı gerekebilmektedir. Bu nedenle, daha yüksek stabiliteli enzimlerin geliştirilmesi gerektiği ve bu sınırlamaların daha aza indirgenmesi veya ortadan kaldırılması üzerine yeni çalışmaların oluşturulmasına yol açmıştır (Polizzi vd., 2007). Bunun yanında ayrıca enzimlerin üretimi, saflaştırılması ve uzun vadede kullanımı sırasında kararlılıklarının korunması, biyokatalitik süreçlerin endüstriyel ölçekte uygulanabilirliğini belirleyen temel ekonomik ve teknik unsurlar arasında yer almaktadır. Özellikle enzim üretim maliyetlerinin yüksek olması, saflaştırma basamaklarının karmaşıklığı ve enzimlerin operasyonel aktivitelerini kaybetmeleri, biyokatalitik süreçlerin toplam işlem maliyetini önemli ölçüde artırmaktadır. Bununla beraber aynı zamanda, kütle transferi dirençleri, reaktör tasarımından kaynaklanan performans sınırlamaları ve reaksiyon sonunda enzimin üründen ayrılmasını gerektiren ekstra saflaştırma işlemleri, proseslerin ölçek büyütülmesi sırasında karşılaşılan başlıca mühendislik problemleridir. Bu nedenlerle, enzimlerin operasyonel stabilitesini artıran ve aynı biyokatalizörün birden fazla çevrim boyunca yeniden kullanılmasına olanak sağlayan immobilizasyon ve stabilizasyon yaklaşımları, biyokatalitik süreçlerin ekonomik sürdürülebilirliğini ve endüstriyel rekabet gücünü artıran en önemli stratejiler arasında kabul edilmektedir (Barati vd., 2024; Patti vd., 2024; Michaud vd., 2024).

Biyokatalitik proseslerin geliştirilmesinde yüksek verimlilik ve aktivite sağlayan enzim immobilizasyonu yöntemi öne çıkmaktadır. Genellikle biyoteknolojik uygulamalarda yeşil kimya ile daha temiz üretim ve sürdürülebilir operasyonel teknolojiler sağlamadaki mevcut taleplerini takip etmesi açısından da umut verici bir metodolojidir (Skendrović vd., 2024). İmmobilize enzimler, serbest enzime göre gelişmiş stabilite, reaksiyon karışımından ayrılma kolaylığı, enzim tüketiminde önemli tasarruflar ve genellikle geliştirilmiş aktivite gibi çeşitli faydalar sunduğu bilinmektedir (Zhu vd., 2014). Enzim immobilizasyonu, biyokatalizin verimliliğini ve sürdürülebilirliğini artırmada kritik bir rol oynar; sınırlı enzim stabilitesi, kısa raf ömrü ve yeşil kimya ile endüstriyel uygulamalar için kritik olan geri dönüşüm ve geri dönüşüm zorlukları gibi temel zorlukları ele almaktadır. Etkili bir immobilizasyon sistemi, ürünleri kirletebilecek ve enzim kaybına yol açabilecek istenmeyen salınımları önlemek için enzimi güvenli bir şekilde sabitlemektedir (Robescu ve Bavaro, 2025). Fakat, halen daha devam eden çalışmalarda immobilizasyon sürecinde kullanılabilecek biyoyoumlu, ekonomik ve yüksek performanslı destek materyallerinin geliştirilmesi önemli bir araştırma alanı olarak güncelliğini korumaya devam etmektedir.

Sağlık endüstrisinde asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirikolinesteraz (BChE); Alzheimer hastalığının tanısı ve progresyonunun izlenmesi, kolinesteraz inhibitörü ilaçların geliştirilmesi, organofosfat zehirlenmelerine karşı biyolojik biyosavunma stratejileri ve klinik tanı sistemlerinde önemli biyobelirteçler olarak kullanılmaktadır (Sun vd., 2024; Dirak vd., 2024). Tarım endüstrisinde ise bu enzimler, organofosfat ve karbamat grubu pestisitlerin inhibisyon mekanizmasına dayalı biyosensörlerin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmakta; pestisit kalıntılarının hızlı, seçici ve düşük maliyetli tespit edilmesine olanak sağlamaktadır (Zhang vd., 2024; Soldatkin vd., 2024). Bununla birlikte, serbest halde kullanılan AChE ve BChE enzimleri; sıcaklık ve pH değişimlerine karşı sınırlı kararlılık göstermeleri, operasyon sonunda reaksiyon ortamından geri kazanılamamaları, tekrar kullanılamamaları ve enzim aktivitesindeki hızlı kayıplar nedeniyle endüstriyel uygulamalarda önemli kısıtlamalar oluşturmaktadır. Ayrıca reaksiyon sonrasında enzimin kaybedilmesi, her analiz veya üretim döngüsünde yeniden enzim ilavesini zorunlu kılarak proses maliyetlerini önemli ölçüde artırmaktadır. Bu nedenlerle, enzimlerin kararlılığını artırmak, tekrar kullanılabilirliğini sağlamak ve operasyonel maliyetleri azaltmak amacıyla immobilizasyon teknikleri son yıllarda yoğun olarak araştırılmaktadır. Bununla birlikte, geleneksel immobilizasyon materyalleri olan makro boyutlu polimerik boncuklar, hidrojeller ve reçineler; düşük yüzey alanı, sınırlı enzim yükleme kapasitesi ve yüksek kütle transfer direnci gibi dezavantajlar nedeniyle biyosensör

performansı ve katalitik verim açısından istenilen düzeye ulaşamamaktadır. Bu nedenle nanomalzemeler, manyetik nanopartiküller (MNP'ler) ve fonksiyonelleştirilmiş ileri destek materyallerine dayalı yeni immobilizasyon stratejileri, hem sağlık hem de tarımsal biyosensör uygulamalarında AChE ve BChE'nin stabilitesini, duyarlılığını ve yeniden kullanılabilirliğini artıran umut verici yaklaşımlar olarak öne çıkmaktadır (Cavalcante vd., 2024; Hao vd., 2024; Kotwal vd., 2024). Böylelikle AChE ve BChE enzimlerinin katalitik aktivitelerini koruyarak farklı çalışma koşullarında yüksek kararlılık gösterebileceği, reaksiyon ortamından kolaylıkla geri kazanılabileceği ve önemli bir aktivite kaybı olmaksızın tekrarlı kullanım döngülerinde yeniden kullanılabileceği özgün, farklı ortam ve koşullara dayanıklı, yenilikçi nanotaşıyıcı sistemlerin tasarlanması ve geliştirilmesi, bu tez çalışmasının temel araştırma konusunu oluşturmaktadır.

Bu çalışma sırasıyla aşağıdaki adımlar izlenerek gerçekleştirilecektir:

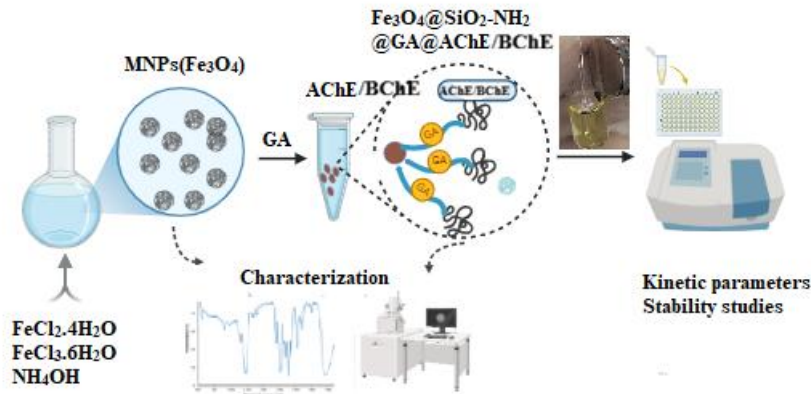
- Birlikte çöktürme (co-precipitation) yöntemiyle süper paramanyetik karakterde demir oksit (Fe_3O_4) nanopartiküllerin sentezlenmesi,
- Sentezlenen taşıyıcıların yüzeylerinin aminosilan ajanlarla fonksiyonelleştirilmesi ve çift fonksiyonlu (bifunctional) GA çapraz bağlayıcısı ile aktive edilmesi
- AChE ve BChE enzimlerinin yüzeye kovalent bağlanması ve sentezlenen nanobiyokatalizörün karakterize edilmesi
- Kinetik parametrelerin belirlenmesi ve stabilite çalışmalarının gerçekleştirilmesi
- Nicosulfuron tayini uygulaması

Bu araştırmanın bilimsel özgünlüğü, sağlık ve tarım alanındaki biyokatalitik uygulamalarda kullanılmak üzere yüksek performans, operasyonel sürdürülebilirlik ve etkin geri kazanım özelliklerini bir araya getiren yenilikçi bir nanotaşıyıcı sistemin geliştirilmesine dayanmaktadır.

Literatür çalışmalarında demir oksitlerin yüksek sıcaklık, yüksek basınç, güçlü asit ve güçlü alkali özellikler gibi çeşitli karmaşık arka planlarda stabiliteyi koruyabilir, bu nedenle daha iyi bir uygulama beklentisine sahiptir (Wei vd., 2008). Şu anda, Fe_3O_4 Nanopartiküller, kataliz, algılama, optoelektronik cihazlar, güneş enerjisi hücreleri ve elektrot malzemeleri gibi birçok araştırma alanında popüler MNP'lerin bileşeni haline gelmiştir (Ma vd., 2013). Manyetik Fe_3O_4 'ten beri nanopartikül bazlı biyosensörler, analitleri hızlı bir şekilde tespit etmek için hassas bir araç sunar, AChE gibi çeşitli biyomoleküller, organofosforlu pestisitlerin tespiti için sensörler oluşturmak üzere demir oksit nanopartikülleri üzerinde hareketsiz hale

getirilmiştir ve iyi stabilite ve daha düşük bir tespit limiti gibi mükemmel performans sunmuştur (Gao vd., 2007). Aynı zamanda, manyetik çekirdekli ve gözenekli kabuklara sahip çekirdek-kabuk yapılı manyetik mezogözenekli karbon kürelerin, yüksek oranda bağlı gözenekli yapılar ve iyi korunmuş manyetik bileşenler nedeniyle özellikle çeşitli uygulamalar için ideal olduğu bulunmuştur (Luo vd.,2018).

Sonuç olarak, kovalent immobilizasyonun sağladığı yüksek yapısal dayanıklılık ile MNP'lerin hızlı geri kazanım ve yeniden kullanılabilirlik avantajlarını aynı platformda buluşturan bu nanobiyokatalizörün, AChE ve BChE enzimlerinin sağlık ve tarım alanındaki biyokatalitik uygulamalarında operasyonel verimliliği artırması ve enzim tüketimine bağlı maliyetleri azaltması beklenmektedir. Ayrıca geliştirilecek bu yaklaşımın (şekil 1.1.), sürdürülebilir biyoproseslerin geliştirilmesine katkı sağlamasının yanı sıra, enzim immobilizasyonu ve nanobiyoteknoloji alanındaki güncel çalışmalara bilimsel açıdan özgün bir katkı sunacağı öngörülmektedir.



Şekil 1.1. AChE ve BChE'nin Fe₃O₄@SiO₂-NH₂/GA üzerine GA aracılığıyla çapraz bağlama yöntemiyle immobilizasyonu (Başaran ve Işık., 2025).

Bu çalışmada Fe₃O₄ MNP'ler sentezlenmiş ve kolinesteraz enzimleri, çapraz bağlayıcı olarak GA kullanılarak fonksiyonelleştirilmiş MNP'ler üzerine immobilize edilmiştir. İmmobilize enzimler (Fe₃O₄@SiO₂-NH₂/GA/AChE/BChE), taramalı elektron mikroskopu-enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (SEM-EDX) ve FT-IR ile karakterize edilmiştir. İmmobilize edilen bu kolinesteraz enzimlerinin kinetik parametreleri, stabilitesi serbest enzime kıyasla üstünlükleri belirlenmiştir.

2. KURAMSAL/KAVRAMSAL TEMELLER

2.1. Enzimler

Enzim terimi, Yunanca en (iç iç) ve zyme (maya anlamına gelir) kelimelerinden gelmiştir ve ilk kez 1878'de Wilhelm Kühne tarafından bira mayası çeşitli şekerleri fermente etme yeteneğini test ederken tanıtılmıştır. 1926'da enzimlerin ilk kez protein olduğu bilinirken, 1982'de gen teknolojisi ürününün, örneğin α -amilazın ilk gıda uygulaması gerçekleştirilmiştir (Piotrowska-Długosz., 2019).

Enzimler, amino asitlerden oluşan ve üç boyutlu yapıları sayesinde biyolojik reaksiyonları katalizleyen protein yapılı biyomoleküllerdir. Bu moleküllerin katalitik etkinliği, amino asit dizilimi ile şekillenen yapısal özelliklerine bağlıdır. Enzimler, belirli substratlara yüksek özgüllük göstererek onları ürünlere dönüştürür ve bu süreçte reaksiyon hızını önemli ölçüde artırırken kendileri tüketilmezler (Bisswanger, 2017).

Enzimlerin en önemli özelliklerinden biri, yüksek seçicilikleri sayesinde istenmeyen yan ürün oluşumunu en aza indirmeleri ve nispeten düşük sıcaklık ile nötr pH gibi ılımlı koşullarda etkinlik gösterebilmeleridir. Bu özellikleri, enzimleri kimyasal katalizörlere kıyasla çevresel açıdan daha sürdürülebilir ve enerji verimli biyokatalizörler hâline getirmektedir. Ayrıca aktif bölgelerinin yalnızca belirli yapısal özelliklere sahip substratlarla etkileşime girmesi, enzimlerin yüksek özgüllükle çalışmasını sağlayan temel faktörlerden biridir (Sheldon & Woodley, 2018; Bornscheuer, 2021).

Son yıllarda biyokataliz alanındaki gelişmeler, enzimlerin ilaç endüstrisindeki kullanımını önemli ölçüde artırmış olup, özellikle kiral bileşiklerin ve optik saflığı yüksek ilaç ara ürünlerinin sentezinde enzimatik süreçler ön plana çıkmıştır (Bornscheuer ve Kazlauskas., 2006; Pollard ve Woodley., 2007). Biyoteknoloji alanında kaydedilen ilerlemeler, yüksek seçicilik ve verim sağlayan enzim tabanlı üretim yöntemlerinin geliştirilmesine olanak tanıyarak ilaç üretim süreçlerinin daha sürdürülebilir ve ekonomik hale gelmesini desteklemiştir (Illanes., 2015; Singh vd., 2019). Enzimlerin en önemli özelliklerinden biri, kimyasal reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyon hızını artırmaları, ancak reaksiyonun denge sabitini veya ürün-substrat dengesini değiştirmemeleridir. Ayrıca enzimler reaksiyon sonunda kimyasal yapılarında kalıcı bir değişikliğe uğramadan tekrar kullanılabilir biyolojik katalizörler olarak görev yaparlar (Nelson ve Cox., 2022).

Enzimler, canlı organizmalarda sentezlenen ve büyük çoğunluğu protein yapısında bulunan, bazı durumlarda ise katalitik RNA (ribozim) formunda görev yapan biyolojik katalizörlerdir. Hücresel metabolizmanın sürdürülebilmesi için gerekli olan sindirim, enerji metabolizması, DNA replikasyonu, gen ekspresyonu ve hücreler arası sinyal iletimi gibi birçok biyokimyasal olayın gerçekleşmesinde temel rol oynarlar (Son vd., 2023). Enzimler, reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürerek kimyasal dönüşümlerin daha hızlı ve kontrollü gerçekleşmesini sağlar. Bu katalitik etkinlik, enzimlerin aktif bölgelerinin belirli substratlara yüksek özgüllük göstermesi ve enzim-substrat kompleksini oluşturarak reaksiyonun seçici biçimde ilerlemesine olanak tanınması sayesinde gerçekleşir. Bazı enzimler ise yapısal esneklikleri sayesinde benzer kimyasal özelliklere sahip farklı substratları da katalizleyebilir (Sujitha ve Shanthi., 2023). Reaksiyon sonunda enzimler yapısal bütünlüklerini koruyarak yeniden kullanılabilir ve çoğunlukla çevre dostu, biyolojik olarak parçalanabilir ürünlerin oluşumuna katkı sağlar. Yüksek seçicilikleri, verimli katalitik özellikleri ve çevresel sürdürülebilirliğe sağladıkları avantajlar nedeniyle enzimler günümüzde biyoteknoloji, ilaç geliştirme, gıda endüstrisi, çevresel biyoremediasyon ve biyokimyasal üretim süreçlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca protein mühendisliği ve yapay zekâ destekli enzim tasarımı alanındaki son gelişmeler, enzimlerin kararlılığını, substrat özgüllüğünü ve endüstriyel uygulama potansiyelini önemli ölçüde artırmıştır (Buller vd., 2023).

Enzimler, genel olarak katalizledikleri substratın adına "-az" (-ase) eki eklenerek adlandırılmaktadır. Örneğin, izomerler üzerinde etki gösteren enzimler izomeraz olarak isimlendirilir. Bunun yanı sıra birçok enzim, gerçekleştirdiği biyokimyasal reaksiyonun niteliğine göre de adlandırılmaktadır. Örneğin, dehidrojenaz enzimleri çeşitli substratlardan hidrojen atomlarının uzaklaştırılmasını katalizleyen enzim grubunu ifade eder. Bununla birlikte, pepsin, tripsin ve kimotripsin gibi bazı enzimler tarihsel nedenlerle bu genel adlandırma kurallarının dışında yer almaktadır. Enzimlerin uluslararası düzeyde standart biçimde tanımlanabilmesi amacıyla Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (International Union of Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB), her enzime özgü bir Enzim Komisyonu (EC) numarası vermiş ve enzimleri katalizledikleri reaksiyon tipine göre yedi temel sınıfta toplamıştır (McDonald vd., 2023).

Bu sınıflandırma sistemi, enzimlerin bilimsel olarak tanımlanmasında ve literatürde ortak bir terminolojinin kullanılmasında temel referans niteliğindedir. Uluslararası sınıflandırmanın yedi ana grubu şunlardır (McDonald & Tipton, 2023):

1. Oksidoredüktazlar, oksidasyonları ve redüksiyonları katalize etmektedirler. Koenzimlerle ilişkilidirler ve dehidrogenazlar, oksidazlar, peroksidazlar ve oksijenazları içerirler.

2. Transferazlar, amin, karboksil, karbonil, metil, açıl, glikozil ve fosforil gibi bir grup atomun bir molekülden diğerine transferini katalizleyen gruptur.

3. Hidrolazlar, su ilavesiyle C—O, C—N, C—S ve O—P bağlarının hidrolizini katalizleyen sınıftır.

4. Liyazlar, hidrolizden farklı bir prosesle bir substrattaki C—C, C—S ve C—N bağlarının (peptit bağları hariç) kopmasını katalizler. Bazıları substrattan grupları uzaklaştırarak çift bağlar ya da döngüler oluşturur, bazıları ise çift bağlara gruplar ekler.

5. İzomerazlar, herhangi bir türdeki (optik, geometrik veya pozisyonel) bir izomerin diğerine dönüşümünü katalizler.

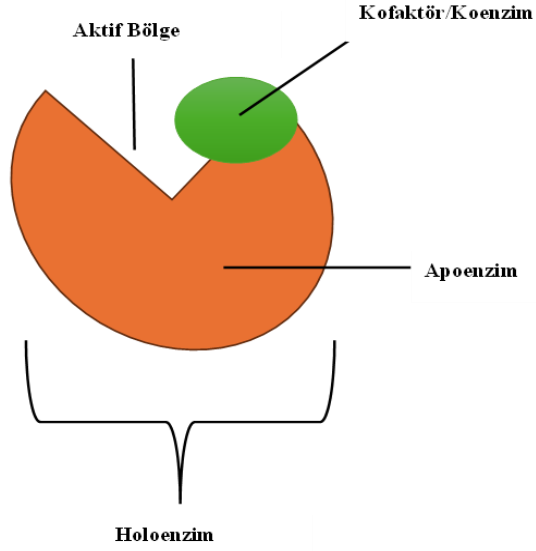
6. Ligazlar, iki molekülü kovalent bağlarla birleştirir.

7. Translokazlar, iyonların veya moleküllerin zarlar boyunca hareketini ya da zarlar içinde ayrılmasını katalizleyen gruptur.

2.1.2. Enzimlerin kimyasal yapısı

Enzimler, biyolojik sistemlerde kimyasal reaksiyonların hızını artıran ve çoğunlukla proteinlerden meydana gelen katalitik moleküllerdir. Bazı enzimler yalnızca amino asitlerden oluşan basit protein yapısına sahipken, bazıları katalitik etkinlik kazanabilmek için protein dışı yardımcı bileşenlere ihtiyaç duyar. Bu yardımcı bileşenler metal iyonları veya organik moleküller şeklinde olabilir ve sırasıyla kofaktör ya da koenzim olarak adlandırılır. Kofaktörün bağlı olmadığı protein kısmı apoenzim olarak tanımlanırken, apoenzim ile gerekli yardımcı bileşenin birleşmesi sonucunda aktif katalitik form olan holoenzim (şekil 2.1) oluşur (Voet vd., 2016).

Enzimler tek bir polipeptit zincirinden oluşabileceği gibi, birden fazla alt birimin birleşmesiyle oluşan daha karmaşık oligomerik yapılar da gösterebilir. Ayrıca aynı biyokimyasal reaksiyonu katalizleyen ancak moleküler yapı, kinetik özellik veya doku dağılımı açısından farklılık gösteren enzim formları izoenzimler olarak adlandırılır. Bazı RNA moleküllerinin de katalitik aktivite gösterebilmesi, biyolojik katalizin yalnızca proteinlerle sınırlı olmadığını göstermektedir (McKee ve McKee, 2020).

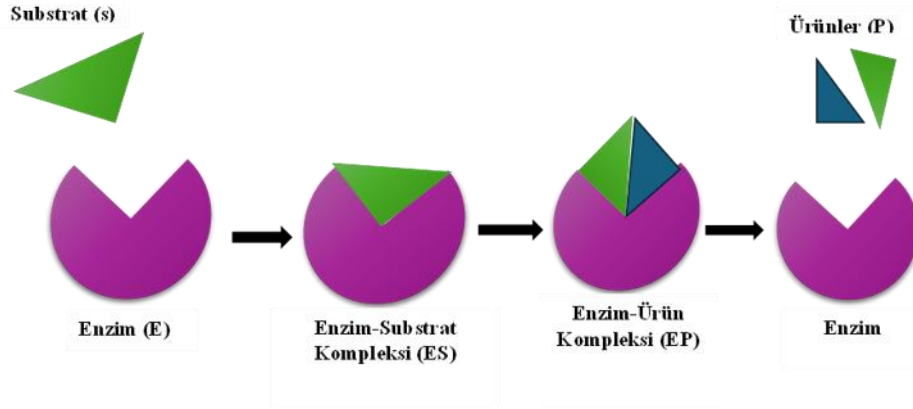


Şekil 2.1. Enzimlerin kimyasal yapısı

2.1.3 Enzimlerin katalizasyonu

Enzimatik kataliz, biyolojik moleküller olan enzimlerin kimyasal reaksiyonların gerçekleşme hızını artırması temeline dayanan bir süreçtir. Enzimler, reaksiyon sırasında substrat molekülleri ile özgül etkileşimler kurarak aktivasyon enerjisini azaltır ve reaksiyonların fizyolojik koşullarda daha hızlı gerçekleşmesini sağlar. Bununla birlikte enzimler, katalizör özelliklerinden dolayı reaksiyonun başlangıç ve son durumları arasındaki enerji farkını veya kimyasal dengeyi değiştirmez (Voet vd., 2016).

Enzimatik reaksiyonların ilk aşamasında substrat, enzimin aktif bölgesine bağlanarak geçici bir enzim-substrat kompleksi oluşturur. Bu kompleks oluşumu, substratın doğru yönlendirilmesini ve kimyasal dönüşüm için uygun konuma getirilmesini sağlayarak ürün oluşumunu kolaylaştırır. Reaksiyon sonucunda meydana gelen ürün enzimin aktif bölgesinden ayrılır (şekil 2.2) ve enzim yeni substrat moleküllerini katalizlemek üzere tekrar kullanılabilir (Punekar., 2018).



Şekil 2.2. Enzimlerin katalizasyonunun gösterimi

Enzimlerin yüksek katalitik etkinliği, aktif bölgelerinin üç boyutlu yapısından ve substrat moleküllerine karşı gösterdikleri yüksek özgüllükten kaynaklanmaktadır. Aktif bölge, substratın bağlandığı ve kimyasal dönüşümün gerçekleştiği enzime özgü yapısal bir bölgedir. Bu bölgede bulunan amino asit kalıntıları, hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler, hidrofobik kuvvetler ve kovalent etkileşimler aracılığıyla substratın bağlanmasını ve reaksiyon mekanizmasının ilerlemesini sağlar (Petrović vd., 2018).

Ayrıca enzimlerin katalitik özellikleri, aktif bölgede bulunan amino asit yan zincirlerinin konumuna ve reaksiyon sırasında oluşturdukları kimyasal etkileşimlere bağlıdır. Bu nedenle enzim fonksiyonu, yalnızca amino asit dizisiyle değil, aynı zamanda proteinin sahip olduğu özgül üç boyutlu konformasyon ile de doğrudan ilişkilidir (McDonald ve Tipton, 2021).

2.1.4. Enzim kinetiği

Enzim kinetiği, enzimlerin biyokimyasal reaksiyonları hangi hızda gerçekleştirdiğini ve bu hızın substrat derişimi, sıcaklık, pH ve inhibitörler gibi etkenlerden nasıl etkilendiğini inceleyen bir biyokimya alanıdır. Enzim katalizli reaksiyonlarda başlangıç hızı, substrat miktarı arttıkça belirli bir seviyeye kadar yükselir ve enzimin aktif bölgeleri tamamen dolduğunda maksimum reaksiyon hızına (V_{max}) ulaşır. Bu davranış, Michaelis–Menten modeli ile açıklanır ve modelde $v = (V_{max} \times [S]) / (K_m + [S])$ denklemi kullanılır. Burada v reaksiyon hızını, $[S]$ substrat derişimini, V_{max} maksimum reaksiyon hızını ve K_m ise reaksiyon hızının V_{max} 'ın yarısına ulaştığı substrat derişimini ifade eder. K_m değerinin düşük olması enzimin substrata olan ilgisinin (afinitesinin) yüksek olduğunu gösterirken, yüksek K_m değeri daha düşük afiniteyi ifade eder (Srinivasan, 2022).

Michaelis–Menten denklemi enzim kinetiğinin temelini oluşturmaya rağmen, eğrisel yapısı nedeniyle kinetik parametrelerin deneysel olarak belirlenmesi bazen güç olabilir. Bu nedenle Lineweaver ve Burk tarafından geliştirilen çift ters (double reciprocal) grafik yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde Michaelis–Menten denkleminin her iki tarafının tersi alınarak doğrusal bir denklem elde edilir ve grafikte $1/v$ y eksenine, $1/[S]$ ise x eksenine yerleştirilir. Doğrunun y eksenini kesim noktası $1/V_{max}$, x eksenini kesim noktası ise $-1/K_m$ değerini verir. Böylece V_{max} ve K_m değerleri daha kolay hesaplanabilir; ayrıca farklı inhibitör tiplerinin enzim üzerindeki etkileri de grafik üzerinde karşılaştırılabilir (Jakubowski vd., 2024).

Günümüzde enzim kinetiği çalışmalarında bilgisayar destekli doğrusal olmayan regresyon analizleri daha doğru sonuçlar verdiği için Lineweaver–Burk grafiğinin kullanım sıklığı azalmış olsa da, bu grafik eğitim ve temel biyokimya araştırmalarında önemini korumaktadır. Özellikle inhibitörlerin enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini yorumlamada ve K_m ile V_{max} değişimlerini görsel olarak değerlendirmede Lineweaver–Burk yaklaşımı hâlâ yaygın olarak kullanılmaktadır. Michaelis–Menten modeli ile birlikte değerlendirildiğinde bu iki yöntem, enzimlerin katalitik özelliklerinin anlaşılmasını kolaylaştırmakta ve ilaç geliştirme, klinik biyokimya ile biyoteknoloji gibi birçok alanda önemli bilgiler sağlamaktadır (Bisswanger, 2017).

2.1.5. Enzim immobilizasyonu

Enzimler, yüksek katalitik etkinlikleri, reaksiyonlara seçicilik kazandırmaları ve çevre dostu biyokatalizörler olmaları nedeniyle gıda, ilaç, çevre ve biyoteknoloji başta olmak üzere birçok endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, serbest enzimlerin endüstriyel uygulamalarda kullanımını sınırlandıran çeşitli dezavantajlar bulunmaktadır. Enzimlerin katalitik performansı; sıcaklık, pH, iyonik güç ve reaksiyon ortamının bileşimi gibi çevresel faktörlerden önemli ölçüde etkilenmektedir. Optimum çalışma koşullarının dışına çıkılması durumunda enzim aktivitesinde azalma meydana gelebilmekte, ileri düzeyde ise enzimin yapısal bütünlüğü bozularak geri dönüşümsüz inaktivasyon gerçekleşebilmektedir (Sirisha vd., 2016; Robescu ve Bavaro, 2025). Bunun yanı sıra serbest enzimler, reaksiyon ortamından kolaylıkla geri kazanılamadıkları için çoğunlukla tek kullanım ile sınırlı kalmakta ve bu durum özellikle büyük ölçekli üretim proseslerinde maliyetleri artırmaktadır. Ürün ile enzimin birbirinden ayrılmasının güç olması hem saflaştırma basamaklarını zorlaştırmakta hem de proses verimliliğini olumsuz etkileyebilmektedir. Bu nedenlerle son yıllarda enzim immobilizasyonu, enzimlerin operasyonel kararlılığını artırmak, tekrar kullanılabilirliğini

sağlamak ve üretim maliyetlerini azaltmak amacıyla en etkili stratejilerden biri olarak öne çıkmaktadır. Geliştirilen yeni immobilizasyon teknikleri ve fonksiyonel taşıyıcı materyaller sayesinde enzimlerin fizikokimyasal dayanıklılığı artırılmakta, daha uzun süre aktif kalmaları sağlanmakta ve endüstriyel biyoproseslerde kullanım potansiyelleri önemli ölçüde geliştirilmektedir (Maghraby vd., 2023; Mohidem vd., 2023; Robescu ve Bavaro, 2025).

Enzim immobilizasyonu, serbest enzimlerin endüstriyel uygulamalarda karşılaşılan düşük kararlılık, tek kullanımlık olma ve proses sonunda geri kazanılamama gibi dezavantajlarını azaltmak amacıyla geliştirilen etkili bir biyoteknolojik yaklaşımdır. Bu yöntemde enzimler; polimerler, silika bazlı malzemeler, MNP'ler veya farklı biyomalzemeler gibi katı destek yüzeylerine bağlanarak daha kontrollü bir mikroçevrede çalışmaları sağlanır. Destek materyali ile enzim arasındaki etkileşim, enzimin üç boyutlu yapısının korunmasına katkıda bulunur ve böylece sıcaklık, pH değişimleri ve organik çözücüler gibi çevresel stres faktörlerine karşı daha yüksek direnç kazanmasına olanak tanır. Sonuç olarak enzimlerin depolama ömrü uzamakta ve daha geniş proses koşullarında katalitik aktivitelerini sürdürebilmeleri mümkün olmaktadır (Bilal vd., 2022; Xu vd., 2020).

İmmobilizasyonun sağladığı en önemli avantajlardan biri, enzimin reaksiyon sonrasında ortamdan kolaylıkla ayrılarak tekrar kullanılabilmesidir. Serbest enzimlerin aksine immobilize enzimler, çok sayıda reaksiyon döngüsünde önemli ölçüde aktivite kaybı yaşamadan kullanılabilirdiğinden işletme maliyetlerinin azaltılmasına katkı sağlar. Bunun yanında immobilizasyon, enzimin yapısal bütünlüğünü koruyarak daha yüksek substrat derişimleri, daha uzun reaksiyon süreleri ve nispeten daha sert çalışma koşullarının uygulanmasına olanak tanır. Bu özellikler özellikle sürekli üretim sistemlerinde ve biyokatalitik proseslerde verimliliğin artırılmasına önemli katkılar sağlamaktadır (Sheldon ve Brady, 2022; Sousa vd., 2025).

İmmobilize enzim sistemleri, reaksiyon kinetiğinin daha iyi kontrol edilmesine ve ürün saflaştırma basamaklarının kolaylaştırılmasına da önemli ölçüde katkı sağlamaktadır. Enzimin katı faz üzerinde tutulması sayesinde ürün fazından ayrılması daha kolay gerçekleşmekte, böylece enzim kaynaklı kontaminasyon riski azalırken ürün saflığı artırılmaktadır. Ayrıca uygun taşıyıcı seçimi ve immobilizasyon yönteminin optimize edilmesiyle kütle transferi sınırlamaları azaltılabilmekte, katalitik performans ve proses sürdürülebilirliği iyileştirilebilmektedir. Bu nedenlerle immobilize enzim teknolojileri; gıda, ilaç, biyoyakıt, çevre ve ince kimyasalların üretimi gibi birçok alanda yüksek verimlilik sağlayan sürdürülebilir

biyokatalitik platformlar olarak değerlendirilmektedir (Cavalcante, 2021; Khan ve Alzohairy., 2010).

Aşağıdaki tablo 2.1’de yaygın olarak gözlemlenen immobilize edilmiş bir biyokatalizörün kullanımıyla ilgili gözlemlenen avantajlar ve dezavantajları göstermektedir.

Tablo 2.1. Enzim immobilizasyonunda avantaj ve dezavantajlar

Avantajlar	Dezavantajlar
Enzimin yeniden kullanılabilirliği	Kolay olamayan ve zaman alıcı immobilizasyon süreçleri
Enzimin üründen kolay ayrılması	Kütle transfer sınırlamaları
Sürekli proseslerde kullanım özelliği	Taşıyıcı ve ek hazırlık malzemeleri maliyeti
Daha geniş çalışma koşulları aralığında (sıcaklık, pH gibi) gelişmiş stabilite	Enzim aktivitesinin kaybı

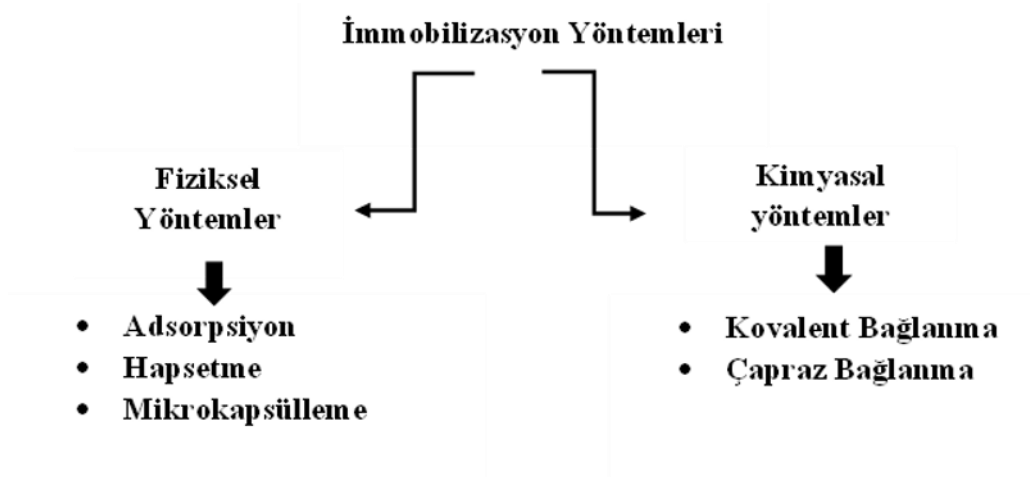
Enzim immobilizasyonunda uygulanacak yöntemin seçimi, biyokatalizörün performansını doğrudan etkileyen en önemli aşamalardan biridir. Kullanılan yonteme bağı olarak enzimin yapısal özellikleri, aktivitesi ve çalışma koşullarına verdiği yanıt değişebilmektedir. Bu nedenle tüm enzimler ve uygulamalar için geçerli tek bir immobilizasyon yaklaşımından söz etmek mümkün değildir. En uygun yöntemin belirlenmesinde enzimin yapısı, kullanılacak substrat, reaksiyon ortamı ve hedeflenen proses koşulları birlikte değerlendirilmelidir (Mohamad vd., 2015).

İmmobilizasyon teknikleri, serbest enzimlerin kullanımında karşılaşılan düşük stabilite, aktivite kaybı ve yeniden kullanım güçlüğü gibi sınırlamaların azaltılmasına katkı sağlar. Destek materyaline immobilize edilen enzimler, daha uzun süre aktif kalabilir ve reaksiyon sonunda ortamdaki kolaylıkla ayrılarak tekrar kullanılabilir. Bunun yanında ürün saflaştırma süreçlerinin kolaylaşması, depolama dayanıklılığının artması ve biyokatalizörün tekrar kullanılabilmesi sayesinde hem çevresel etkiler azalmakta hem de proses maliyetleri önemli ölçüde düşmektedir (Sirisha vd., 2016).

İmmobilizasyon sırasında meydana gelen değişikliklerin niteliği, tercih edilen tekniğe göre farklılık gösterir. Adsorpsiyon, kapsülleme ve hapsedilme gibi fiziksel yöntemlerde

enzimin kimyasal yapısı büyük ölçüde korunurken, kovalent bağlanma ve çapraz bağlama gibi yöntemlerde protein molekülünde kimyasal değişimler meydana gelebilir. Bu nedenle uygun immobilizasyon stratejisinin belirlenmesinde enzimin moleküler büyüklüğü, izoelektrik noktası, yüzeyde bulunan fonksiyonel gruplar, hidrofilik ve hidrofobik bölgeleri ile substrat ve ürünlerin kütle transfer gereksinimleri dikkate alınmalıdır (Mohidem vd., 2023).

2.1.5.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri



Şekil 2.3. Enzim immobilizasyon yöntemleri

I. Fiziksel Yöntemler

Fiziksel yöntemler, enzim immobilizasyonunda en yaygın kullanılan taşıyıcı bağlama yöntemlerinden biridir. Bu yöntemde enzimler, hidrofobik organik veya inorganik bir taşıyıcının yüzeyine herhangi bir kimyasal bağ oluşturulmaksızın zayıf moleküller arası etkileşimler aracılığıyla bağlanmaktadır. (Silva Almeida vd.,2024).

Adsorpsiyon:

Adsorpsiyon yöntemi, uygulama basamaklarının kolay olması, kimyasal bağlayıcı maddelere gereksinim duyulmaması ve uygun taşıyıcıların kullanılması durumunda düşük maliyet gibi avantajları olması nedeniyle tercih edilmektedir. Ayrıca immobilizasyon işlemi sırasında enzimin üç boyutlu yapısında önemli bir değişiklik meydana gelmediğinden, enzimin biyolojik aktivitesinin büyük ölçüde korunabilmesi de avantajlar arasında yer almaktadır (Patti vd., 2024). Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağların zayıf olması nedeniyle ortam koşullarındaki pH, iyonik şiddet veya sıcaklık değişimleri enzimin taşıyıcıdan ayrılmasına neden olup sızıntılara sebebiyet verebilmektedir. Bu nedenle yüksek immobilizasyon verimi ve enzim aktivitesinin korunması için pH, sıcaklık, enzim derişimi, taşıyıcı miktarı ve ortamın

iyonik şiddeti gibi işlem parametrelerinin dikkatle optimize edilmesi gerekmektedir. Bu zayıf bağlar nedeniyle enzimin adsorpsiyonu; sıcaklık, pH, iyonik kuvvetlerdeki değişikliklerle ve ortamda sadece substrat varlığı gibi istenmeyen sonuçlar doğurabilmektedir. Ayrıca bu yöntemde bir diğer dezavantaj da immobilize enzimin özelliklerinin değişmesine, aktivasyonunun düşmesine sebep olabilecek olan ortamda bulunan diğer proteinlerin veya maddelerin de taşıyıcı üzerine adsorplanabiliyor oluşudur. (Cavalcante vd., 2024).

Hapsetme/Tutuklama:

Tutuklama, enzimin fiziksel olarak bir polimer yapısının oluşturduğu gözenekli ortam içerisinde tutulması veya yarı geçirgen özellik gösteren bir membranla çevrelenmesi esasına dayanan bir immobilizasyon yaklaşımıdır. Kafes tipi tutuklamada enzim molekülleri, çapraz bağlanma sonucunda suda çözünmeyen hâle getirilen polimerik yapının oluşturduğu gözeneklerde tutulur. Böylece enzim, doğrudan polimer yapısına bağlanmak yerine jel matrisi içerisinde fiziksel olarak sınırlandırılmış olur. Bu yaklaşımın ilk örneklerinden biri Bernfeld ve ark. tarafından gerçekleştirilmiş; tripsin, papain, amilaz ve ribonükleaz gibi farklı enzimler poliakrilamid jel içerisinde immobilize edilmiştir (Khan., 2021).

Tutuklama tekniğinin öne çıkan özelliklerinden biri, yalnızca saf enzimlerin değil, farklı enzim sistemlerinin yanı sıra organel ve hücrelerin de benzer bir işlem basamağı kullanılarak immobilize edilebilmesidir. Bununla birlikte, biyokatalizörün kimyasal yapısında önemli bir değişikliğe yol açmaması yöntemin diğer önemli avantajlarından biridir. Ayrıca yüksek molekül ağırlığına sahip enzim inhibitörlerinin biyokatalizöre ulaşmasının sınırlandırılması, inhibitör kaynaklı olumsuz etkilerin azaltılmasına katkı sağlayabilir. Buna karşılık, özellikle büyük moleküllü substratların jel içerisindeki enzime ulaşmasının güçleşmesi ve kullanılan taşıyıcı materyalin işlem sonrasında kolaylıkla geri kazanılamaması yöntemin başlıca sınırlılıkları arasında yer almaktadır. Ultrafiltrasyon membranlarının kullanılmasıyla bazı geri kazanım problemleri azaltılabilse de bu uygulamada enzimin yeterli düzeyde aktive edilememesi veya enzim moleküllerinin membran yüzeyine adsorplanması gibi sorunlar ortaya çıkabilmektedir. Bu durum, enzimin reaksiyon ortamına geçişini ve dolayısıyla reaksiyon verimini olumsuz etkileyebilir (Patti vd., 2025).

Jel içerisinde tutuklama işleminde, enzimin immobilizasyonu suda çözünmeyen bir polimer jel ağının meydana getirilmesiyle sağlanmaktadır. Bu amaçla akrilamid gibi monomerlerden veya kolojen, jelatin ve kalsiyum aljinat gibi oligomerik ya da polimerik materyallerden yararlanılabilmektedir. İşlem sırasında ortamın sıcaklığı, pH değeri ve iyonik

kuvveti gibi koşulların değiştirilmesiyle polimerizasyon ve çapraz bağlanma gerçekleşmekte, bunun sonucunda enzim moleküllerini fiziksel olarak içerisinde barındıran jel yapı oluşmaktadır. Bununla birlikte, kullanılan bazı monomerlerin toksik özellik taşıması ve endüstriyel reaktörlerde meydana gelebilen yüksek basınç düşüşleri, jel tutuklama yönteminin büyük ölçekli uygulamalardaki kullanımını sınırlandıran faktörlerdir (Chalella Mazzocato ve Jacquier, 2024).

Fiber tutuklama yaklaşımında ise enzim, selüloz ve triasetat gibi polimerlerin fiber şeklindeki yapıları içerisine fiziksel olarak immobilize edilmektedir. Fiber materyallerin zayıf asidik ve alkali koşullara karşı dayanıklı olmaları ve yüksek iyonik kuvvet altında özelliklerini büyük ölçüde koruyabilmeleri yönetime çeşitli avantajlar kazandırmaktadır. Bununla birlikte, düşük molekül ağırlığına sahip substratların kullanıldığı reaksiyonlarda yöntemin uygulanabilirliği sınırlı olabilmektedir. Ayrıca polimerin çözündürülmesi amacıyla suda çözünmeyen sıvıların tercih edilmesi, işlem sırasında enzimin yapısal bütünlüğünü bozarak aktivite kaybına yol açabilmektedir (de Castro vd., 2026).

Mikrokapsülleme:

Mikrokapsülleme, enzimlerin yarı geçirgen özellik gösteren polimerik bir membran yapı içerisinde hapsedilerek immobilize edilmesine dayanan bir yöntemdir. Bu teknik, enzimin substrat ile etkileşimini artırabilecek geniş bir yüzey alanı oluşturması ve farklı özelliklere sahip birden fazla enzimin benzer işlem basamakları kullanılarak immobilize edilebilmesi açısından önemli avantajlar sunmaktadır. Bununla birlikte, yöntemin yüksek moleküler ağırlığa sahip substratlar için uygun olmaması, immobilizasyon sırasında enzimin aktivitesini kaybedebilmesi ve bazı durumlarda membran yüzeyine tutunarak mikrokapsüllerden sızabilmesi başlıca dezavantajları arasında yer almaktadır. (Silva Lopes vd., 2025).

Son yıllarda nanoteknoloji alanındaki gelişmeler mikrokapsülleme yönteminin performansını önemli ölçüde artırmıştır. Nano-kompozit kapsüller, manyetik mikrokapsüller ve uyarılara duyarlı akıllı polimer sistemleri kullanılarak enzimlerin aktivitesi, seçiciliği ve geri kazanılabilirliği geliştirilmektedir (Hanafeld vd., 2009). Özellikle manyetik nanoparçacık içeren mikrokapsüller, dış manyetik alan yardımıyla reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrılabilmekte ve sürekli üretim sistemlerinde etkin şekilde kullanılabilir. Bu gelişmeler, mikrokapsülleme yönteminin endüstriyel biyokataliz uygulamalarındaki önemini daha da artırmaktadır. Kütle transferi sınırlamaları ve mekanik dayanıklılık gibi bazı dezavantajlara sahip olsa da uygun kapsül materyali ve üretim yönteminin seçilmesiyle bu sorunlar büyük

ölçüde azaltılabilmektedir. Günümüzde sürdürülebilir biyoproseslerin geliştirilmesinde ve yüksek verimli biyokatalitik sistemlerin tasarlanmasında mikrokapsülleme yönteminin önemi giderek artmaktadır (Basso ve Serban, 2019; Datta vd., 2013).

II. Kimyasal Yöntemler

Bu yöntemler, enzimlerin kovalent bağlar kullanarak farklı matrislere bağlanmasını içeren ve tüm bu işlemlerin geri döndürülemediği yöntemlerdir.

Kovalent Bağlama

Kovalent bağlanma, enzimlerin immobilizasyonu için geleneksel bir yöntemdir. Bu modda, destek malzemeleri ile enzimlerin yan zincir amino asitleri (örneğin lizin, sistein veya aspartik ve glutamik asit kalıntıları) arasında kimyasal reaksiyonlar yoluyla kovalent bağlar oluşur. Ayrıca, amino, karboksilik, imidazol, indolil ve fenolik hidroksil gruplarının fonksiyonel grupları kovalent bağların oluşumu için uygundur. Kovalent bağlar, destek matrislerinden enzimlerin sızmasını önlemek için stabildir, böylece immobilize edilmiş enzimlerin kararlılığını artırır. Ancak, enzimin aktif bölgeleri, enzim molekülleri ile destek matrisleri arasındaki kimyasal reaksiyonlar nedeniyle inaktive olabilir ve bu da katalitik aktivitelerde azalmaya yol açabilmektedir (Datta vd., 2013).

Bu yöntem, destek üzerindeki fonksiyonel grupların önceki aktivasyonu ile birleşerek biyokatalizör gruplarıyla (örneğin $-NH$) reaksiyon için daha güçlü elektrofilik bir reaktif oluşturarak gerçekleşen yöntemdir (lizin veya argininden, $-COOH$ aspartik ve glutamik asitten, $-OH$ serin ve treoninden ve $-SH$ sisteinden gelir). Böylelikle enzim matris üzerine sıkıca sabitlenir, sızıntı azalır ve ürün enzimle kontamine olmaz. Kovalent immobilizasyon, peptit bağ, diazotizasyon, amino bağ, tiol-disülfid, amidasyon reaksiyonu ve alkilasyon gibi çeşitli reaksiyon prosedürlerini de içerir. Kataliz sırasında sıkı bağlanma nedeniyle destekten enzim sızıntısı az olmasıyla ve genellikle sistemin stabilitesini artırmasıyla avantajlı bir yöntemdir (Rodríguez-Restrepo ve Orrego., 2020).

Çapraz Bağlama

Çapraz bağlama, iki veya daha fazla molekülün kovalent bağ yoluyla birleştirilmesinin bir kimyasal sürecidir. Çapraz bağlı enzim agregaları, enzim immobilizasyonu için çok yönlü bir yaklaşımdır. Bu yaklaşım genellikle yüzey modifikasyonu veya aktivasyon süreciyle birlikte yapılır. Silanizasyon veya yüzeyin organik fonksiyonel gruplarla organik fonksiyonel gruplarla

kaplanması, inorganik desteklerin ilk yüzey modifikasyonu için sıkça kullanılan bir tekniktir (Mohidem vd., 2023).

Kaplama veya doğal yüzey amino grupları gibi p-nitrobenzoil klorür kullanımı, arylamin gruplarına veya aldehit gruplarına türevlenebilir. Bu işlem kolaydır; sulu bir tampondan çökeltme yapılır, ardından enzim moleküllerinin ortaya çıkan fiziksel agregalarının çapraz bağlanmasını içerir ve bu hızlıca optimize edilebilir. Çapraz bağlama yoluyla ortaya çıkan immobilize edilmiş enzim, biyokatalizör olarak stabil ve işlevseldir. (Chen vd., 2023).

Çapraz bağlanma işlemlerinde yaygın olarak glutaraldehit (GA) ve toluen diizosiyanat gibi ajanlardan yararlanılmaktadır. Bununla birlikte, bu yöntem immobilizasyon işleminin nispeten sert koşullar altında gerçekleştirilmesi nedeniyle kontrol edilmesinde bazı güçlükler ortaya çıkarabilmektedir. Söz konusu koşullar, enzimin aktif bölgesinde yapısal veya konformasyonel değişikliklere neden olarak enzim aktivitesinde belirgin bir azalmaya yol açabilmektedir. Ayrıca, çapraz bağlanma yoluyla elde edilen taşıyıcıların genellikle jel benzeri bir yapıya sahip olması, bu immobilizasyon tekniğinin farklı uygulama alanlarında kullanımını kısıtlayabilen bir diğer önemli faktördür. (Sheldon vd., 2005).

Tüm bu yöntemler uygulanırken doğru destek materyal seçimi, immobilize edilmiş bir enzimin endüstriyel uygulamalarının tüm uygulanabilirliğini büyük ölçüde etkiler. Seçilen destek, immobilizasyona uygun olmak için bazı kritik gereksinimleri karşılamalıdır. Bunlar sırasıyla;

- Destek nispeten ucuz ve çevresel zararsız olmalı, böylece sürecin ekonomik etkisi en aza indirilmelidir.
- Destek, birim ağırlık başına önemli miktarda enzim yükleyebilecek olmalıdır. Buna göre, gözeneklilik faydalı bir özellik olabilir, ancak gözeneklerin çapı uygun bir aralıkta (ortalama protein çapından daha geniş) kalmalıdır, çünkü küçük gözenekler sadece proteini dışlar, çok büyük gözenekler ise yüzey alanında önemli bir düşüşe yol açar. Her iki durumda da yükleme kapasitesi olumsuz etkilenir. Yüksek yüzey alanı ve doğru parçacık boyutu da dikkate alınmalıdır (Hartman ve Kostrov, 2013).
- Yüzeyin hidrofobisitesi genellikle en aza indirilmelidir, çünkü istenmeyen protein adsorpsiyonu ve denatürasyonu destekler. Zıt davranışlar yalnızca lipazlar gibi bilinen hidrofobik enzimler için tanımlanmıştır. Genel olarak, destek immobilize edilmiş enzimlerin katalitik özelliklerini artırmak için optimal mikro-ortamı sunmalıdır (Sörensen vd., 2010).

- Fonksiyonelleşme ve aktivasyon, destek yüzeyinde reaktif kimyasal işlevler gerektirir. Bu gruplar minimal sterik engel (özellikle çok noktalı bağlantı için) ve yüksek yüzeysel yoğunluk sağlamalıdır (Mateo vd., 2007).
- İmmobilizasyondan sonra, destek enzimatik operasyonel koşullarda tamamen hareketsiz olmalı ve istenen reaksiyona müdahale etmemelidir.
- Spesifik olmayan protein/destek etkileşimlerinin (yani adsorpsiyon, iyon değişimi) tarafından yapılan girişimler, özellikle istenen çok fonksiyonlu immobilizasyon dışında en aza indirilmelidir (Barbosa vd., 2013).
- Ticari olarak uygulanabilir bir enzim için mikrobiyal direnç zorunludur.
- Termal ve mekanik direnç de önemlidir; bu da immobilize edilmiş enzimin farklı operasyonel koşullarda kullanılmasını sağlar. Özellikle, aşınmaya karşı direnç (parti reaktörler için) ve akış basıncı (sürekli reaktörler için) dikkate alınmalıdır (Hartman ve Kostrov, 2013).
- Kimyasal dayanıklılık da dikkate alınmalıdır. Örneğin, nötrlükten uzak pH değerleri inorganik yapıların kararlılığını önemli ölçüde etkileyebilir (Zucca ve Sajust, 2014).

2.1.5.2. Enzim immobilizasyonunda kullanılan destek materyalleri

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcı materyalin seçimi, immobilize enzimin katalitik etkinliği, kararlılığı ve yeniden kullanılabilirliği üzerinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle destek materyalinin fiziksel ve kimyasal özellikleri, biyokatalizörün endüstriyel uygulamalardaki performansını doğrudan belirleyen temel faktörlerden biridir (Wahab vd., 2020).

İdeal bir immobilizasyon desteğinin hidrofilik yapıda olması, biyoyumluluk göstermesi, mekanik dayanıklılığa sahip bulunması, mikrobiyal bozunmaya karşı dirençli olması ve ekonomik açıdan uygulanabilir olması beklenmektedir (Girelli vd., 2020; Ismail ve Baek, 2020). Bunun yanı sıra taşıyıcı materyalin immobilizasyon sonrasında kimyasal olarak inert kalması ve enzimin aktif bölgesini ya da katalitik mekanizmasını olumsuz etkilememesi gerekmektedir (Xu vd., 2020).

Taşıyıcının yüzey özellikleri, gözenek yapısı ve morfolojik karakteristikleri enzim ile doğrudan etkileşim halinde olduğundan immobilizasyon verimi ve biyokatalitik performans üzerinde belirleyici etkiye sahiptir. Yüksek enzim yükleme kapasitesi sağlayabilmesi için taşıyıcının geniş bir özgül yüzey alanına ve uygun gözenek dağılımına sahip olması önemlidir.

Gözenek çapının enzim molekülünün hidrodinamik boyutundan küçük olması enzimin taşıyıcı içerisine difüzyonunu sınırlandırırken, aşırı büyük gözenekler ise yüzey alanının azalmasına bağlı olarak bağlanabilecek enzim miktarını düşürebilmektedir. Bu nedenle optimum gözenek boyutu, yüksek yüzey alanı ve uygun parçacık boyutu, etkili bir immobilizasyon desteğinin sahip olması gereken başlıca özellikler arasında yer almaktadır (Xu vd., 2020; Wahab vd., 2020).

a) Silika Malzemeler

Silika esaslı malzemeler, sahip oldukları üstün fizikokimyasal özellikler nedeniyle enzim immobilizasyon çalışmalarında uzun süredir yaygın olarak tercih edilen inorganik destekler arasında yer almaktadır. Enzim immobilizasyonunun ilk dönemlerinde doğal polimer bazlı taşıyıcılar kullanılmış; selüloz, jelatin ve agar gibi biyouyumlu malzemeler üzerine enzimlerin bağlanması araştırılmıştır. Ancak bu doğal taşıyıcıların düşük mekanik dayanıklılık, sınırlı kimyasal stabilite ve uzun süreli kullanım koşullarında performans kaybı gibi dezavantajları, endüstriyel uygulamalardaki kullanım alanlarını kısıtlamıştır (Sheldon, 2007; Zdarta vd., 2018).

Bu sınırlamaların giderilmesi amacıyla zaman içerisinde inorganik destek materyallerine yönelik çalışmalar yoğunlaşmıştır. Silika, yüksek kimyasal ve termal kararlılığı, ayarlanabilir yüzey özellikleri, biyouyumluluğu ve geniş yüzey alanı sayesinde enzim immobilizasyonunda önemli bir taşıyıcı olarak öne çıkmıştır. Silika tabanlı yüzeylerde enzimlerin immobilizasyonu; fiziksel adsorpsiyon, kovalent bağlanma, kapsülleme ve gözenek yapısı içerisinde tutuklama gibi farklı yaklaşımlar kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntemlerin her biri immobilizasyon verimliliği, enzim aktivitesinin korunması ve taşıyıcının tekrar kullanılabilirliği açısından farklı avantaj ve sınırlamalara sahiptir (Mateo vd., 2007; Datta vd., 2013).

Son yıllarda nanoteknoloji ve ileri malzeme sentez tekniklerindeki gelişmeler, mezogözenekli silika ve nano-boyutlu silika materyallerinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Bu yeni nesil silika destekleri, geleneksel materyallere kıyasla daha yüksek spesifik yüzey alanı, düzenlenebilir gözenek çapı ve daha iyi enzim-taşıyıcı etkileşimleri sunmaktadır. Böylece enzimlerin daha etkin şekilde immobilize edilmesi, yapısal stabilitelerinin artırılması ve biyokatalitik süreçlerde daha uzun süre aktif kalmaları mümkün hale gelmektedir (Hartmann, 2005).

b) Doğal Malzemeler

Yapay olmayan (doğal) malzemelerin en önemli avantajları; doğada yaygın olarak bulunmaları, düşük maliyetle temin edilebilmeleri ve biyolojik sistemlerle uyumlu özellik göstermeleridir. Karmaşık sentez veya ileri düzey modifikasyon işlemlerine ihtiyaç duymadan kullanılabilmesi, bu malzemeleri ekonomik ve pratik immobilizasyon platformları hâline getirmektedir. Enzim immobilizasyonunda taşıyıcı materyal olarak tercih edilen doğal kaynaklı malzemeler arasında özellikle kil mineralleri ve bazı karbon temelli yapılar yer almaktadır. Bentonit, halloysit, kaolinit, montmorillonit ve sepiyolit gibi kil mineralleri, sahip oldukları geniş yüzey alanı, farklı gözenek yapıları ve yüksek adsorpsiyon kapasiteleri sayesinde enzimlerin yüzeye bağlanması için elverişli ortamlar oluşturmaktadır. Ayrıca bu minerallerin yüzeylerinde bulunan hidroksil ve diğer aktif fonksiyonel gruplar, enzim molekülleriyle çeşitli etkileşimler kurarak immobilizasyon sürecinin etkinliğini artırmaktadır (Guzik vd., 2014; Mateo vd., 2007).

c) Polimerler

Enzimlerin polimerik taşıyıcılar üzerine immobilizasyonu, biyokataliz sistemlerinin kararlılığını artırmak ve enzimlerin tekrar kullanılabilirliğini sağlamak amacıyla uzun yıllardır geliştirilen önemli bir biyoteknolojik yaklaşımdır. Özellikle 2000'li yıllardan sonra biyomalzeme bilimi ve polimer teknolojilerindeki gelişmeler, enzimlerin doğal ve sentetik polimer yüzeylere kontrollü olarak bağlanmasına yönelik yeni stratejilerin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Biyopolimer temelli destek materyalleri arasında aljinat, kitosan, selüloz türevleri ve agaroz gibi doğal kaynaklı polimerler, biyoyumlulukları, düşük toksisiteleri ve kolay fonksiyonlandırılabilir yapıları nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Bezerra vd., 2015; Zdarta vd., 2018).

Doğal kaynaklardan elde edilen biyopolimerler, canlı sistemlerle uyumlu olmaları ve biyolojik olarak parçalanabilir özellik göstermeleri nedeniyle özellikle biyomedikal, çevresel ve gıda teknolojileri gibi alanlarda avantaj sağlamaktadır. Bu materyallerin yapısında bulunan hidroksil, amino, karboksil ve karbonil gibi fonksiyonel gruplar, enzim molekülleri ile fiziksel adsorpsiyon, iyonik etkileşim veya kovalent bağlanma gibi farklı immobilizasyon mekanizmalarının gerçekleşmesine olanak tanır. Bununla birlikte, biyopolimerlerin suya duyarlılığı, mekanik dayanımlarının sınırlı olması ve bazı çevresel koşullarda yapısal kararsızlık gösterebilmesi, immobilizasyon sonrasında enzim aktivitesinde azalmaya neden

olabilecek önemli dezavantajlar arasında yer almaktadır (Gonçalves vd., 2015; Wahab vd., 2020).

Biyopolimerlerin yanı sıra sentetik polimerler de enzim immobilizasyonunda önemli taşıyıcı materyaller olarak kullanılmaktadır. Sentetik polimerler, farklı monomerlerin polimerizasyon reaksiyonları ile oluşturulan ve fizikokimyasal özellikleri kontrollü biçimde değiştirilebilen makromoleküler yapılardır. Monomer tipi, zincir uzunluğu, çapraz bağlanma derecesi ve yüzey kimyası gibi parametrelerin ayarlanabilmesi sayesinde bu polimerler; gözeneklilik, mekanik dayanıklılık, hidrofilitiklik ve kimyasal stabilite açısından belirli enzim uygulamalarına uygun hâle getirilebilir (Rodriguez-Abetxuko vd., 2020).

Sentetik polimerlerin yüzeylerinde bulunan epoksi, amino, karboksil, hidroksil ve aldehit gibi fonksiyonel gruplar, enzimlerin taşıyıcı yüzeye bağlanmasını kolaylaştırarak immobilizasyon verimliliğini artırmaktadır. Ayrıca bu fonksiyonel yapıların türü ve yoğunluğu, enzim ile destek materyali arasındaki etkileşimin karakterini belirleyerek enzimin konformasyonel stabilitesi ve katalitik performansı üzerinde etkili olmaktadır (Rodriguez-Abetxuko vd., 2020; Wahab vd., 2020). Özellikle modifiye edilebilir sentetik polimerler, farklı pH, sıcaklık ve çözücü koşullarında enzimlerin aktivitesini koruyabilen dayanıklı biyokatalitik sistemlerin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır.

Bununla birlikte hem doğal hem de sentetik polimer esaslı immobilizasyon sistemlerinde uygun taşıyıcı seçimi; enzimin moleküler yapısı, kullanım amacı ve reaksiyon koşulları dikkate alınarak yapılmalıdır. Günümüzde polimer destekli enzim immobilizasyon çalışmaları, daha yüksek aktivite, uzun süreli kullanım ve endüstriyel ölçekte uygulanabilirlik sağlayan yeni nesil biyokatalizörlerin geliştirilmesine yönelik olarak devam etmektedir (Wong vd., 2020; Rodriguez-Abetxuko vd., 2020).

d) Nanomalzemeler

Metal nanomalzemeler, yaklaşık 1–100 nm boyut aralığında bulunan ve bu ölçekte metalik özelliklerini koruyan malzemeler olarak tanımlanmaktadır. Nanoskobik boyutları nedeniyle, bu malzemeler hem kuantum etkileri hem de yüksek yüzey/hacim oranından kaynaklanan kendilerine özgü fiziksel ve kimyasal özellikler sergilemektedir. Metal nanopartiküllerin optik davranışları; parçacık boyutu, morfolojisi ve kimyasal bileşimine bağlı olarak eğişiklik göstermektedir. Özellikle bu nanopartiküller, belirli dalga boylarında ışığın güçlü bir şekilde soğurulmasına ve saçılmasına neden olan Yüzey Plazmon Rezonansı (YPR)

özellığı göstermektedir (Jain vd., 2007; Huang vd., 2015). Bunun yanı sıra, altın nanopartiküllerinin optik özellikleri boyutlarına göre farklılık göstermektedir. Örneğin, yaklaşık 20 nm çapındaki altın nanopartikülleri kırmızımsı bir renk sergilerken, yaklaşık 100 nm boyutundaki altın nanopartikülleri mavi renkte gözlemlenmektedir (Njoki vd., 2007). Ayrıca metal nanomalzemeler, aynı kütledeki makroskobik metal malzemelere kıyasla çok daha yüksek özgül yüzey alanına sahiptir. Bu yüksek yüzey alanı, daha fazla aktif bölgenin oluşmasını sağlayarak nanopartiküllerin katalitik performansını artırmakta ve adsorpsiyon kapasitelerinin yükselmesine katkıda bulunmaktadır (Huang vd., 2015).

Karbon bazlı nanomalzemeler, başta karbon nanotüpler ve grafen olmak üzere nanometre ölçeğinde yapılandırılmış karbon esaslı malzemeleri kapsamaktadır. Karbon nanotüpler, tek duvarlı ve çok duvarlı olmak üzere iki temel gruba ayrılmaktadır. Bu nanoyapılar yaygın olarak ark deşarj, lazer ablasyonu ve kimyasal buhar biriktirme yöntemleriyle sentezlenmektedir. Bununla birlikte, üretim sürecinde amorf karbon ve metal katalizör kalıntıları gibi istenmeyen safsızlıklar oluşabilmektedir (Dresselhaus vd., 2001; Monthieux ve Kuznetsov, 2006).

Sentez sonrasında elde edilen karbon nanotüplerin saflaştırılması ve yüzey özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla çoğunlukla nitrik asit, sülfürik asit veya bu asitlerin karışımlarıyla oksidasyon işlemi uygulanmaktadır. Bu işlem, safsızlıkların uzaklaştırılmasının yanı sıra nanotüp yüzeyine karboksil (-COOH) ve hidroksil (-OH) gibi oksijen içeren fonksiyonel grupların bağlanmasını sağlamaktadır. Böylece nanotüplerin hidrofobik karakteri azalmakta, kümelenme eğilimi düşmekte ve sulu ortamlardaki dispersiyon ile çözünürlük özellikleri belirgin şekilde iyileşmektedir (Tasis vd., 2006; Hirsch, 2002).

Karbon nanotüpler; yüksek mekanik dayanım, üstün elastikiyet, kimyasal kararlılık, geniş yüzey alanı, yüksek elektriksel iletkenlik ve biyouyumluluk gibi özellikleri sayesinde ilaç taşıma sistemleri, biyosensörler ve doku mühendisliği uygulamalarında en yaygın kullanılan nanotaşıyıcı platformlardan biri olarak değerlendirilmektedir (Bianco vd., 2005; Kostarelos vd., 2009).

Grafen ise sp^2 hibritleşmiş karbon atomlarının iki boyutlu altıgen örgü yapısında dizilmesiyle oluşan tek atom kalınlığında bir nanomalzemedir. Olağanüstü mekanik mukavemeti, yüksek elektrik ve ısı iletkenliği, geniş özgül yüzey alanı ve optik özellikleri nedeniyle günümüzde en dikkat çekici karbon nanomalzemeleri arasında yer almaktadır (Novoselov vd., 2004; Geim ve Novoselov, 2007). Bu üstün fizikokimyasal özellikleri

sayesinde grafen tabanlı yüzeylerde enzim immobilizasyonu gerçekleştirilebilmekte; böylece enzimlerin stabilitesi ve katalitik aktiviteleri artırılarak biyosensör teknolojileri, biyokataliz ve çeşitli biyomedikal uygulamalarda önemli avantajlar sağlanmaktadır (Pumera, 2011; Zhang vd., 2010).

e) Seramik Malzemeler

Seramik esaslı nanomalzemeler, yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilen sinterleme işlemleri sonucunda elde edilen inorganik ve metal içermeyen malzemeler olup üstün mekanik ve kimyasal özellikleriyle dikkat çekmektedir. Bu malzemeler, yüksek sıcaklık ve basınca karşı gösterdikleri dayanıklılığın yanı sıra asidik, bazik ve organik çözücü içeren ortamlarda da yapısal kararlılıklarını koruyabilmektedir. Bu özellikleri sayesinde özellikle enzim immobilizasyonunda destek materyali olarak tercih edilmekte ve biyokatalitik sistemlerin stabilitesini, yeniden kullanılabilirliğini ve operasyonel performansını artırmaktadır (T.sriwong ve Matsuda, 2022; Zdarta vd., 2021).

Enzim immobilizasyonunda kullanılan seramik taşıyıcılar arasında alümina (Al_2O_3), zirkonya (ZrO_2), titanya (TiO_2), silika (SiO_2), demir oksit ve kalsiyum fosfat gibi malzemeler öne çıkmaktadır. Bu seramik nanomalzemeler, yüksek yüzey alanları, kimyasal inertlikleri ve fonksiyonelleştirilebilir yüzey yapıları sayesinde biyomoleküllerin etkin bir şekilde bağlanmasına olanak sağlayarak biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalarda geniş kullanım alanı bulmaktadır (Zhao vd., 2022).

f) Manyetik Nanopartiküller

Neel'in 1950'li yıllarda yaptığı çalışmayla MNP manyetik davranışlarını gösterdiği çalışmanın ardından, özellikle 20. yüzyılın başlarından itibaren manyetoaktif nanoyapılar araştırma ve teknoloji için temel malzemeler haline gelmesinin temelini oluşturmuştur (Martins vd., 2021).

Nanopartiküllerin boyutları 10 ila 100 nm arasında değişkenlik gösteren koloidal parçacıklardır. Nano yapıli malzemeler, büyük yüzey/hacim oranına sahip olup parçacık boyutu daha küçük parçacıkların, daha büyük spesifik yüzey alanına sahip olmasından ötürü yüzeylerinde daha fazla enzimin immobilizasyonunu gerçekleştirerek substrat ve ürünün difüzyonu için daha az kısıtlama oluşturur. (Al-Dhrub vd., 2017). Bu özelliklerinden ötürü partiküllerin birim kütlesi başına daha fazla enzim yüklenmesi yapılabilir sonucuna varılmaktadır (Husain vd., 2011). Ayrıca, nano yapıli malzemeler enzime çok noktalı bağlanma

bölgeleri de sunmaktadır. Böylece proteinin çözülmesini azaltarak immobilize enzimin kararlılığının çözünür formuna göre artmasına olanak sağlarlar (Jia vd., 2003). Böylelikle aktif bölgelere sahip biyokatalizörlerin yüksek oranda yüklenmesi sağlanır ve difüzyonla enzimlerin kinetiğinin sınırlandırmaları ortadan kalkar (Sahoo vd., 2012). Nano malzemeler bu ve bu gibi özellikleriyle enzim immobilizasyonunda uygun taşıyıcı materyal olarak tercih edilmektedir (Yoon vd., 2000).

Demir oksit (Fe_3O_4) nanopartiküller (MNP), yüksek spesifik yüzey alanları ve yüksek kimyasal ve termal stabiliteleri nedeniyle, farklı fonksiyonel grupların yardımıyla yüzeylerinin kimyasal modifikasyonuna olanak sağlamaktadırlar (Yadav vd., 2012). MNP'lerin silanizasyonu, düşük sitotoksosite, asidik koşullar altında stabilite, redoks reaksiyonlarına karşı tatmin edici yanıt ve inertlik gibi özellikleri nedeniyle MNP'lerin yüzeyine, fonksiyonel gruplar eklemek için en yaygın kullanılan teknik olarak ortaya çıkmaktadır. Bununla beraber, yüzey modifikasyonu için pahalı ekipmanlara ihtiyaç duyulmadan sulu veya organik ortamda orta sıcaklıklarda basit bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Bu özelliğiyle iç manyetik çekirdeği korumak için ideal bir yöntem olduğu belirlenmiştir (Xu vd., 2014). MNP'lerde daha yüksek performansa ulaşmak için, materyallerin yüzeylerinde amin, hidroksil, karboksil ve epoksi gibi bazı reaktif fonksiyonel gruplar sentezlenmiştir (Jing vd., 2015). Bunlar, kolinesterazlardaki proteinin farklı nükleofilik gruplarıyla, örneğin amino, hidroksi veya tiyol gruplarıyla reaksiyona girerek son derece güçlü bağlar oluşturabilir (Mendes vd., 2013; Tural vd., 2014).

MNP'lerin yüzey özellikleri, kullanılan kaplama materyalinin türüne ve bu materyalin manyetik çekirdek ile oluşturduğu bağlanma mekanizmasına bağlı olarak değişmektedir. Yüzey modifikasyonu; biyouyumluluk, koloidal kararlılık, hedefe yönlendirme kapasitesi ve manyetik davranış gibi özellikleri doğrudan etkileyerek biyomedikal uygulamalardaki performansın artırılmasında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, dış manyetik alan altında MNP'lerin hareketi; manyetik kuvvet, hidrodinamik sürüklenme (Stokes sürüklenmesi) ve Brownian difüzyonunun birlikte etkisiyle belirlenmekte olup, bu etkileşimler partiküllerin hedef bölgeye taşınmasında ve ayırma veriminde kritik öneme sahiptir (Pankhurst vd., 2013; Laurent vd., 2014).

Yüksek özgül yüzey alanına sahip olmaları, düşük kütle transfer direnci sağlamaları ve reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrılabilmeleri nedeniyle MNP'ler, özellikle enzim immobilizasyonu uygulamalarında yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu özellikler sayesinde, klasik immobilizasyon desteklerine kıyasla daha yüksek katalitik etkinlik, yeniden

kullanılabilirlik ve operasyonel kararlılık sunmaktadır (Bilal vd., 2019; Sheldon ve Brady, 2018). Bunun yanında, partikül yüzeyinde gerçekleşen kütle transferi, heterojen katalitik reaksiyonların verimini ve düşük derişimli çözeltilerden hedef moleküllerin adsorpsiyon etkinliğini belirleyen temel parametrelerden biri olarak değerlendirilmektedir (Zhang vd., 2020).

2.2. Kolinesterazlar

Kolinesterazlar, sinir sisteminde kolinerjik iletimin düzenlenmesinde görev alan ve AChE'nin hidrolizini katalizleyen önemli enzimlerdir. Bu enzim grubu temel olarak AChE ve BChE olmak üzere iki ana formdan oluşmaktadır. AChE, sinaptik aralıkta asetilkolini hızla hidroliz ederek sinir impulsunun sonlanması sağlarken, BChE ise periferik dokular ve plazmada yer alarak nörotransmitter metabolizması ve çeşitli fizyolojik süreçlerde rol oynamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, kolinesterazların yalnızca nörotransmisyonun düzenlenmesinde değil; hücre proliferasyonu, apoptoz, inflamasyon, lipid metabolizması ve nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde de önemli işlevlere sahip olduğunu ortaya koymuştur (Smyrska-Wieleba ve Mroczek, 2023; Gok vd., 2024). Kolinesterazlar üzerine ilk kapsamlı çalışmalar 20. yüzyılın ortalarında gerçekleştirilmiş olup, özellikle Alzheimer hastalığının kolinerjik hipotezinin geliştirilmesiyle bu enzimler terapötik açıdan büyük önem kazanmıştır. Günümüzde kolinesteraz inhibitörleri, Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisinde en yaygın kullanılan ilaç grupları arasında yer almakta ve yeni inhibitörlerin geliştirilmesine yönelik araştırmalar hızla devam etmektedir (Yıldırım ve Ulusoy Güzeldemirci, 2023; Martins vd., 2023). Ayrıca doğal kaynaklardan elde edilen kolinesteraz inhibitörleri, yüksek seçicilikleri ve düşük yan etki potansiyelleri nedeniyle farmasötik araştırmalarda önemli bir çalışma alanı oluşturmakta; bu nedenle kolinesterazlar nörodejeneratif hastalıkların tanısı, tedavisi ve ilaç geliştirme çalışmalarında stratejik biyolojik hedefler olarak kabul edilmektedir (Smyrska-Wieleba ve Mroczek, 2023; Murray vd., 2024).

Bunun yanında organofosfat ve karbamat grubu pestisitler, AChE ve BChE enzimlerini inhibe ederek sinir iletimini bozmakta ve bu özellikleri sayesinde kolinesterazlar pestisit kalıntılarının belirlenmesinde en yaygın kullanılan biyolojik tanıma elemanları arasında yer almaktadır. Kolinesteraz temelli biyosensörler; yüksek seçicilik, hızlı analiz süresi, düşük maliyet ve yerinde (on-site) ölçüm yapılabilmesi gibi avantajları sayesinde tarımsal ürünlerde, su kaynaklarında ve çevresel örneklerde pestisit kalıntılarının güvenilir şekilde tespit edilmesine olanak sağlamaktadır. Bu teknolojiler, pestisitlerin hasat öncesi ve sonrası

izlenmesini kolaylaştırarak gıda güvenliğini artırılmasına, çevresel kirliliğin kontrol altına alınmasına ve sürdürülebilir tarım uygulamalarının geliştirilmesine önemli katkılar sunmaktadır (Li vd., 2024; Ivanov vd., 2024). Bununla birlikte, pestisitlere uzun süreli veya yüksek düzeyde maruziyetin yalnızca akut kolinesteraz inhibisyonuna neden olmadığı, aynı zamanda oksidatif stres, nöroenflamasyon, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve protein agregasyonu gibi mekanizmalar yoluyla nörodejeneratif süreçleri tetikleyebildiği bildirilmektedir. Özellikle epidemiyolojik çalışmalar, kronik pestisit maruziyetinin Parkinson hastalığı ile anlamlı düzeyde ilişkili olduğunu, ayrıca Alzheimer hastalığının gelişiminde de çevresel bir risk faktörü olarak değerlendirildiğini göstermektedir. Bu nedenle kolinesteraz temelli pestisit tayin yöntemleri yalnızca tarımsal kalite kontrolü açısından değil, aynı zamanda çevresel maruziyetin izlenmesi ve nörodejeneratif hastalıkların önlenmesine yönelik halk sağlığı stratejilerinin geliştirilmesi açısından da büyük önem taşımaktadır (Silva vd., 2025; Li vd., 2024).

2.2.1. Asetilkolinesteraz

AChE; EC 3.1.1.7, kolinerjik sinir sisteminde sinaptik iletimin sonlandırılmasından sorumlu olan ve serin hidrolaz sınıfında yer alan enzimlerden biridir. Temel biyolojik görevi, sinaptik aralıkta salınan nörotransmitter asetilkolini çok kısa bir süre içerisinde hidroliz ederek kolin ve asetata dönüştürmek, böylece sinir impulsunun kontrollü şekilde sonlanmasını sağlamaktır. Merkezi ve periferik sinir sistemi başta olmak üzere nöromusküler kavşaklarda, eritrosit membranlarında ve çeşitli sinaptik yapılarda yüksek miktarda bulunan AChE'nin, sinir sisteminin normal fizyolojik işleyişi için vazgeçilmez bir biyokatalizör olarak kabul edilmektedir (Smyrska-Wieleba ve Mroczek, 2023; Taylor ve Radic, 2021).

AChE'nin katalitik aktivitesi, klasik serin hidrolazlarda olduğu gibi Ser203-His447-Glu334 amino asitlerinden oluşan katalitik üçlü (catalytic triad) tarafından gerçekleştirilmektedir. Reaksiyon mekanizması iki temel basamaktan oluşmaktadır. İlk aşamada asetilkolin molekülü aktif merkeze difüze olarak anyonik bağlanma bölgesindeki aromatik amino asitlerle elektrostatik ve π -katyon etkileşimleri sayesinde stabilize edilir. Daha sonra histidin kalıntısı serin hidroksil grubunun nükleofilik özelliğini artırır ve aktive edilen serin, asetilkolinin karbonil karbonuna nükleofilik saldırı gerçekleştirerek tetrahedral ara ürünün oluşmasına neden olur. Bu ara ürünün parçalanması sonucunda kolin molekülü ortamdan ayrılırken enzim geçici olarak asetillenmiş (asil-enzim kompleksi) hâle gelir. İkinci aşamada ise aktif merkeze giren bir su molekülü histidin tarafından aktive edilerek asetillenmiş

serin kalıntısına saldırır ve oluşan ikinci tetrahedral ara ürünün parçalanmasıyla asetat serbest bırakılır. Böylece enzim başlangıçtaki aktif konformasyonuna geri dönerek yeni bir katalitik döngüye hazır hâle gelir. Bu mekanizma sayesinde AChE saniyede yaklaşık 10^4 – 10^5 asetilkolin molekülünü hidroliz edebilen, doğada bilinen en yüksek katalitik verime sahip enzimlerden biri olarak kabul edilmektedir (Dvir ve Silman., 2020; Luque ve Muñoz-Torrero., 2024).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, AChE'nin yalnızca nörotransmitter metabolizmasında görev almadığını; hücre adezyonu, embriyonik gelişim, nöronal farklılaşma, inflamasyonun düzenlenmesi ve amiloid plak oluşumu gibi kolinerjik olmayan biyolojik süreçlerde de aktif rol oynadığını göstermektedir. Özellikle Alzheimer hastalığında hem asetilkolin düzeylerinin azalması hem de enzimin periferik anyonik bölgesinin β -amiloid agregasyonunu hızlandırması nedeniyle AChE, nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde en önemli moleküler hedeflerden biri olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle donepezil, rivastigmin ve galantamin gibi klinikte kullanılan ilaçların yanı sıra doğal bileşikler, nanomalzemeler ve hibrit inhibitörler üzerine yoğun araştırmalar yürütülmektedir. Ayrıca organofosfat pestisitlerin seçici biçimde AChE'yi inhibe etmesi, enzimin biyosensör teknolojilerinde biyotanıma elemanı olarak kullanılmasını mümkün kılmış; gıda güvenliği, çevresel analiz ve tarımsal pestisit kalıntılarının hızlı tayininde yaygın şekilde değerlendirilmesine olanak sağlamıştır (Ivanov vd., 2024; Li vd., 2024).

2.2.2. Bütirilkolinesteraz

BChE; EC 3.1.1.8, kolinesteraz enzim ailesinin bir üyesi olan ve ester bağlarının hidrolizinden sorumlu bir serin hidrolazdır. İnsan organizmasında temel olarak karaciğerde sentezlenerek kana salgılanan BChE; plazma, karaciğer, beyin ve çeşitli dokularda bulunmaktadır. AChE ile aynı enzim ailesinde yer almasına rağmen BChE, daha geniş bir substrat özgüllüğüne sahiptir ve fizyolojik rolü yalnızca nörotransmitter parçalanması ile sınırlı değildir. Enzim, özellikle dış kaynaklı ester yapılı toksik bileşiklerin uzaklaştırılmasında ve bazı ilaçların metabolizmasında önemli görevler üstlenmektedir (Lockridge., 2015).

BChE'nin temel biyokimyasal görevi ester yapısındaki bileşiklerin su kullanılarak hidroliz edilmesidir. Enzimatik reaksiyon sırasında substrat aktif bölgeye bağlanır ve serin amino asidinin nükleofilik saldırısı sonucu geçici bir asil-enzim kompleksi meydana gelir. Daha sonra su molekülünün katılımıyla bu ara ürün parçalanır ve enzim yeniden aktif hâle döner (Nicolet vd., 2003).

BChE'nin kullanım alanları günümüzde yalnızca klasik enzim biyokimyası ile sınırlı değildir. Organofosfat yapılı pestisitler ve sinir ajanları gibi toksik bileşiklerin etkilerinin araştırılmasında BChE önemli bir biyolojik hedef olarak değerlendirilmektedir. Plazmada bulunan BChE, bu tür bileşikleri bağlayarak merkezi sinir sistemindeki AChE'nin korunmasına yardımcı olabilen doğal bir "biyolojik temizleyici" olarak görev yapabilir. Bunun yanında rekombinant BChE varyantlarının geliştirilmesi, toksik maddelerin uzaklaştırılması ve bazı bağımlılık tedavilerinde kullanılabilecek biyoteknolojik yaklaşımlar arasında yer almaktadır (Masson vd., 2009).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, BChE biyolojik fonksiyonlarının yalnızca kolin esterlerinin hidrolizi ile sınırlı olmadığını, aynı zamanda hastalık biyobelirteci, terapötik hedef ve biyoteknolojik araç olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır. Özellikle nörodejeneratif hastalıklar kapsamında BChE aktivitesindeki değişimler araştırılmış ve enzimin Alzheimer hastalığının ilerleyen evrelerinde asetilkolin metabolizmasında daha belirgin rol oynayabileceği gösterilmiştir. Bu doğrultuda, seçici BChE inhibitörlerinin geliştirilmesi ve AChE ile birlikte her iki enzimi hedefleyen çok fonksiyonlu moleküllerin tasarlanması güncel araştırma konuları arasında yer almaktadır. Bunun yanında rekombinant insan BChE üretimi, organofosfat zehirlenmelerine karşı koruyucu biyolojik ajan geliştirme çalışmaları ve enzimin katalitik özelliklerinin iyileştirilmesine yönelik protein mühendisliği yaklaşımları son yıllarda önem kazanmıştır. Yapısal biyoloji ve bilgisayar destekli ilaç tasarımı yöntemlerindeki gelişmeler sayesinde BChE'nin aktif bölgesi ile etkileşime giren yeni inhibitör ve aktivatör moleküllerin belirlenmesi mümkün hâle gelmiştir. Güncel araştırmalar, BChE'nin yalnızca klasik bir hidrolitik enzim olarak değil; nörolojik hastalıklar, toksikoloji, metabolik bozukluklar ve yeni nesil biyofarmasötik uygulamalar açısından önemli bir moleküler hedef olduğunu göstermektedir (Greg vd.,2005; Salvatore., 2026; Karlsson., 2013).

2.2.3. AChE ve BChE'nin pestisit tayininde kullanımı

Tarımda pestisit kullanımının artması, gıda ürünleri ve çevresel örneklerde pestisit kalıntılarının hassas ve hızlı şekilde belirlenmesini önemli bir araştırma konusu haline getirmiştir. Geleneksel kromatografik analiz yöntemleri yüksek doğruluk ve seçicilik sağlamasına rağmen, karmaşık örnek hazırlama aşamaları, yüksek maliyetli cihaz gereksinimi ve uzman personel ihtiyacı gibi sınırlamalara sahiptir. Bu nedenle biyosensör teknolojileri, düşük maliyetli, hızlı ve taşınabilir analiz sistemleri geliştirilmesi açısından önemli bir alternatif olarak değerlendirilmektedir. Özellikle AChE ve BChE enzimlerinin pestisitlerin biyolojik

etkilerini belirlemede kullanılması, kolinesteraz inhibitörü özellik gösteren bileşiklerin tespitinde etkili bir yaklaşım sunmaktadır. Bu sistemlerde pestisit moleküllerinin enzim aktivitesini baskılaması temel alınarak analitik sinyal oluşturulmaktadır (Verma ve Bhardwaj, 2015; Chauhan vd., 2021).

AChE ve BChE tabanlı biyosensörlerin çalışma prensibi, inhibitör özellik gösteren pestisitlerin enzimlerin katalitik bölgeleriyle etkileşime girerek substrat dönüşümünü azaltmasına dayanmaktadır. AChE enzimi asetilkolinin hidrolizinde görev alırken, inhibitör bir bileşiğin varlığında oluşan kolin türevlerinin miktarında azalma meydana gelmektedir. Benzer şekilde BChE enzimi de çeşitli toksik bileşiklere karşı duyarlılık göstermekte ve pestisitlerin toplam inhibitör etkisinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Son yıllarda elektrokimyasal sensör platformları, nanomalzeme destekli elektrot tasarımları ve gelişmiş immobilizasyon teknikleri sayesinde kolinesteraz temelli analizlerin hassasiyeti artırılmıştır. Bu gelişmeler, AChE/BChE sistemlerinin çevresel ve gıda örneklerinde hızlı pestisit taraması için kullanım potansiyelini yükseltmiştir (Ding vd., 2022; Zhang vd., 2025).

Son yıllarda kolinesteraz temelli biyosensörlerin geliştirilmesinde yapay enzimler, ileri nanomalzemeler ve çoklu sinyal algılama sistemleri üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalar, mevcut biyosensörlerin tekrar kullanılabilirlik gibi sınırlamalarını azaltmayı amaçlamaktadır. AChE ve BChE tabanlı sistemlerin hızlı analiz kapasitesi, düşük örnek hacmi gereksinimi ve taşınabilir cihazlarla uyumlu olması; pestisit kalıntılarının saha koşullarında izlenmesi açısından önemli avantajlar sağlamaktadır. Gelecekte bu sistemlerin klasik kromatografik yöntemlerle birlikte kullanılması, hızlı tarama ve kesin doğrulama aşamalarını birleştiren daha etkili pestisit analiz stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır (Wang vd., 2018; Zhang vd., 2025).

2.3. Nicosülfuron

Nicosülfuron, sülfonilüre grubu içerisinde yer alan seçici sistemik bir herbisittir. Etki mekanizması, bitkilerde dallanmış zincirli amino asitlerin (valin, lösin ve izolösin) biyosentezinde görev yapan asetolaktat sentaz veya asetohidroksi asit sentaz enzimini inhibe etmeye dayanır. Bu enzimin baskılanması sonucunda hücre bölünmesi durur, yabancı otların büyümesi kısa sürede yavaşlar ve bitkiler birkaç hafta içerisinde tamamen ölür. Nicosülfuron özellikle dar yapraklı yabancı otların mücadelesinde yüksek etkinlik göstermektedir (Brankov vd., 2024).

Kimyasal olarak nicosülfuron, sülfonilüre herbisitleri grubunda yer almakta olup düşük uygulama dozlarında dahi yüksek biyolojik aktivite göstermektedir. Bitki tarafından yaprak ve köklerden alınarak ksilem ve floem aracılığıyla büyüme noktalarına taşınır. Topraktaki parçalanma hızı; pH, organik madde miktarı, sıcaklık ve mikrobiyal aktivite gibi çevresel faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Alkali karakterli topraklarda kalıcılığının arttığı, asidik topraklarda ise daha hızlı parçalandığı bildirilmektedir (Mitrić vd., 2024).

Türkiye'de nicosülfuron etken maddesi, Tarım ve Orman Bakanlığı Bitki Koruma Ürünleri Veri Tabanında ruhsatlı aktif maddeler arasında yer almaktadır. Bakanlık kayıtlarında nicosülfuron içeren farklı ticari preparatlar bulunmakta olup bu preparatlar esas olarak mısır yetiştiriciliğinde yabancı ot mücadelesi amacıyla ruhsatlandırılmıştır. Etken madde genellikle 40 g/L OD (Oil Dispersion) formülasyonunda kayıtlıdır. Türkiye'de kullanım, Bitki Koruma Ürünlerinin Ruhsatlandırılması ve Kullanımı hakkındaki ilgili mevzuat kapsamında gerçekleştirilmekte olup önerilen dozların ve uygulama zamanının dışına çıkılmaması gerekmektedir. Özellikle ardışık ekilecek hassas bitkiler açısından toprakta kalıntı oluşturma potansiyeli dikkate alınmalıdır (TOB BKÜ, 2025).

Nicosülfuron en yaygın olarak dane ve silajlık mısır üretim alanlarında kullanılmaktadır. Özellikle;

- *Echinochloa crus-galli* (Darıcan)
- *Sorghum halepense* (Kanyaş)
- *Setaria türleri*

Digitaria sanguinalis bazı geniş yapraklı yabancı otlara karşı yüksek etkilidir.

Herbisit, mısır bitkisinin seçiciliği sayesinde kültür bitkisine zarar vermeden yabancı otların gelişimini baskılar. Bununla birlikte şeker pancarı, darı ve bazı sebze türleri gibi hassas bitkilerde toprak kalıntıları fitotoksisite oluşturabilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, özellikle şeker pancarında çok düşük düzeylerdeki nicosülfuron kalıntılarının dahi çıkış oranı ve fotosentetik aktivite üzerinde olumsuz etkilere neden olabileceğini göstermektedir (Xiao vd., 2024).

Nicosülfuron kalıntılarının analizinde günümüzde en yaygın kullanılan yöntem yüksek performanslı sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC-MS/MS)'dir. Bu yöntem yüksek duyarlılık ve seçicilik sağlaması nedeniyle hem bitki hem de toprak örneklerinde rutin

analizlerde tercih edilmektedir. Analiz öncesinde örnek hazırlama aşamasında çoğunlukla QuEChERS ekstraksiyon yöntemi uygulanmaktadır. Bu yöntem düşük çözücü tüketimi, kısa analiz süresi ve yüksek geri kazanım oranları nedeniyle uluslararası standart analiz protokollerinde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Xiao vd., 2025).

Son yıllarda klasik kromatografik yöntemlerin yanında hiperspektral görüntüleme (Hyperspectral Imaging, HSI) ve yapay zekâ tabanlı derin öğrenme modelleri geliştirilmiştir. Bu teknikler sayesinde laboratuvar analizine gerek kalmadan mısır bitkisindeki nicosülfuron kalıntılarının hızlı ve yüksek doğrulukla belirlenebildiği gösterilmiştir. Geliştirilen modeller %90'ın üzerinde sınıflandırma doğruluğuna ulaşmış olup hassas tarım uygulamalarında önemli bir potansiyel taşımaktadır (Zhao 2024).

Bunun yanında yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-UV), UHPLC-MS/MS ve çevresel örneklerde kullanılan katı faz ekstraksiyonu (SPE) ile kombine edilen LC-MS/MS yöntemleri de nicosülfuronun su, toprak ve bitki dokularındaki düşük konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu yöntemler uluslararası pestisit kalıntı analiz laboratuvarlarında referans analiz teknikleri olarak kabul edilmektedir (Xiao 2025).

2.4. Literatür özeti

Enzim immobilizasyonu, enzimlerin uygun taşıyıcı materyaller üzerine bağlanarak katalitik aktivitelerinin korunması, stabilitelerinin artırılması ve tekrar kullanılabilir hale getirilmesi amacıyla kullanılan önemli biyoteknolojik yöntemlerden biridir. Sheldon ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda enzim immobilizasyonunun serbest enzimlere göre daha yüksek operasyonel kararlılık sağladığı, enzimin çevresel koşullara karşı dayanıklılığını artırdığı ve endüstriyel uygulamalarda tekrar kullanım avantajı sunduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar, immobilizasyon yönteminin seçiminin enzim aktivitesi, taşıyıcı materyalin özellikleri ve uygulama alanına bağlı olarak değiştiğini göstermiştir (Sheldon vd., 2007).

MNP'ler, özellikle manyetik (Fe_3O_4) esaslı nanopartiküller, son yıllarda enzim immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılan taşıyıcı sistemler arasında yer almaktadır. Laurent ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmalarda Fe_3O_4 nanopartiküllerinin yüksek yüzey alanına sahip olması, biyouyumlu yapısı ve dış manyetik alan uygulanarak kolay şekilde ayrılabilmesi nedeniyle biyomedikal ve biyoteknolojik uygulamalar açısından önemli avantajlar sunduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte araştırmacılar, saf MNP'lerin yüzey özelliklerinin enzim immobilizasyonu için yeterli olmadığını ve yüzey fonksiyonelleştirme

işlemlerinin nanopartikül stabilitesini ve enzim bağlanma kapasitesini artırdığını belirtmiştir (Laurent vd., 2008).

Mateo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda enzimlerin taşıyıcı yüzeylere kovalent olarak bağlanmasının, fiziksel adsorpsiyona kıyasla daha yüksek stabilite sağladığı gösterilmiştir. Araştırmacılar, kovalent immobilizasyon yöntemleriyle enzimin taşıyıcı yüzeyden ayrılmasının azaltıldığını ve uzun süreli kullanım sırasında aktivite kaybının sınırlandırıldığını bildirmiştir. Ancak immobilizasyon sırasında enzimin aktif bölgesinin zarar görebileceği ve uygun bağlama koşullarının seçilmesinin kritik olduğu ifade edilmiştir (Mateo vd., 2007).

MNP'lerin yüzey özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla farklı fonksiyonelleştirme yöntemleri uygulanmaktadır. Liang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda Fe_3O_4 nanopartiküllerinin silika kaplama, polimer modifikasyonu ve fonksiyonel gruplarla zenginleştirme işlemleri sonucunda enzim bağlama kapasitesinin arttığı ve immobilize enzimlerin daha yüksek kararlılık gösterdiği bildirilmiştir. Araştırmacılar, özellikle amino, karboksil ve aldehit grupları içeren yüzey modifikasyonlarının enzim molekülleriyle daha güçlü etkileşim sağlayarak biyosensör performansını geliştirdiğini belirtmiştir (Liang vd., 2021).

AChE, kolin esterlerinin hidrolizinden sorumlu olan ve özellikle organofosfat ile karbamat grubu pestisitlerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir enzimdir. Pohanka ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda AChE enziminin pestisit inhibitörlerine karşı yüksek duyarlılık göstermesi nedeniyle biyosensör uygulamalarında önemli bir biyolojik tanıma elemanı olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar, immobilize AChE sistemlerinin serbest enzime göre daha uzun kullanım ömrü sağladığını ve çevresel toksinlerin hızlı tespitinde etkili olduğunu göstermiştir (Pohanka et al., 2011).

AChE'nin MNP'ler üzerine immobilizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda, nanomalzeme destekli enzim sistemlerinin enzimin stabilitesini artırdığı ve hassas biyosensörlerin geliştirilmesine olanak sağladığı bildirilmiştir. Periasamy ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada, AChE enziminin farklı nanomalzemelerle oluşturulan hibrit matrisler üzerine immobilize edilmesinin, organofosforlu pestisitlerin elektrokimyasal olarak belirlenmesinde önemli avantajlar sağladığı belirtilmiştir. Araştırmacılar, nanomalzemelerin yüksek yüzey alanı, iyi elektron iletkenliği ve biyomoleküllerin immobilizasyonuna uygun yapıları sayesinde AChE enziminin aktivitesinin korunmasına katkı sağladığını ve sensörlerin duyarlılık, seçicilik ve kararlılık özelliklerini geliştirdiğini bildirmiştir. Ayrıca, nanomalzeme

tabanlı AChE biyosensörlerinin düşük pestisit konsantrasyonlarının tespitinde etkili olduğu, hızlı cevap süresi ve tekrar kullanılabilirlik özellikleri sayesinde geleneksel analiz yöntemlerine alternatif oluşturabileceği ifade edilmiştir (Periasamy vd., 2009).

Tarım alanında yapılan çalışmalarda AChE immobilize edilmiş MNP sistemlerinin özellikle organofosfat ve karbamat pestisitlerin belirlenmesinde kullanıldığı görülmektedir. Fukuto tarafından yapılan çalışmalarda organofosfat ve karbamat bileşiklerinin AChE aktivitesini inhibe ederek sinir sistemi üzerinde toksik etkilere neden olduğu açıklanmıştır. Bu nedenle AChE aktivitesindeki değişimlerin pestisit varlığının belirlenmesinde önemli bir gösterge olduğu belirtilmiştir (Fukuto, 1990). Bu çalışmalar doğrultusunda geliştirilen MNP destekli AChE biyosensörleri, hızlı analiz yapılabilmesi ve düşük örnek miktarlarıyla çalışabilmesi nedeniyle geleneksel analiz yöntemlerine alternatif olarak değerlendirilmiştir.

BChE enzimi ise özellikle sağlık ve toksikoloji alanındaki uygulamalarda önem taşımaktadır. Arduini ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda BChE'nin çeşitli inhibitör maddelerin belirlenmesinde kullanılabilecek etkili bir biyolojik tanıma elemanı olduğu ve immobilizasyon yöntemleriyle enzimin kullanım kararlılığının artırılacağı gösterilmiştir. Araştırmacılar, manyetik desteklerin BChE immobilizasyonunda enzimin kolay ayrılmasını sağladığını ve tekrar kullanım kapasitesini artırdığını bildirmiştir (Arduini vd., 2015).

BChE immobilizasyonuna yönelik çalışmalarda MNP sistemlerinin özellikle toksik bileşiklerin ve farmasötik inhibitörlerin analizinde avantaj sağladığı belirtilmektedir. BChE enziminin plazmada bulunan doğal bir enzim olması nedeniyle, organofosfat maruziyetinin değerlendirilmesi ve bazı klinik analizlerde biyobelirteç olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir. Bununla birlikte araştırmacılar, immobilizasyon işlemleri sırasında enzimin doğal yapısının korunmasının ve uygun taşıyıcı materyalin seçilmesinin analiz doğruluğu açısından önemli olduğunu vurgulamıştır (Arduini vd., 2015; Salvatore, 2026).

Literatürde yapılan çalışmalar genel olarak değerlendirildiğinde, fonksiyonelleştirilmiş MNP'lerin AChE ve BChE immobilizasyonunda önemli avantajlar sağladığı görülmektedir. Bu sistemlerin yüksek yüzey alanı, manyetik olarak kolay ayrılabilme özelliği, tekrar kullanılabilirlik ve enzim stabilitesini artırma potansiyeli önemli üstünlükleri arasında yer almaktadır. Sheldon ve arkadaşları immobilizasyonun temel amacının enzimin aktivitesini koruyarak kullanım süresini artırmak olduğunu belirtirken, MNP tabanlı sistemlerin bu hedefe ulaşmada etkili taşıyıcı platformlar sunduğu sonucuna ulaşılmıştır (Sheldon vd., 2007).

Bununla birlikte yapılan çalışmalarda bazı sınırlamalar da bildirilmiştir. Laurent ve arkadaşları MNP'lerin oksidasyon eğilimi ve biyolojik ortamlardaki davranışlarının kontrol edilmesi gerektiğini belirtmiştir. Ayrıca gerçek çevresel ve biyolojik örneklerde bulunan diğer bileşenlerin enzim aktivitesini etkileyebileceği, nanopartikül üretim maliyetlerinin ve büyük ölçekli uygulamalardaki standardizasyon problemlerinin gelecekte çözülmesi gereken konular arasında olduğu ifade edilmiştir (Laurent vd., 2008).

Sonuç olarak, işlevselleştirilmiş MNP'ler üzerine immobilize edilen AChE ve BChE enzimleri, sağlık ve tarım alanlarında hassas, hızlı ve yeniden kullanılabilir analiz platformlarının geliştirilmesine önemli katkılar sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar, özellikle Fe₃O₄ temelli fonksiyonelleştirilmiş nanopartiküllerin enzim stabilitesini artırdığını ve biyosensör uygulamalarında yüksek performans sağlayabildiğini göstermektedir. Gelecekte daha biyouyumlu yüzey modifikasyonlarının geliştirilmesi ve taşınabilir sensör teknolojileriyle birleştirilmesiyle bu sistemlerin kullanım alanlarının daha da genişleyeceği düşünülmektedir.

3. MATERYAL/METOT

3.1. Kimyasallar ve kullanılan cihazlar

Tablo 2.2. Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçlar

Kullanılan Cihazlar	Marka	Kullanım Amacı
Hassas terazi	RADWA/AS 220	Kimyasal maddelerin ağırlığının ölçümü
Manyetik Karıştırıcı	Daihan Scientific/ MSH-20D	Çözeltilerin hazırlanması
pH Metre	Hanna Instruments	pH ölçümleri
Spektrofotometre	Thermoscientific/Genesys150	Aktivite tayini
Vorteks	Isolab	Karışımların homojenizasyonu
Hassas otomatik pipet	Isolab	Hassas miktarda sıvı ölçümü
EDX özellikli taramalı elektron mikroskobu (SEM EDX)	Zeiss / Supra 40 VP	Morfolojik özelliklerin belirlenmesi
Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi	Perkin Elmer / Spectrum 100	Fonksiyonel grupların belirlenmesi

Kimyasallar

Sigma–Aldrich'ten glutaraldehit (%25), APTES (3-aminopropiltrietoksisilan), tetra ortosilikat (TEOS), elektrikli yılan balığından elde edilen asetilkolinesteraz (AChE), asetiltiyokolin iyodat (ATCh), at serumundan elde edilen bütirilkolinesteraz (BChE), bütiriltiyokolin iyodat (BTCh), etilendiamintetraasetikasit (EDTA), demir(II) klorür tetrahidrat (%99,0), demir(III) klorür heksahidrat (%99,0), monobazik sodyum fosfat, disodyum fosfat, trizma hidroklorür, sodyum sitrat, sodyum hidroksit, hidroklorik asit 5,5-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ve tacrine alınarak kullanılmıştır.

3.1.2 Çözeltilerin hazırlanması

Tampon hazırlama

pH 4 Tamponun (1M) Hazırlanması

30.27g Tris ve 0.370g EDTA 200 ml saf suda çözündürülür. pH metre yardımı ile 1N HCl ile pH 4'e ayarlandıktan sonra 250 ml'ye tamamlandı. Aynı işlemler pH 4'ten pH 10'a kadar izlenerek tüm tampon çözeltiler aynı şekilde hazırlandı.

Substratların Hazırlanması

DTNB (10mM) Hazırlama

0.01 g DTNB ve 0.5 g sodyum sitrat tartılarak 50 ml saf suda çözündürülür.

Asetiltiyokolin İyodat (10mM) Hazırlanması

0.145 g asetiltiyokolin iyodat tartılarak 50 ml saf suda çözündürülür.

Bütiriltiyokolin İyodat (0.5 mM) Hazırlanması

0.008 g bütiriltiyokolin iyodat tartılarak 50 ml saf suda çözündürülür.

3.2. Manyetik nanopartikül sentezi ve karakterizasyonu

Manyetik Fe₃O₄ nanopartikülleri ortak çöktürme yöntemi kullanılarak, açık hava ortamında sentezlendi. Ortak çöktürme için kullanılan sistem 0-2000 rpm karıştırma aralığında çalışan mekanik karıştırıcı, cam karıştırma ucu, 250 ml hacminde iki boyunlu balon ile balon için sabitleyici ayaklardan oluşturuldu. Demir (II) klorür tetrahidrat (%99,0) ve Demir (III) klorür heksahidrat (99,0%) ticari olarak satın alındı. Çalışmada, 7,5 g FeCl₂.4H₂O ve 10,1 g FeCl₃.6H₂O 25 ml suda çözülerek çift boyunlu balona alındı. Çözeltinin üzerinde 25 ml NH₄OH (%25) eklenerek mekanik karıştırıcıda 700 rpm hızda 2 dakika karıştırıldı. Amonyum hidroksit eklendiğinde çözeltinin renginin siyaha döndüğü gözlemlendi. Çözeltinin bir kısmı karakterizasyon için, miknatis altında çöktürülüp saf suyla dört kez yıkanıp ve 60°C'de kurutularak toz haline getirildi (Karaağaç, 2011; Özel, 2015).

3.2.1. Manyetik nanopartikülün fonksiyonelleşmesi:

Silisyum oksit kaplı MNP'lerin hazırlanması için, bunlar 100 ml %20 v/v etanol çözeltisi içinde dağıtılacaktır ve daha sonra 10 dakika sonikasyona tabi tutuldu. Ardından %10 NH₃ ilave edildi. Hazırlanan çözelti kuvvetlice karıştırılarak 5 ml tetraetil ortasilikat (TEOS) (%99,0) ilave edildi ve 40°C, 80 rpm'de 12 saat süreyle inkübe edildi. Nihai ürün santrifüjleme yoluyla

ayrılacak ve daha sonra metanol ile yıkandı. Bundan sonra ekstra NH_2 , silisyum oksit tabakası parçacıklarının üzerine kaplandı. Kısaca, elde edilen TEOS kaplı MNP'ler etanol içerisinde dağıtıldı ve bu çözeltideki APTES'in (%99) nihai konsantrasyonu %20 w/v olarak ayarlandı. Ardından 10 dakika sonikasyona tabi tutuldu ve 60°C 'de 12 saat boyunca geri akış altında karıştırılarak inkübe edildi. Parçacıklar santrifüjlenecek ve daha sonra metanol ile yıkanacaktır. Son olarak 50°C 'de 18 saat kurutuldu (Al-Dhrub vd., 2017; Wang vd., 2011). Ticari olarak satın alınan AChE ve BChE, MNP yüzeyine GA çapraz bağlanma ajanı kullanılarak kovalent olarak immobilize edildi. İlk olarak destek, GA (%25) ile optimum koşullarda aktive edildi, ardından aktifleştirilmiş destek materyallerine AChE ve BChE immobilize edildi. Kısaca, 10 mg sentezlenen destek materyali, damıtılmış su içerisinde hazırlanan 1 ml GA çözeltisi içerisinde süspanse edildi ve ardından 40°C 'de karıştırılarak (130 rpm) inkübe edildi. Daha sonra, GA ile aktifleştirilmiş destek materyali, harici bir manyetik alan kullanılarak çözeltiden toplandı ve fazla GA'yı çıkarmak için damıtılmış su ile durulandı (Siebert vd., 2023).

3.3. Enzim immobilizasyonu, karakterizasyonu ve kinetik parametreler

Daha sonra aktifleştirilmiş destek materyali, fosfat tamponu (50 mM, pH 7,6) içindeki 100 ul AChE ve BChE çözeltisi içinde süspanse edildi ve bir süre hafifçe çalkalanarak 25°C 'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra immobilize edilmiş AChE ve BChE manyetik ayrıştırıcılar tarafından ayrıştırılacak ve bağlanmamış AChE ve BChE'nin çıkarılması için fosfat tamponu (50 mM, pH 7,6) ile üç kez yıkandı ve yıkanan çözelti toplandı (Rodrigues de Melo vd., 2017).

3.3.1. İmmobilize AChE ve BChE enzimlerinin karakterizasyonu

Elde edilen MNP destek materyalinin, immobilizasyon öncesi ve sonrası, kaplanmış ve kaplanmamış parçacıkların manyetik özellikleri, bir VSM Oxford 3001 titreşimli numune manyetometresi ile incelendi. Malzemelerin manyetik alan duyarlılığı, Ms histerezis döngüleri gibi temel manyetik parametreleri, bu cihazlar ile tespit edilmektedir. Demir parçacıklarının kaplanmasından önceki ve sonraki VSM verilerinin karşılaştırılması, oda sıcaklığında destekte güçlü ferromanyetizmanın varlığını göstermesi yönünden kanıt sunar (Hu vd., 2010). Destek materyalinin yüzeyinde bulunan fonksiyonel grupları belirlemek ve enzim immobilizasyon aşamalarının başarısını doğrulamak için, MNP, GA ile aktifleştirilmiş MNP ve enzim immobilize edildikten sonraki MNP, bir Nicolet-380 spektrometre kullanılarak fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) ölçümleriyle araştırıldı. İletim spektrumları 400 ila 4000 cm^{-1} arasında elde edildi. MNP, fonksiyonelleştirilmiş MNP, GA ile aktifleştirilmiş MNP ve enzim immobilize edildikten sonraki destek materyalinin ayrıntılı yüzey morfolojileri,

immobilizasyon öncesi ve sonrası, Zeiss Supra 40VP taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak analiz edildi (Palanivelu ve Chidambaram 2019).

3.3.2. Aktivite tayini

AChE'nin substratı asetiltiyakolindir. Bu aşamada sentezlenen MNP'li AChE aktivitesi, esteraaz aktivite belirleme yöntemi kullanılarak belirlendi. Bu yöntemde göre, AChE enzimi varlığında asetilkolinyodat ile reaksiyonu 412 nm'de UV absorbansındaki değişime göre belirlenmektedir. Bu reaksiyonu hidrolizinde gözlenen maksimum dalga boyu 412 nm'dir. Bu nedenle, enzimatik reaksiyonun takibinde 412 nm'deki UV absorpsiyonu kullanıldı. Enzimatik reaksiyonlarda aynı koşullarda MNP'li AChE ve serbest AChE enzimleri kullanılarak enzim aktiviteleri karşılaştırılmalı olarak incelendi. Enzimatik reaksiyonlarda 0,1 ml 1 M Tris-HCl pH 8.0 tamponu, 0,5 ml asetiltiyokolinyodat, 0,5 ml DTNB 0,1 ml AChE enzimi ve 0,8 ml su olacak şekilde toplamda 2 ml'lik karışım hazırlandı ve enzim aktiviteleri UV spektrofotometre cihazı kullanılarak belirlendi. Her bir enzimatik reaksiyonda kullanılan immobilize AChE ve serbest AChE enzim derişimleri eşit olacak şekilde ayarlandı. Enzim aktivitesini belirlemede kullanılan toplam hacim her spektrofotometre küveti için 2000 µL olarak çalışılacaktır (Bartolini vd., 2004). BChE için de aynı işlemler uygulandı.

3.3.3. Kinetik parametrelerin belirlenmesi

Belirli bir enzim için K_m 'nin hem immobilize hem de serbest durumlarda değerlendirilmesi, enzim ve desteği arasındaki etkileşim hakkında bilgi sağlar. Bir enzim immobilize edildikten sonra K_m 'deki bir artış, immobilize edilmiş enzimin substratı için serbest enzime göre belirgin şekilde daha düşük bir afiniteye sahip olduğunu gösterir. Bu, aktif bölgedeki desteğin sterik engelinden veya enzimin substrat bağlanması için gerekli esneklik kaybından kaynaklanabilir. Ayrıca enzimin katalizör olarak etkinliği, substrata ne kadar sıkı bağlandığına ve substratı ne kadar hızlı ürüne dönüştürdüğüne bağlıdır. Bu parametre K_{cat}/K_m ile ölçülür ve bu, bir enzimin toplam verimliliğinin daha iyi bir göstergesidir. (Sahoo vd., 2012). Optimum pH'da ve optimum sıcaklıkta her bir substrat derişimi için hem immobilize AChE ve BChE hem de serbest AChE ve BChE enzimlerinin aktivitesi belirlendi. Elde edilen verilerle Lineweaver-Burk grafiği çizilerek enzimatik reaksiyon için Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum reaksiyon hızı (V_{max}), K_{cat} ve K_{cat}/K_m , değerleri belirlendi (Ünlüer, 2015).

3.4. Stabilite çalışmaları

3.4.1. Optimum ve stabil pH'ın belirlenmesi

Optimum pH'nın belirlenmesi serbest ve immobilize enzimin aktivitesinin pH'ın bir fonksiyonu olarak karşılaştırılmasında faydalıdır. Enzim aktivitesine etki eden optimum pH'ın belirlenmesi için immobilize AChE ve serbest AChE enzim derişimleri eşit olacak şekilde alındı. pH'sı 4-11 aralığında 1M Tris-HCl çözeltisinde esteraz aktivitesi belirleme yöntemiyle enzim aktiviteleri incelendi. Sonuçlar çizelgelerle ve % aktivite-pH grafikleri halinde gösterildi. Serbest ve immobilize AChE ve BChE'nin en yüksek aktivite gösterdiği değer, optimum pH olarak belirlendi. Stabil pH belirlenirken de, immobilize AChE ve BChE ve serbest AChE ve BChE enzimi, yine pH'sı 4-11 aralığında 1M Tris-HCl çözeltisinde 4°C'de muhafaza edildi. Daha sonra 8 saat arayla yapılan esteraz aktivite ölçümünde, enzimin stabil olduğu pH belirlenecektir. İnkübasyon süresine karşılık, aktivite değerleri grafikler halinde gösterildi. Bu analizlerden elde edilen optimum pH değeri, diğer deneylerde kullanıldı (Şahin vd., 2005).

3.4.2. Optimum termal parametlerin belirlenmesi

Enzimlerin termal kararlılığı, uygulamalarının geliştirilmesi açısından en önemli kriterlerden biridir. Enzimlerin (serbest AChE ve BChE, ve immobilize AChE ve BChE) aktiviteleri, 25°C, 40°C, 60°C ve 80°C arasında değişen sıcaklıklarda pH 8, 1M Tris-HCl tamponunda 4 saatlik bir inkübasyondan sonra esteraz aktivite ölçüm yöntemi ile ölçüldü (Rodrigues de Melo vd., 2017).

3.4.3. Operasyonel stabilite

Kovalent bağlı immobilize enzimlerin en önemli özelliği, birçok kez kullanıldıktan sonra sabit bir aktiviteye sahip olabilmesidir. Yerli enzimlerin üretimi ve saflaştırılması pahalı olduğundan, endüstriyel uygulamalar için enzimin yüksek geri dönüşüm kapasitesi çok önemlidir. İmmobilizasyon işlemi için serbest AChE (1 mg/ 1 ml) destek materyali ile inkübe edildi. 0,01 ml Tris-HCl tamponu ve 0,05 ml asetiltiyokoliniyodat çözeltisinden oluşan reaksiyon karışımı, immobilize AChE'nin üzerine ilave edildi. Çalkalanan süspansiyon çözeltisi süzülecek ve absorbans, her 2 dakikalık aralıklarla UV spektrofotometrede 412 nm'de ölçüldü. İmmobilizasyondan sonra, her döngü arasında immobilize enzim bir mıknatıs yardımı ile manyetik olarak ayrıldı. Bu prosedür, immobilize AChE'nin asetiltiyokoliniyodat hidrolizi için 20 kez tekrarlandı (Jimenez-Carretero vd., 2023). Aynı işlemler BChE için de uygulandı.

3.4.4. Depolama stabilitesi

Enzim immobilizasyonu, enzim ve destek arasında oluşan hidrojen/zayıf iyonik bağların immobilize enzimin konformasyonel stabilitesini arttırması nedeniyle serbest enzime göre daha uzun raf ömrü sağlar (Yadav vd., 2012). Depolama stabilitesi çalışması için numuneler, 0,01 ml Tris-HCl tamponu (1 M, pH 8,5) içerisine yüklenen enzim (serbest ve immobilize) ile +4 derecede 60 gün süreyle inkübe edildi, serbest AChE ve BChE ve immobilize AChE ve BChE için depolama stabilitesi belirlendi. Biyokatalizrlerin hidrolizi için aktiviteleri, 10 gün 25°C’de 60 gün boyunca analiz edildi (şahin vd., 2005).

3.5. Nicosulfuron tayini uygulaması

Özellikle mısır üretiminde yaygın kullanılan nicosulfuron mısırdaki dar yapraklı ve bazı geniş yapraklı yabancı otların kontrolünde tercih edilir. Bitki tarafından yaprak ve köklerden alınarak ksilem ve floem aracılığıyla büyüme noktalarına taşınır. Bu yüzden pestisit kalıntılarının tayin edilmesinde önem arz eder. Bu bağlamda nicosulfuron tayin çalışması için mısır bitki ekstraktına 1mg/ml hazırlanacak olan nicosulfuron eklenerek enzim inhibisyon uygulaması yapılarak sonuçlar analiz edildi (Xiao vd., 2025; Mitrić vd., 2024).

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

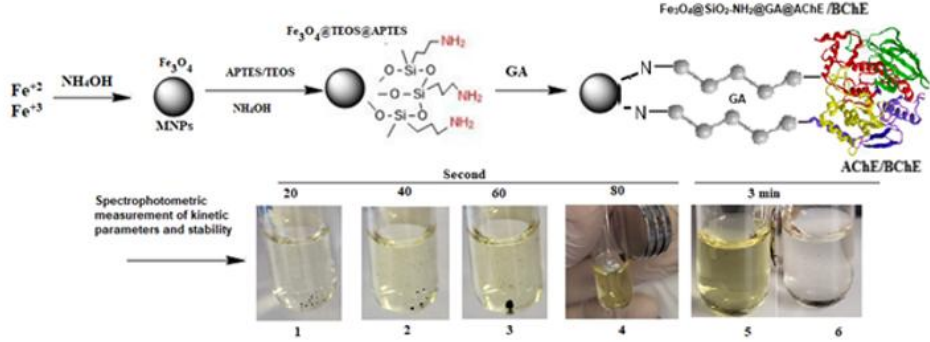
Enzimlerin immobilizasyonu, biyokatalizörlerin fiziksel ve kimyasal kararlılığını artırarak depolama, taşıma ve kullanım süreçlerinde aktivitelerinin korunmasına katkı sağlamaktadır. Serbest enzimlere kıyasla immobilize enzimler; sıcaklık, pH değişimleri ve organik çözücüler gibi çevresel koşullara karşı daha dirençli olup, reaksiyon sonrasında ortamdan kolaylıkla ayrılabilmesi sayesinde tekrar kullanılabilir. Bu özellikler, özellikle endüstriyel biyoproseslerde işlem maliyetlerinin azaltılması ve süreç verimliliğinin artırılması açısından enzim immobilizasyonunu önemli bir teknoloji haline getirmiştir (Lopes vd., 2025).

Son yıllarda enzim immobilizasyon stratejileri üzerine kapsamlı araştırmalar yürütülmüştür. Enzim immobilizasyonunda kullanılan yöntemler arasında kovalent bağlama, fiziksel adsorpsiyon, iyonik bağlanma, çapraz bağlama ve hapsedilme (entrapment) gibi farklı yaklaşımlar bulunmaktadır. Bu yöntemler içerisinde kovalent immobilizasyon, enzim ile taşıyıcı materyal arasında güçlü ve kalıcı bağların oluşmasını sağlayarak enzimin reaksiyon ortamından uzaklaşmasını büyük ölçüde engellemektedir. Fiziksel adsorpsiyon ve iyonik etkileşimlere dayalı sistemlerde görülebilen enzim sızıntısı, kovalent bağlama yönteminde önemli ölçüde azaltılmaktadır. Bu nedenle özellikle uzun süreli kullanım gerektiren biyoreaktör sistemleri ve biyosensör uygulamalarında kovalent immobilizasyon daha yüksek operasyonel kararlılık sunmaktadır (Prabhakar vd., 2025).

Kovalent immobilizasyon yönteminin sağladığı yüksek kararlılığa rağmen, bağlanma sırasında enzimin üç boyutlu yapısında meydana gelebilecek konformasyonel değişiklikler katalitik aktivitenin azalmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle immobilizasyon stratejileri geliştirilirken enzimin aktif merkezine müdahale edilmemesi büyük önem taşımaktadır. Enzimin taşıyıcı yüzeye, katalitik mekanizmada doğrudan görev almayan amino asit kalıntıları veya fonksiyonel grupları aracılığıyla yönlendirilmiş olarak bağlanması, aktif bölgenin erişilebilirliğini koruyarak enzim aktivitesinin yüksek düzeyde sürdürülmesine katkı sağlamaktadır. Günümüzde bölgeye özgü (site-directed) immobilizasyon yaklaşımları, bu amaç doğrultusunda en yaygın araştırılan yöntemler arasında yer almaktadır (Feng vd., 2023).

Bu çalışmada, fonksiyonelleştirilmiş Fe_3O_4 MNP'ler sentezlenmiştir. Tarımda yaygın olarak kullanılan organofosforlu pestisitlerin hidrolizinde önemli rol oynayan AChE ve BChE enzimleri, çapraz bağlayıcı ajan olarak GA kullanılarak bu fonksiyonelleştirilmiş MNP'ler üzerine immobilize edilmiştir. Daha sonra, immobilize edilen enzimin kinetik parametreleri ile

kararlılık özellikleri (depolama kararlılığı ve operasyonel kararlılık), stabilite çalışmaları spektrofotometrik yöntem kullanılarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1. AChE ve BChE'nin $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{GA}$ üzerine GA aracılığıyla çapraz bağlama yöntemiyle immobilizasyonu. Fonksiyonelleştirilmiş MNP'ler üzerine immobilize edilen enzimin aktivitesi 20–80 saniye aralığında ölçülmüştür. Zamanla sarı rengin artması, katalitik aktivitenin varlığını göstermektedir. 80 saniyenin (4) sonunda MNP'ler bir mıknatıs yardımıyla toplanarak ortamdaki uzaklaştırılmış ve tekrar kullanılmak üzere ayrılmıştır; ardından enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Burada, 3 dakikanın sonunda 5, enzim immobilizasyonu yapılmış MNP'leri ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{GA}$), 6 ise enzim immobilizasyonu yapılmamış MNP'leri ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{GA}/\text{AChE}/\text{BChE}$) temsil etmektedir.

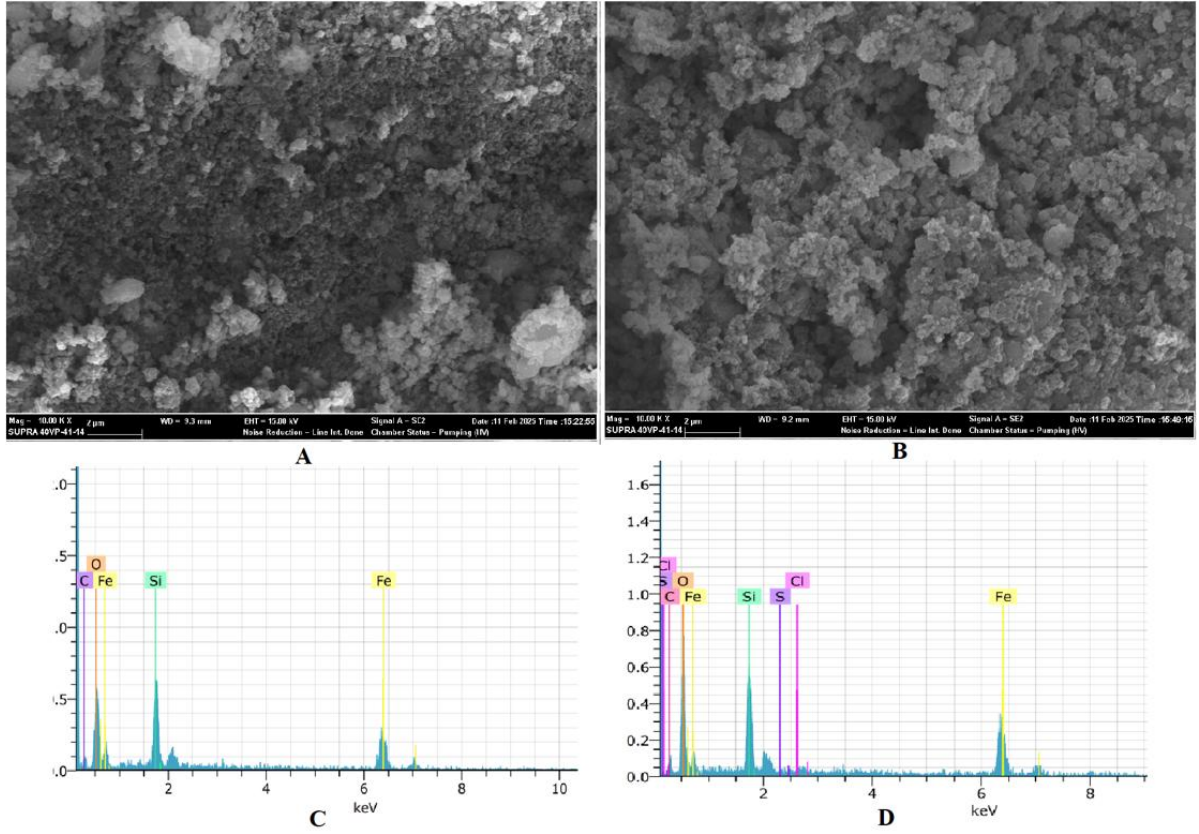
Elde edilen immobilize enzim ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{GA}/\text{AChE}$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{GA}/\text{BChE}$), Taramalı Elektron Mikroskobu-Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (SEM-EDX) ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTI-R) yöntemleriyle karakterize edilmiştir.

4.1. İşlevselleştirilmiş MNP'lerde AChE ve BChE'nin karakterizasyonu ve immobilizasyonunun değerlendirilmesi

GA, enzim immobilizasyonunda en yaygın tercih edilen bifonksiyonel çapraz bağlayıcı ajanlardan biridir. Proteinlerin amino gruplarıyla kovalent bağlar oluşturabilmesi sayesinde enzimin taşıyıcı yüzeyden ayrılmasını önemli ölçüde azaltmakta ve özellikle zorlu çalışma koşullarında immobilize enzimin mekanik ve operasyonel kararlılığını artırmaktadır. Literatürde farklı taşıyıcı materyaller ve immobilizasyon teknikleri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda, GA konsantrasyonu, immobilize edilen enzim miktarı ve çapraz bağlama süresinin immobilizasyon verimi ile enzim aktivitesini doğrudan etkileyen temel parametreler olduğu bildirilmektedir (Barbosa vd., 2013).

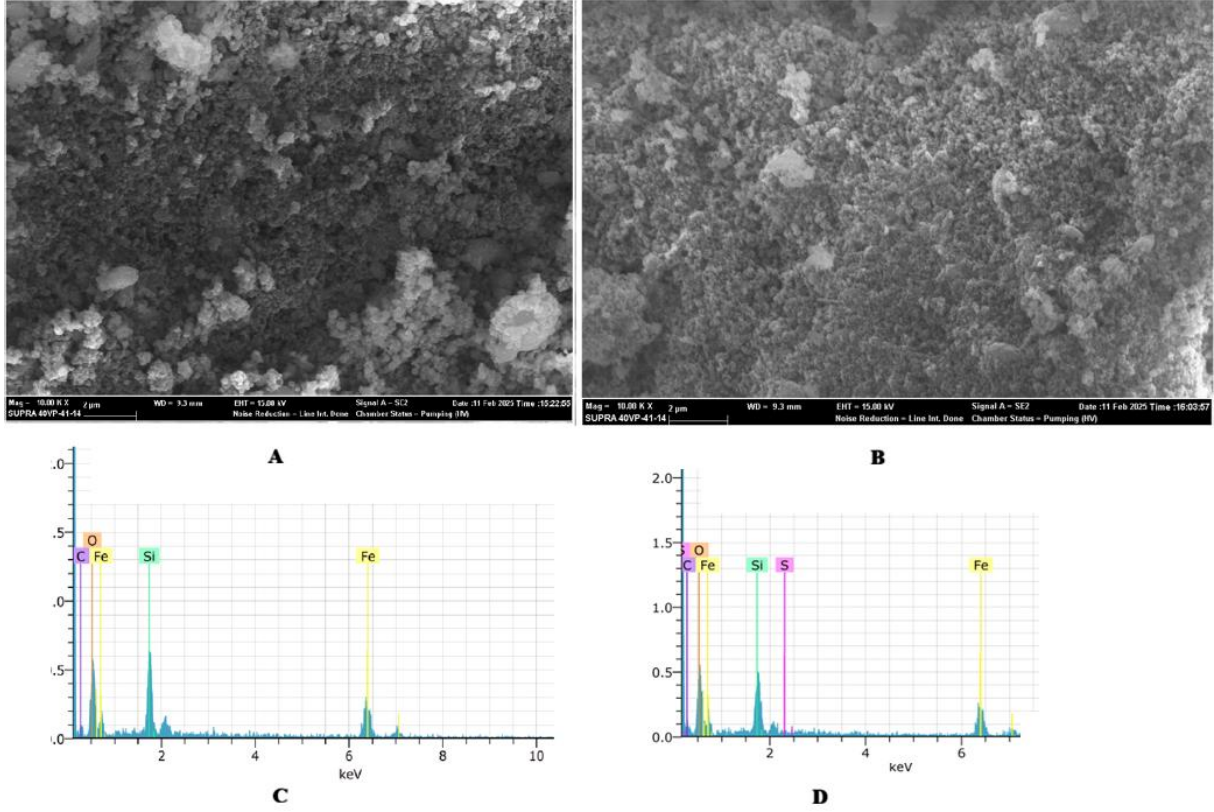
Bu çalışmada, literatürde optimize edildiği bildirilen uygun GA konsantrasyonu kullanılmıştır. İmmobilizasyon verimliliğini değerlendirmek amacıyla, AChE ve BChE enzimlerinin destek materyaline (fonksiyonelleştirilmiş MNP'ler) bağlanmasının ardından % immobilizasyon oranı hesaplanmıştır. Sonuç olarak, AChE ve BChE enzimlerinin %68'inin fonksiyonelleştirilmiş MNP'ler üzerine immobilize olduğu belirlenmiştir. Spektroskopik analizler sonucunda, immobilizasyon sonrasında (üç kez yıkama işlemi sonrası) destek materyali filtratlarında proteine rastlanmaması ve immobilize enzimlerin aktivitesinde herhangi bir azalma gözlenmemesi, çapraz bağlama yöntemiyle immobilizasyonun minimum enzim sızıntısı ile başarıyla gerçekleştirildiğini düşündürmektedir (Dong vd.,2025; Necip, 2025).

Sentezlenen materyallerin morfolojisini ve yüzey özelliklerini incelemek amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi gerçekleştirilmiştir. SEM analizleri, MNP'ler, amin ile fonksiyonelleştirilmiş MNP'ler ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$) ve immobilize AChE/BChE sistemi için yapılmıştır. Şekil 4.2 ve 4.3'te gösterildiği üzere, Fe_3O_4 MNP'leri ağırlıklı olarak küresel morfolojiye, düzgün yüzeylere ve nispeten homojen bir dağılıma sahip olup, ortalama parçacık boyutları yaklaşık 10 nm olarak belirlenmiştir. Yüzeyin amin grupları ile modifiye edilmesinin ardından nanoparçacıklarda agregasyonun arttığı, daha düzensiz ve karmaşık yüzey özelliklerinin olduğu gözlenmiştir; bu durum fonksiyonelleştirmenin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermiştir (Villa vd., 2016).



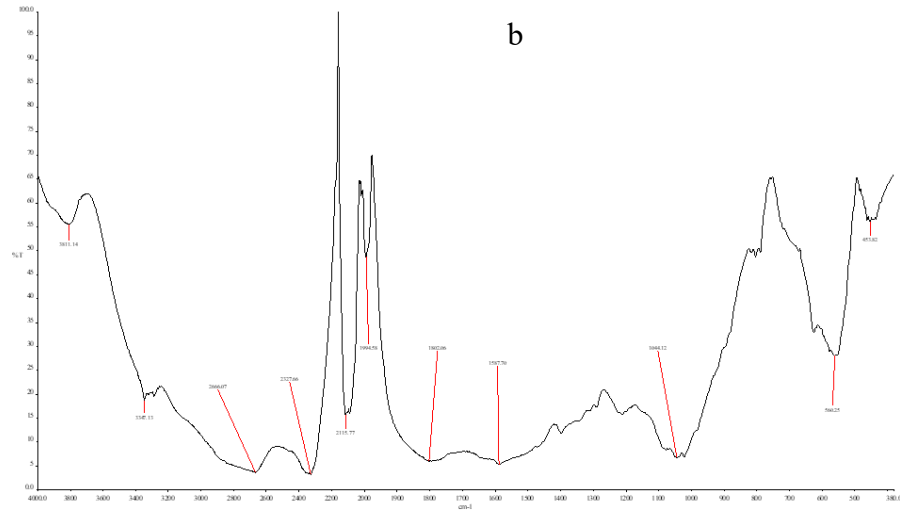
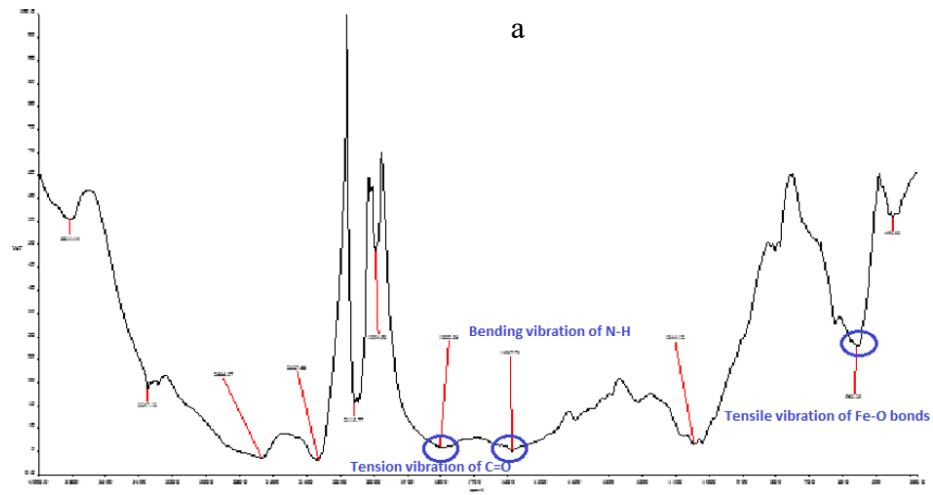
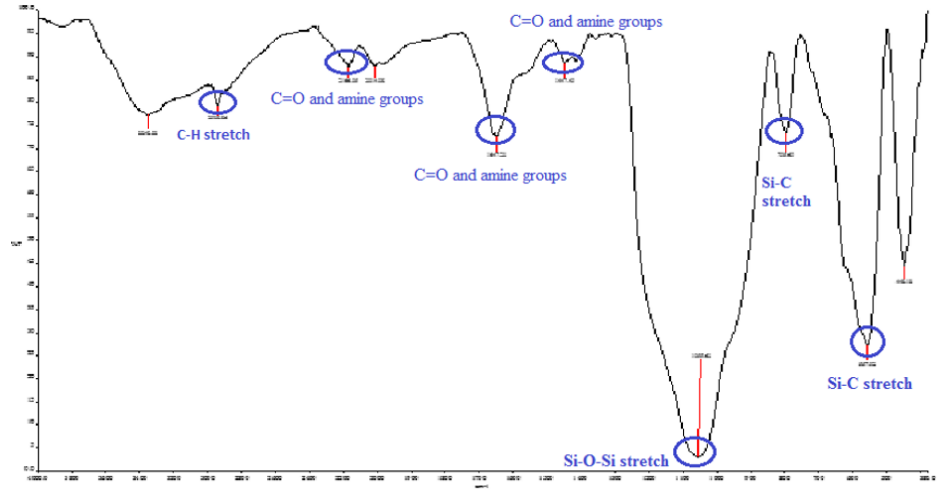
Şekil 4.2. İmmobilizasyon sonrası (A,C) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{GA}$ ve (B,D) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{GA}/\text{AChE}$ 'nin SEM-EDX analizi.

SEM-EDX analizleri, AChE ve BChE immobilizasyonu öncesi ve sonrasında fonksiyonelleştirilmiş MNP yüzeyinde meydana gelen morfolojik ve elementel değişimleri incelemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.2 ve 4.3'te görüldüğü üzere, immobilizasyon öncesinde fonksiyonelleştirilmiş MNP'ler nispeten düzgün bir yüzey yapısı sergilemiştir. Buna karşılık, AChE ve BChE enzimlerinin bağlanmasının ardından yüzey pürüzlülüğünde belirgin bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.2 ve 4.3). Bu değişim, enzimin başarıyla immobilize edildiğini göstermektedir. Elde edilen bulgular, AChE'nin ve BChE'nin GA aracılığıyla fonksiyonelleştirilmiş MNP yüzeyine etkin bir şekilde çapraz bağlandığını doğrulamaktadır (Sheldon ve van Pelt., 2013).



Şekil 4.3. İmmobilizasyon sonrası (A,C) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{GA}$ ve (B,D) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2/\text{GA}/\text{BChE}$ 'nin SEM-EDX analizi.

İmmobilizasyon öncesi ve sonrası fonksiyonelleştirilmiş MNP'lere ait FT-IR spektrumları (Şekil 4.4 a,c) sunulmuştur. FT-IR ölçümleri sonucunda $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ aralığında transmisyon spektrumları elde edilmiştir. İmmobilizasyon öncesinde gözlenen $1055,63\text{ cm}^{-1}$ (Si—O—Si gerilme titreşimi) ve $2938,86\text{ cm}^{-1}$ (C—H gerilme titreşimi) pikleri, TEOS'un varlığını göstermektedir. $557,92$ ve $795,69\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen pikler ise APTES kaynaklı Si—C gerilme titreşimleri ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca, $1447,49$, $1647,23$ ve $2166,05\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen pikler sırasıyla Si—O—Si, C=O ve amin gruplarının varlığını göstermekte olup, TEOS, APTES ve GA'nın başarıyla yapıya dahil edildiğini doğrulamaktadır. İmmobilizasyon sonrasında elde edilen AChE spektrumunda, $1802,06\text{ cm}^{-1}$ ve $1587,70\text{ cm}^{-1}$ pikleri sırasıyla C=O gerilme titreşimi ve N—H bükülme titreşimine karşılık gelmektedir. Ayrıca, $560,25\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen absorpsiyon bandı Fe_3O_4 yapısındaki Fe—O bağlarının gerilme titreşimini temsil etmektedir. Bu bulgular, AChE'nin ve BChE'nin MNP/TEOS/APTES yüzeyine başarıyla immobilize edildiğini göstermektedir.



c

Şekil 4.4. İmmobilizasyon öncesi (a:MNP/TEOS/APTES/GA), sonrası (b:MNP/TEOS/APTES/GA/ACHe ve c:MNP/TEOS/APTES/GA/BChE) FT-IR spektrumları

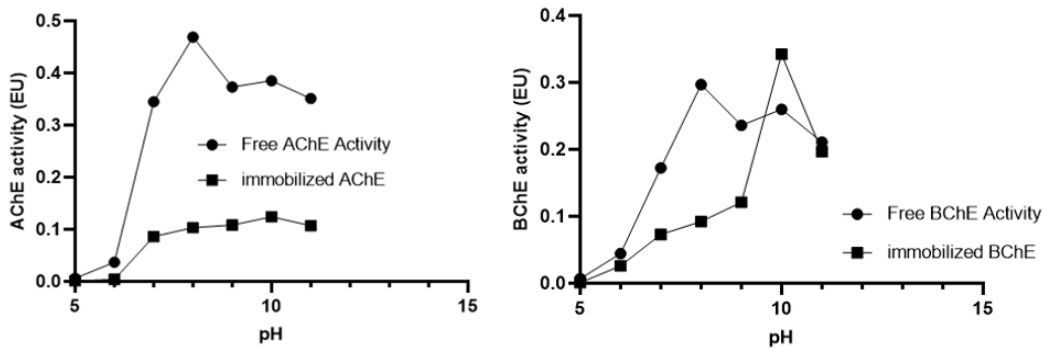
Sentezlenen ve fonksiyonelleştirilen nanoparçacıklar ile immobilize edilmiş AChE'nin ve BChE'nin FT-IR analizleri, yüzey modifikasyonunun aşamalı olarak başarıyla gerçekleştirildiğini ve enzimin etkin bir şekilde bağlandığını desteklemektedir. Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 3340 ve 1618 cm^{-1} 'de gözlenen karakteristik piklerin sırasıyla Fe_3O_4 MNP'lerinin O—H gerilme ve deformasyon titreşimlerine ait olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, 2920 cm^{-1} ve 2851 cm^{-1} 'de gözlenen absorpsiyon bantları, amin ile fonksiyonelleştirilmiş MNP'lerde (MNPs-NH_2) bulunan $-\text{CH}_2$ ve C-H gerilme titreşimleri ile ilişkilendirilmiştir. İmmobilizasyon sonrasında ise C=O gerilme ve N-H bükülme titreşimlerinin sırasıyla 1660 ve 1537 cm^{-1} 'ye kayması, AChE'nin nanoparçacık yüzeyine kovalent etkileşimler yoluyla başarıyla bağlandığının bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir (Zhang vd., 2022).

Bu çalışmada elde edilen bulgular da söz konusu sonuçlarla uyumludur. FT-IR spektrumlarında, modifikasyonun her aşamasına ait benzer karakteristik pikler gözlenmiştir. İmmobilize AChE'ye ve BChE'ye ait spektral kaymalar, enzimin bağlanmasına bağlı olarak meydana gelen konformasyonel değişiklikleri işaret etmekte olup, literatürde bildirilen sonuçlarla iyi bir uyum göstermektedir.

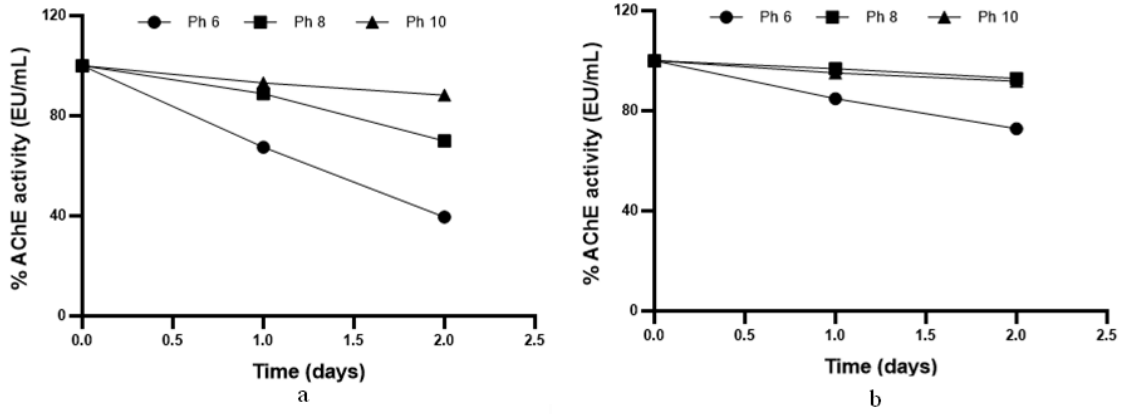
4.2. Stabilité çalışmalarının değerlendirilmesi

4.2.1. Optimum ve stabil pH analizlerinin değerlendirilmesi

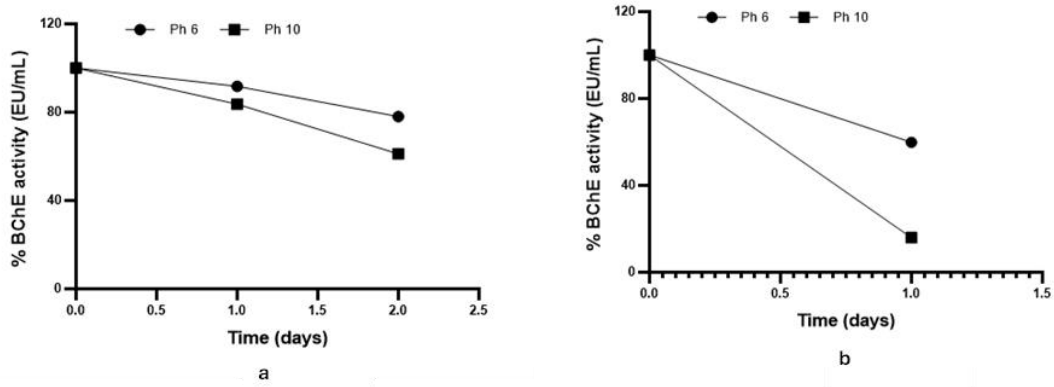
Serbest ve immobilize AChE ve BChE enzimlerinin aktivitesi, pH 5–11 aralığında belirlenmiştir. Şekil 4.2.1.1'de görüldüğü üzere, serbest enzim en yüksek bağıl aktivitesine pH 8'de ulaşırken, immobilize enzim en yüksek bağıl aktivitesini pH 10'da göstermiştir. pH'ya bağlı olarak enzim aktivitesinin arttığı, ancak serbest enzim için pH 8'den, immobilize enzim için ise pH 10'dan sonra aktivitenin azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 4.5. Serbest ve immobilize enzimlerin optimum pH grafiği



Şekil 4.6. Serbest AChE (b) ve İmmobilize AChE'nin (a) pH stabilitesi



Şekil 4.7. Serbest BChE (b) ve immobilize BChE'nin (a) pH stabilitesi

Hasanoğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, serbest enzim ile manyetik biyokompozitler ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Cht}/\text{Au}$) üzerine immobilize edilen AChE enziminin optimum pH değerinin 8 olduğu bildirilmiştir (Hasanoğlu vd.,2024). Kumar ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada ise çapraz bağlanmış enzimlerde optimum pH'ın 9 olduğu serbest enzimde ise bu pH değerinin 8 olduğu gözlenmiş ve bu durum, çapraz bağlanma işlemi sırasında GA ile enzim yüzeyindeki veya kalıntı yük grupları arasındaki etkileşimlere bağlanmıştır (Kumar vd.,2017).

Aynı şekilde BChE enziminin immobilizasyonuna yönelik çalışmalarda da, serbest ve immobilize enzimlerin optimum aktivitesini genellikle nötr ile hafif alkali pH aralığında (yaklaşık pH 7,5–8,5) gösterdiği bildirilmiştir. GA ile gerçekleştirilen kovalent immobilizasyon uygulamalarında ise enzimin optimum pH değerinde hafif değişimler meydana gelebilmekte ve bu durumun, çapraz bağlanma sonucunda enzimin mikroçevresinin ve yüzey yük dağılımının değişmesine bağlı olduğu ifade edilmektedir (Soldatkin vd., 2024). Benzer şekilde, Gong ve arkadaşları tarafından geliştirilen kovalent olarak immobilize edilmiş BChE tabanlı

biyosensörde enzimin immobilizasyon sonrasında yüksek aktivitesini ve kararlılığını koruduğu, immobilizasyonun enzimin çalışma pH aralığını genişleterek biyosensör performansını iyileştirdiği rapor edilmiştir (Gong vd., 2025).

Bu bulgularla uyumlu olarak, bizim çalışmamızda gözlenen optimum pH değişiminin de enzim immobilizasyonu sırasında meydana gelen benzer etkileşimlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu sonuçlar, GA aracılı çapraz bağlanmanın enzimin mikroçevresini değiştirebildiğini ve bunun da enzimin farklı pH koşullarındaki katalitik davranışını etkileyebileceğini göstermektedir.

Çalışmada, serbest ve immobilize AChE ve BChE'nin pH 6–10 aralığındaki pH kararlılığı 1–2 gün boyunca incelenmiştir. Şekil 4.2.1.2'de görüldüğü gibi, hem serbest hem de immobilize enzimler pH 8–10 aralığında daha yüksek kararlılık göstermiştir. Immobilize enzim en yüksek kararlılığı pH 10'da gösterirken, serbest enzim için bu değer pH 8–10 aralığında belirlenmiştir.

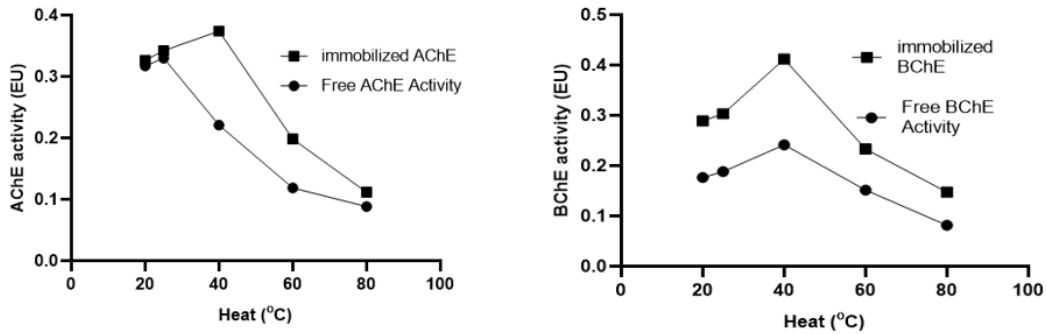
Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, bu değişimin pH'ya bağlı olarak enzimin üç boyutlu konformasyonel yapısındaki değişiklikler ve immobilizasyon işlemi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Literatürde, AChE'nin ve BChE'nin kaynağına ve kullanılan taşıyıcı materyale bağlı olarak optimum ve kararlı pH değerlerinin 8–10 aralığında değiştiğinin bildirilmiş olması, bu çalışmada elde edilen bulguları desteklemektedir.

4.2.2. İmmobilize ve serbest enzimlerin termal parametrelerinin değerlendirilmesi

Şahin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, AChE'nin immobilizasyonu için farklı kaynaklardan elde edilen aljinat ve karagenan kullanılarak yeni bir matriks geliştirilmiştir. Bu çalışmada, hem immobilize AChE hem de serbest AChE için optimum sıcaklık yaklaşık 30 °C olarak belirlenmiştir. 40 °C'de serbest ve immobilize enzimler aktivitelerinin sırasıyla yaklaşık %80 ve %51' kaybetmiştir (Şahin vd., 2005).

BChE enzimi ile gerçekleştirilen çalışmalarda, immobilizasyonun enzimin sıcaklığa karşı direncini artırabildiği, ancak optimum çalışma sıcaklığının kullanılan taşıyıcı materyale ve immobilizasyon yöntemine bağlı olarak değişebildiği bildirilmektedir. Özellikle immobilize BChE ile gerçekleştirilen kromatografik enzim reaktörü çalışmalarında sıcaklık artışının enzim aktivitesini önemli ölçüde etkilediği, kontrollü sıcaklık koşullarında enzimin maksimum katalitik performans gösterdiği ve immobilizasyon işleminin serbest enzime kıyasla sıcaklık değişimlerine karşı enzim davranışını büyük ölçüde koruduğu belirlenmiştir (Barreto vd.,

2008). Benzer şekilde, insan serumundan saflaştırılan BChE üzerinde yapılan termal inaktivasyon çalışmalarında enzimin 45 °C'de belirli bir süre inkübasyonu sonucunda daha kararlı bir konformasyona geçtiği ve Michaelis–Menten kinetiği sergilediği, daha düşük veya daha yüksek sıcaklıklarda ise aktivite kaybı ve kinetik davranışta değişikliklerin meydana geldiği rapor edilmiştir (Cengiz vd., 2002). Ayrıca immobilize kolinesteraz enzimleri üzerinde gerçekleştirilen kinetik araştırmalar, immobilizasyonun protein yapısının açılmasını sınırlandırarak termal inaktivasyon hızını azalttığını ve böylece enzimin yüksek sıcaklıklarda daha uzun süre aktif kalmasına katkı sağladığını göstermektedir (Bromberg ve ark., 2008). Bu bulgular, BChE immobilizasyon çalışmalarında sıcaklığın yalnızca reaksiyon hızını değil, aynı zamanda enzimin yeniden kullanılabilirliği ve operasyonel stabilitesini de doğrudan etkileyen kritik bir optimizasyon parametresi olduğunu ortaya koymaktadır.



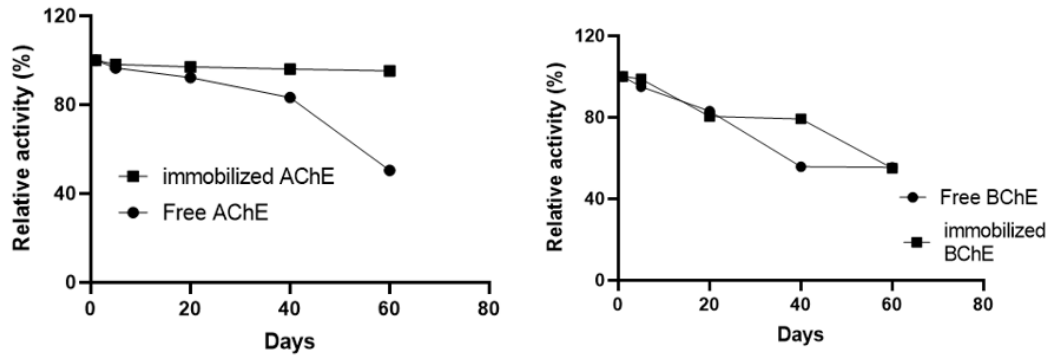
Şekil 4.8. İmmobilize ve serbest enzimlerin optimum sıcaklık grafikleri

Bu çalışmada ise AChE ve BChE serbest enzimleri için optimum sıcaklık 25 °C, immobilize enzimler için ise 40 °C olarak belirlenmiştir (şekil 4.2.2.1). Ayrıca, 40–60 °C sıcaklık aralığında immobilize enzimin termal kararlılığının, hem serbest enzime hem de yukarıda bahsedilen çalışmada bildirilen değerlere kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür.

4.2.3. Kararlılık ve yeniden kullanılabilirliğin değerlendirilmesi

AChE'nin PVA/BSA nanolif membranlar üzerine immobilizasyonunu inceleyen bir çalışmada, immobilize enzimin 4 °C'de fosfat tampon çözeltisinde 100 gün depolanmasının ardından katalitik aktivitesinin %90'ını koruduğu gösterilmiştir. Bu bulgu, immobilizasyonun AChE'nin kararlılığını önemli ölçüde artırdığını ortaya koymaktadır (Moradzadegan vd., 2010). Başka bir çalışmada ise AChE enzimi bir biyo-nanokompozit yüzeyine immobilize edilmiştir. 30 gün sonunda serbest AChE katalitik aktivitesinin %50'den fazlasını kaybederken, immobilize AChE başlangıç aktivitesinin %82'sini korumuştur (Hasanoğlu vd., 2024).

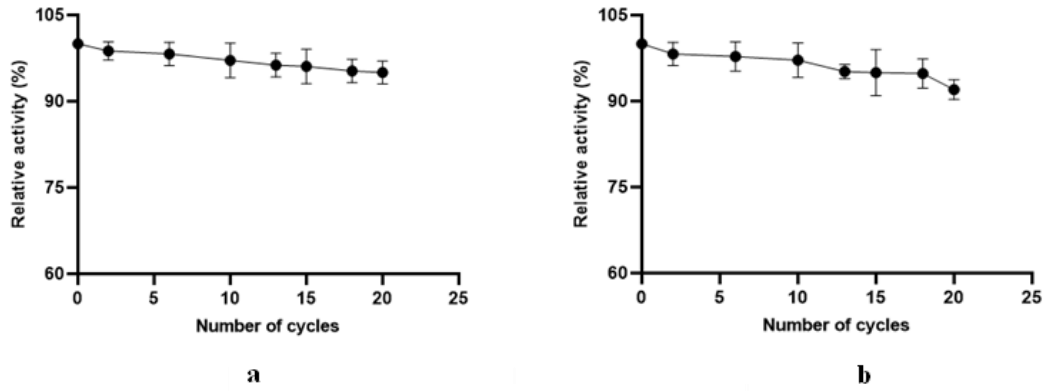
BChE enziminin immobilizasyonu üzerine gerçekleştirilen çalışmalarda, farklı biyopolimer matrikslerin enzimin katalitik aktivitesi ve stabilitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Özellikle doğal polimer esaslı jel sistemlerinde immobilize edilen BChE'nin, serbest enzime kıyasla depolama ve operasyonel stabilitesinin önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir. Naryzhny ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada, nişasta ve jelatin bazlı doğal polimer jellerine immobilize edilen BChE örneklerinin enzimatik aktivitelerini yaklaşık 300 gün boyunca yaklaşık %99 koruduğu ve immobilizasyon işleminin enzimin analitik uygulamalardaki kullanım ömrünü belirgin şekilde uzattığı gösterilmiştir (Naryzhny vd., 2018). Benzer şekilde, BChE'nin biyosensör ve biyokatalitik uygulamalarda kullanımına yönelik güncel araştırmalarda, immobilizasyonun enzimin yapısal kararlılığını artırdığı, çevresel koşullara karşı dayanıklılığını geliştirdiği ve tekrar kullanılabilirliğini desteklediği rapor edilmiştir (Xing vd., 2021).



Şekil 4.9. Serbest ve immobilize AChE ve BChE enzimleri 60 günlük depolama stabilitesi grafikleri

Bu çalışmada, serbest ve immobilize AChE ve BChE enzimleri, kararlılıklarının değerlendirilmesi amacıyla 4 °C'de 60 gün boyunca depolanmıştır. Şekil 4.2.3.1'de gösterildiği üzere, immobilize AChE serbest enzime kıyasla belirgin derecede daha yüksek kararlılık sergilemiştir. Serbest AChE, 40 gün sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık %83,2'ünü korurken, immobilize AChE aynı süre sonunda aktivitesinin %96,2'sini muhafaza etmiştir. İmmobilize BChE enzimi için ise 40 günün sonunda %79,2 başlangıç aktivitesini korurken serbest BChE'de ise %55,7'sini koruduğu görülmüştür. Bu yüksek kararlılığın, enzim ile taşıyıcı materyal arasında oluşan çapraz bağların, immobilize enzimin konformasyonel bütünlüğünü güçlendirmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu bulgular, immobilizasyonun serbest enzime kıyasla enzimin raf ömrünü uzattığını göstermektedir.

Bir başka çalışmada, polivinil alkol ve sığır serumu membranları üzerine immobilize edilen AChE'nin 10 reaksiyon döngüsü sonunda enzim aktivitesinin yaklaşık %50'sini kaybettiği bildirilmiştir (Moradzadegan vd., 2010). Benzer şekilde, farklı bir taşıyıcı materyal üzerine immobilize edilen AChE de 10 yeniden kullanım döngüsü sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık %50'sini korumuştur (Gabrovska vd., 2008). Bu sonuçlar, farklı taşıyıcı materyaller üzerinde immobilize edilen AChE'nin yeniden kullanılabilirliğinin ve kararlılığının arttığını göstermektedir.



Şekil 4.9. İmmobilize AChE (a) ve immobilize BChE (b)'nin 20 ardışık reaksiyon döngüsü grafikleri

Bizim çalışmamızda ise immobilize AChE ve BChE enzimlerinin yeniden kullanılabilirliği 20 ardışık reaksiyon döngüsü boyunca değerlendirilmiştir (Şekil 4.2.3.2.). Elde edilen sonuçlar, immobilize AChE'nin ve BChE'nin 20 döngü sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık %95'ini koruduğunu göstermiştir. Bu durum, enzimin son derece yüksek kararlılığa ve dayanıklılığa sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Mevcut çalışmada elde edilen bu sonuçlar, literatürde bildirilen çalışmalara kıyasla operasyonel stabilitesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Şekil 4.2.3.2'de görüldüğü gibi, enzim 20 ardışık reaksiyon döngüsünden sonra bile başlangıç aktivitesinin %95'inden fazlasını muhafaza etmiştir. Aktivitenin bu denli yüksek oranda korunması, GA aracılığıyla fonksiyonelleştirilmiş $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ nanoparçacıkları üzerine immobilize edilen AChE'nin ve BChE'nin oldukça kararlı bir immobilizasyon matriksi oluşturduğunu göstermektedir. GA aracılığıyla fonksiyonelleştirilmiş manyetik nanoparçacıklar üzerine kovalent olarak immobilize edilen enzimlerin yüksek operasyonel stabilite göstermesi, GA'nın enzim ile taşıyıcı arasında oluşturduğu güçlü kovalent bağların enzimin yapısal bütünlüğünü koruması ve immobilizasyonun enzim molekülünün konformasyonel hareketliliğini sınırlandırması ile açıklanabilir. Ayrıca, manyetik nanoparçacıkların sağlam yapısı ve yüzeyde bulunan

fonksiyonel grupların oluşturduğu uygun mikroçevre, enzimin reaksiyon ortamındaki denatürasyonunu ve taşıyıcıdan ayrılmasını azaltarak tekrarlı kullanımlarda aktivitenin korunmasına katkı sağlamaktadır (Öz vd., 2022)

4.3. Kinetik parametrelerin değerlendirilmesi

Litertürdeki çalışmalarda, AChE, yeni sentezlenen bir taşıyıcı materyal üzerine immobilize edilmiştir. Kinetik parametreler değerlendirildiğinde, serbest enzim için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 6,35 ve 50 mM dk⁻¹ olarak belirlenirken, immobilize enzimler için bu değerler sırasıyla 8,68 ve 12,7 (Km) ile 39,7 ve 52,9 mM dk⁻¹ (V_{max}) olarak bulunmuştur (Şahin vd., 2005). AChE'nin PVA/BSA nanolif membranları üzerine immobilizasyonunu inceleyen önceki bir çalışmada ise, immobilize enzimin K_m değerinin serbest enzim formuna kıyasla yaklaşık 1,7 kat arttığı bildirilmiştir (Moradzadegan vd., 2010).

BChE için ise literatürde farklı taşıyıcı materyaller üzerine immobilizasyonu ile ilgili çalışmalar bulunmakla birlikte, kinetik parametrelerin serbest ve immobilize enzim formları arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Immobilizasyon işlemi, enzimin mikroçevresini değiştirerek substrata erişimini ve konformasyonel hareketliliğini etkileyebilmekte; bu durum genellikle K_m değerinde artış veya V_{max} değerinde değişimler şeklinde gözlenmektedir. Bartolini ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, immobilize BChE sistemlerini yeni inhibitörlerin karakterizasyonunda kullanmış ve immobilizasyonun enzimin analitik uygulamalardaki kullanım potansiyelini artırabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, BChE için immobilize enzimde K_m 1,0 ± 0,10 mM, V_{max} değeri 0,721 ± 0,021 µmol dk⁻¹ olarak belirlemiştir (Bartolini vd., 2009).

Tablo 2.3. Serbest ve immobilize enzimlerin kinetik parametreleri

Enzyme Samples	K_m (µM)	V_{max} (EU mL ⁻¹)	K_I (µM)
Free AChE	0.163±0.01	0.965±0.07	12.10±1.02
Immobilized AChE	0.446±0.03	0.659±0.05	21.64±1.84
Free BChE	0.177±0.01	0.587±0.07	19.89±1.02
Immobilized BChE	0.438±0.03	0.527±0.05	13.54±1.84

Bu çalışmada, hem serbest hem de immobilize AChE ve BChE enzimlerinin kinetik parametreleri, farklı derişimlerde asetiltiyokolin iyodür ve bütiriltiyokolin iyodür substratları kullanılarak belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar serbest enzim ile karşılaştırılmıştır (Tablo 2.3). Buna göre, immobilize AChE için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,446 μM ve 0,659 EU mL⁻¹ olarak hesaplanırken, serbest AChE için bu değerler sırasıyla 0,163 μM ve 0,965 EU mL⁻¹ olarak bulunmuştur. İmmobilize BChE için ise K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,438 μM ve 0,527 EU mL⁻¹ olarak hesaplanırken, serbest BChE için bu değerler sırasıyla 0,177 μM ve 0,587 EU mL⁻¹ olarak bulunmuştur.

AChE ve BChE enzimlerinin bilinen bir inhibitörü olan takrinin ve pozitif kontrol olarak kullanılan enzime bağlanma afinitesini gösteren K_I değeri incelendiğinde, serbest AChE ve BChE K_I değerlerinin sırasıyla 12.10 ve 19.89 μM , aynı şekilde immobilize AChE ve BChE enzimleri için sırasıyla 21.64 ve 13.54 μM olduğu raporlanmıştır (Tablo 2.3). Bu durumda immobilize enzime ait K_I değerinin serbest enzime göre daha yüksek olduğu ve buna bağlı olarak takrinin immobilize AChE'ye bağlanma afinitesinin serbest AChE'ye göre daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Önceki yıllarda yapılan çalışmalarda, modifiye kitosan boncukları üzerine immobilize edilen Horseradish peroxidase (HRP)'de substrata bağlanma afinitesinin azaldığı, serbest enzime kıyasla K_m değerlerindeki artış ile ortaya konmuştur; C2 ve C5 ile immobilize edilen HRP için K_m değerleri sırasıyla 2,875 ve 3,784 mmol L⁻¹ iken, serbest HRP'de bu değer 2,235 mmol L⁻¹ olarak belirlenmiştir. Ayrıca, immobilize enzimlerde V_{max} değerlerinin serbest enzime göre azalması (C2: 0,917, C5: 0,656 ve serbest HRP: 1,153 mmol dk⁻¹ mg⁻¹), immobilizasyonun substratın enzimin aktif bölgesine erişimini ve bağlanma etkinliğini olumsuz etkilediğini göstermektedir. (Monier vd., 2010). Bu çalışmada gözlenen K_m değerindeki artış ve V_{max} değerindeki azalma, MNP yüzeylerine immobilize edilen AChE'nin substratına karşı afinitesinin azaldığını göstermektedir. Bu azalmanın, enzimin MNP yüzeyine bağlanması sonucu hareketliliğinin kısıtlanması ve bunun enzimin üç boyutlu konformasyonunda meydana getirdiği olası değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Buna ek olarak, immobilizasyon işlemi sırasında oluşan sterik engeller, substratın enzimin aktif bölgesine erişimini zorlaştırarak enzimatik aktivitenin azalmasına katkıda bulunmuş olabilir. AChE ve BChE'nin fonksiyonelleştirilmiş MNP yüzeyine GA aracılığıyla bağlanması, enzimin esnekliğini sınırlandırabilir ve sterik engel oluşturarak substratın katalitik bölgeye göre yönelimi ve konumlanmasını olumsuz etkileyebilir. Ayrıca, immobilizasyon

matriksi; pH, polarite ve yük dağılımı bakımından hacim çözeltisinden farklı bir mikroçevre oluşturarak enzimin katalitik aktivitesini etkileyebilir. Bu faktörlerin tümü birlikte değerlendirildiğinde, çalışmada gözlenen kinetik davranışı açıklayabilmektedir.

4.4. Pestisit tayininde uygulanabilirlik

AChE ve BChE, özellikle organofosforlu ve karbamat grubu pestisitlerin belirlenmesinde biyolojik tanıma elemanı olarak kullanılan önemli enzimlerdir. Bu pestisitler, kolinesteraz enzimlerinin aktif bölgelerine bağlanarak enzim aktivitesini inhibe etmekte ve bu inhibisyon miktarı pestisit konsantrasyonunun belirlenmesinde analitik bir sinyal olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda AChE temelli elektrokimyasal, optik ve nanomalzeme destekli biyosensörlerin geliştirilmesiyle pestisitlerin hızlı, hassas ve düşük maliyetli tayini mümkün hale gelmiştir (Alex ve Mukherjee, 2020). Singh ve arkadaşlarının çalışmada, AChE inhibisyon prensibine dayalı nano-arayüzü elektrokimyasal bir sensör geliştirerek organofosforlu pestisitlerin hızlı tespit edilebileceğini göstermiştir. Araştırmacılar, nanomalzemelerin elektrot yüzeyinde kullanılmasıyla sensör hassasiyetinin ve sinyal yanıtının artırıldığını bildirmiştir (Singh vd.,2020). Benzer şekilde Korram ve arkadaşlarının, AChE enzimi ile kuantum noktalarının birlikte kullanıldığı floresans tabanlı bir yöntem geliştirerek organofosforlu pestisitlerin tayininde yüksek duyarlılık elde etmiştir (Korram vd., 2020).

BChE enzimi de AChE'ye benzer şekilde pestisit maruziyetinin belirlenmesinde biyobelirteç ve biyosensör bileşeni olarak değerlendirilmektedir. Özellikle organofosforlu bileşiklerin BChE aktivitesini azaltması, enzimin çevresel ve biyolojik örneklerde pestisit varlığının izlenmesinde kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Marcherya, 2020). Bununla birlikte AChE tabanlı sistemler, pestisitlerin doğrudan enzim inhibisyon mekanizmasına dayanması nedeniyle literatürde daha yaygın olarak incelenmiştir. BChE için ise bu çalışmalar sınırlı sayıda gözlenmektedir. Son çalışmalar, enzim immobilizasyon teknikleri, nanokompozit elektrotlar ve çoklu algılama platformları ile AChE/BChE tabanlı sensörlerin seçicilik ve kararlılığının artırılabilceğini göstermektedir (Zhang vd., 2025).

Bu çalışma kapsamında ise nicosulfuronun farklı konsantrasyonda kolinesteraz enzimleri üzerindeki % inhibisyon değerleri ölçülmüştür. Bu %inhibisyon değerlerine bağlı olarak gerçek numunedeki (mısır) nicosülfuron miktarı spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir (Tablo 2.4).

Tablo 2.4: Pestisit tayin uygulaması

Enzimler	Kontrol	Bitki Ekstraktı *	Pestisit Eklenmiş ** Bitki Ekstraktı
AChE (EU)	3.042	2.704	2.138
BChE (EU)	3.094	2.734	1.087
*: 2ml mısır ekstraktı			
**: 2ml mısır ekstraktına eklenmiş 10mg nicosulfuron ekstraktı			

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

AChE ve BChE enzimlerin üretim ve saflaştırma süreçleri ile ilgili yüksek maliyetleriyle birlikte operasyonel stabilitelerinin zayıf olması, yüksek sıcaklık ve pH değişimlerine karşı hassas olmaları, kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Bu araştırma, AChE ve BChE'nin fonksiyonelleştirilmiş MNP'ler üzerine immobilize edilmesini ve biyokatalizörlerin hızlı manyetik ayırma yoluyla yeniden kullanılmasını sağlayarak maliyetleri düşürdüğünü gösteren bir çalışmadır. İmmobilize edilmiş AChE ve BChE'nin iyi aktivite gösterdikleri aynı zamanda da 20 ardışık kullanımdan sonra yaklaşık %95 aktivitesini koruduğu saptanmıştır. Bu önemli operasyonel stabilite adımı maliyetleri düşürüp endüstriyel uygulamalar için kullanılabilirliği artırmada önem arz etmektedir. Bunun yanı sıra, immobilizasyon işlemi uygulanan AChE ve BChE enzimlerinin, serbest enzim formlarına kıyasla çevresel koşullardaki değişimlere karşı daha yüksek tolerans gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle pH ve sıcaklık değişimleri altında immobilize enzimlerin katalitik aktivitelerini daha uzun süre koruyabildiği ve daha iyi performans sergilediği görülmüştür. Ayrıca, immobilize edilmiş enzimlerin depolama sürecindeki kararlılığının serbest enzimlere göre daha yüksek olduğu ve aktivite kayıplarının daha düşük seviyede gerçekleştiği rapor edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, MNP destekli immobilizasyon sistemlerinin enzimlerin yeniden kullanılabilirliğini artırdığı, kolay ayrılma ve geri kazanım avantajı sağladığı ortaya konmuştur. Böylece immobilize enzim teknolojisinin, serbest enzimlerin düşük stabilite ve sınırlı kullanım ömrü gibi dezavantajlarını azaltarak endüstriyel uygulamalar için daha dayanıklı, ekonomik ve sürdürülebilir bir yaklaşım sunduğu değerlendirilmektedir.

- Bu sistemlerin gerçek çevre ve gıda örneklerinde uygulanabilirliği için interferans etkileri, enzim stabilitesi ve farklı pestisit türlerine karşı özgüllük gibi problemlerin çözülmesi gerekmektedir.
- Bu çalışma pestisitlerin girişim etkisi de dikkate alınarak pestisit sensörü geliştirilmesinde birden fazla pestisit grubunun tayininde de uygulanabilir
- Endüstriyel ölçekte kullanılabilmek için birçok optimizasyon çalışmasının yapılması gerektiği ve ileriki çalışma planlamasında proje fonlarından yararlanarak yapılabilecektir.
- Eliza kitleri gibi sağlık alanında tanı kitlerinin de oluşturulmasında kullanılabilir.
- Pestisitlerin kalitatif tayininde kit olarak kullanılabilir.
- Pestisitlerin elektrosensörlerle kantitatif tayini için elektrot yüzey fonksiyonelleştirilme çalışmalarına katkı sağlayabilir.

- Literatürde BChE enzimi ile pestisit tayini ve kinetik parametrelerin araştırılmasına dair çalışmaların kısıtlı olması nedeniyle enzim bazlı sensör çalışmalarına ışık tutacaktır.

KAYNAKÇA

- Ahmad, R., & Sardar, M. (2015). Enzyme immobilization: an overview on nanoparticles as immobilization matrix. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 4(2), 1.
- Al-Dhrub, A. H. A., Sahin, S., Ozmen, I., Tunca, E., Bulbul, M. (2017). "Immobilization and characterization of human carbonic anhydrase I on amine functionalized magnetic nanoparticles". *Process Biochemistry*, 57, 95–104.
- Alex, A. V., & Mukherjee, A. (2020). Review of recent developments (2018–2020) on acetylcholinesterase inhibition based biosensors for organophosphorus pesticides detection. *Microchemical Journal*, 160, 105779. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105779>
- Arduini, F., Guidone, S., Amine, A., Palleschi, G., Moscone, D. (2013). “Acetylcholinesterase biosensor based on self-assembled monolayer-modified gold-screen printed electrodes for organophosphorus insecticide detection”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 179, 201-208.
- Arduini, F., Ricci, F., Bourais, I., Amine, A., Moscone, D., Palleschi, G. (2005). “Extraction and Detection of Pesticides by Cholinesterase Inhibition in a Two-Phase System: a Strategy to Avoid Heavy Metal Interference”, *Analytical Letters*, 38(11), 1703-1719.
- Arduini, F., Ricci, F., Tuta, C. S., Moscone, D., Amine, A., & Palleschi, G. (2015). Detection of organophosphorus pesticides using cholinesterase-based biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.
- Aslan, S., Çakır, Z., Emet, M., Serinken, M., Karcıoğlu, Ö., Kandis, H., & Uzkeser, M. (2011). “Acute Abdomen associated With organophosphate Poisoning”, *The Journal of Emergency Medicine*, 41(5), 507-512.
- Barati, F., Hosseini, F., Vafaei, R., Sabouri, Z., Ghadam, P., Arab, S. S., ... & Piroozmand, F. (2024). In silico approaches to investigate enzyme immobilization: a comprehensive systematic review. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 26(7), 5744-5761.
- Barbosa, O., Torres, R., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, A., Rodrigues, R. C., & Fernandez-Lafuente, R. (2013). Heterofunctional supports in enzyme immobilization: from traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. *Biomacromolecules*, 14(8), 2433-2462.

- Barreto, M., D'Annibale, A., Messori, L., et al. (2008). Immobilized butyrylcholinesterase in the characterization of new inhibitors that could ease Alzheimer's disease. *Analytical Biochemistry*, 373(2), 222–230.
- Bartolini, M., Cavrini, V., Andrisano, V. 2004. “Monolithic micro-immobilized-enzyme reactor with human recombinant acetylcholinesterase for on-line inhibition studies”, *Journal of Chromatography A*, 1031(1-2), 27-34.
- Bartolini, M., Greig, N. H., Yu, Q. S., & Andrisano, V. (2009). Immobilized butyrylcholinesterase in the characterization of new inhibitors that could ease Alzheimer's disease. *Journal of Chromatography A*, 1216(13), 2730-2738.
- Basso, A., & Serban, S. (2019). Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Molecular Catalysis*, 479, 110607.
- Başaran, S., & Işık, M. (2025). Enhancement of Catalytic Stability and Kinetic Evaluation of Acetylcholinesterase Immobilized on Functionalized Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles. *ChemistrySelect*, 10(30), e02600.
- Bezerra, C. S., de Farias Lemos, C. M. G., de Sousa, M., & Gonçalves, L. R. B. (2015). Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, and future trends. *Journal of Applied Polymer Science*, 132, 42125. <https://doi.org/10.1002/app.42125>
- Bianco, A., Kostarelos, K., & Prato, M. (2005). Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9(6), 674–679.
- Bilal, M., Asgher, M., Cheng, H., Yan, Y., & Iqbal, H. M. (2019). Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design. *Critical reviews in biotechnology*, 39(2), 202-219.
- Bilal, M., Mehmood, S., Rasheed, T., & Iqbal, H. M. (2019). Bio-catalysis and biomedical perspectives of magnetic nanoparticles as versatile carriers. *Magnetochemistry*, 5(3), 42.
- Bisswanger, H. (2017). *Enzyme kinetics: principles and methods*. John Wiley & Sons.
- Bisswanger, H. (2017). *Enzyme Kinetics: Principles and Methods*. Wiley-VCH.
- Bornscheuer, U. T. (2018). The fourth wave of biocatalysis is approaching. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 376(2110), 20170063.

- Bornscheuer, U. T., & Kazlauskas, R. J. (2006). *Hydrolases in organic synthesis: regio-and stereoselective biotransformations*. John Wiley & Sons.
- Brankov, M., Simić, M., Samuelson, S. L., Nikolić, D., Čamdžija, Z., Mandić, V., & Dragičević, V. (2024). Nicosulfuron weed control in maize as influenced by adjuvants: original vs. Generic herbicide. *Journal of Crop Health*, 76(5), 1117-1124.
- Bromberg, A., Marx, S., & Frishman, G. (2008). Kinetic study of the thermal inactivation of cholinesterase enzymes immobilized in solid matrices. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1784(10), 1662–1668.
- Buller, R., Lutz, S., Kazlauskas, R. J., Snajdrova, R., Moore, J. C., & Bornscheuer, U. T. (2023). From nature to industry: Harnessing enzymes for biocatalysis. *Science*, 382(6673), eadh8615.
- Cavalcante, A. L. G., Dari, D. N., Aires, F. I. S., Castro, E. C., Santos, K. M., & Santos, J. C. S. (2024). Advancements in enzyme immobilization on magnetic nanomaterials: Toward sustainable industrial applications. *RSC Advances*, 14, 17946–17988. <https://doi.org/10.1039/D4RA02939A>
- Cavalcante, F. T., Cavalcante, A. L., de Sousa, I. G., Neto, F. S., & dos Santos, J. C. (2021). Current status and future perspectives of supports and protocols for enzyme immobilization. *Catalysts*, 11(10), 1222.
- Cengiz, D., Cokuğraş, A. N., & Tezcan, E. F. (2002). A new perspective on thermal inactivation kinetics of human serum butyrylcholinesterase. *Journal of Protein Chemistry*, 21(3), 145–149.
- Chalella Mazzocato, M., & Jacquier, J. C. (2024). Recent advances and perspectives on food-grade immobilisation systems for enzymes. *Foods*, 13(13), 2127.
- Chauhan, N., Narang, J., Pundir, C. S. (2021). Emerging vistas on pesticides detection based on electrochemical biosensors – An update. *Food Chemistry*, 371, 131126.
- Chen, N., Chang, B., Shi, N., Yan, W., Lu, F., & Liu, F. (2023). Cross-linked enzyme aggregates immobilization: Preparation, characterization, and applications. *Critical reviews in biotechnology*, 43(3), 369-383.
- Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1-9.

- de Castro, É. C., Fernandes, T. S. M., da Silva Aires, F. I., de Sousa Junior, P. G., e Silva, L. E. C., dos Santos, K. M., ... & dos Santos, J. C. S. (2026). Engineering functional support materials for Enzyme immobilization: Technologies, performance and industrial relevance. *Next Chemical Engineering*, 2, 100028.
- Ding, R., et al. (2022). Electrochemical (bio)sensors for the detection of organophosphorus pesticides based on nanomaterial-modified electrodes: A review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*.
- Dirak, M., Chan, J., & Kolemen, S. (2024). Optical imaging probes for selective detection of butyrylcholinesterase. *Journal of Materials Chemistry B*, 12, 1149–1167.
- Dong, M., Shu, Y., Gao, R., Sun, T., Wu, M., Wu, W., ... & Ji, S. (2025). Application of magnetic aldehyde-functionalized ionic liquids for immobilization of acetylcholinesterase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 309, 143101.
- Dresselhaus, M. S., & Avouris, P. (2001). Introduction to carbon materials research. In *Carbon nanotubes: synthesis, structure, properties, and applications* (pp. 1-9). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Dvir, H., & Silman, I. (2020). Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions*, 322, 109056.
- Dwevedi, A. (2016). Basics of enzyme immobilization. In *Enzyme immobilization: advances in industry, agriculture, medicine, and the environment* (pp. 21-44). Cham: Springer International Publishing.
- Feng, J., Huang, Q. Y., Zhang, C., Ramakrishna, S., & Dong, Y. B. (2023). Review of covalent organic frameworks for enzyme immobilization: Strategies, applications, and prospects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 248, 125729.
- Fukuto, T. R. (1990). Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives*, 87, 245–254.
- Gabrovska, K., Nedelcheva, T., Godjevargova, T., Stoilova, O., Manolova, N., & Rashkov, I. (2008). Immobilization of acetylcholinesterase on new modified acrylonitrile copolymer membranes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 55(3-4), 169-176.

- Gao, L., Zhuang, J., Nie, L., Zhang, J., Zhang, Y., Gu, N., ... & Yan, X. (2007). Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. *Nature nanotechnology*, 2(9), 577-583.
- Geim, A. K., & Novoselov, K. S. (2007). The rise of graphene. *Nature Materials*, 6(3), 183–191.
- Girelli, A. M., Astolfi, M. L., & Scuto, F. R. (2020). Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. *Chemosphere*, 244, 125368.
- Gok, M., Cicek, C., & Bodur, E. (2024). Butyrylcholinesterase in lipid metabolism: A new outlook. *Journal of Neurochemistry*, 168, 381–385. <https://doi.org/10.1111/jnc.15833>
- Gonçalves, L. R. B., Bezerra, C. S., de Farias Lemos, C. M. G., & de Sousa, M. (2015). Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, and future trends. *Journal of Applied Polymer Science*, 132, 42125.
- Gong, M., Yu, W., Ma, J., Liu, J. R., Sun, Q., Luo, X., & Zhang, M. Z. (2025). Visual screening of butyrylcholinesterase inhibitors by a cellulose membrane biosensor with amide-bonded immobilization of butyrylcholinesterase in a solid-phase enzyme-catalyzed reaction. *International Journal of Biological Macromolecules*, 285, 138598.
- Greig, N. H., Utsuki, T., Yu, Q. S., Zhu, X., Holloway, H. W., Perry, T., Lee, B., Ingram, D. K., & Lahiri, D. K. (2005). A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: Attention to butyrylcholinesterase. *Current Medicinal Chemistry*, 12(18), 2229–2239.
- Guzik, U., Hupert-Kocurek, K., & Wojcieszynska, D. (2014). Immobilization as a strategy for improving enzyme properties—Application to oxidoreductases. *Molecules*, 19(7), 8995–9018. <https://doi.org/10.3390/molecules19078995>
- Hanefeld, U., Gardossi, L., & Magner, E. (2009). Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews*, 38(2), 453-468.
- Hao, X., Liu, P., & Chu, X. (2024). Recent Advances in the Strategies of Simultaneous Enzyme Immobilization Accompanied by Nanocarrier Synthesis. *Applied Sciences*, 14(9), 3702. <https://doi.org/10.3390/app14093702>
- Hartmann, M. (2005). Ordered mesoporous materials for bioadsorption and biocatalysis. *Chemistry of Materials*, 17, 4577–4593.

- Hartmann, M., & Kostrov, X. (2013). Immobilization of enzymes on porous silicas—benefits and challenges. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6277-6289.
- Hasanoğlu Özkan, E., Kurnaz Yetim, N., & Koç, M. M. (2024). Preparation and characterization of AChE immobilized magnetic bio-nanocomposites (Fe₃O₄@ Cht/Au) for pesticide detection. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 59(7), 368-377.
- Hirsch, A. (2002). Functionalization of single-walled carbon nanotubes. *Angewandte Chemie International Edition*, 41(11), 1853–1859.
- Hu, H., Wang, Z., Pan, L., Zhao, S., Zhu, S. (2010). "Ag-Coated Fe₃O₄@SiO₂ three-ply composite microspheres: Synthesis, characterization, and application in detecting melamine with their surface-enhanced Raman scattering". *Journal of Physical Chemistry C*, 114(17), 7738–7742.
- Huang, X., El-Sayed, I. H., Qian, W., & El-Sayed, M. A. (2015). Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *Journal of the American Chemical Society*, 128(6), 2115–2120.
- Husain, Q., Ansari, S. A., Alam, F., Azam, A. (2011). "Immobilization of *Aspergillus oryzae* β galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism". *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(1), 37–43.
- Illanes, A. (2015). Biocatalysis in organic media.
- Ismail, A. R., & Baek, K. H. (2020). Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 1624–1639.
- Ivanov, A., Shamagsumova, R., Larina, M., & Evtugyn, G. (2024). Electrochemical Acetylcholinesterase Sensors for Anti-Alzheimer's Disease Drug Determination. *Biosensors*, 14(2), 93. <https://doi.org/10.3390/bios14020093>
- Jain, P. K., Huang, X., El-Sayed, I. H., & El-Sayed, M. A. (2007). Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems. *Plasmonics*, 2(3), 107–118.
- Jakubowski, H. V., Agnew, H., Jardine, B., & Sauro, H. M. (2024). Use of interactive mathematical simulations in fundamentals of biochemistry, a LibreText online

- educational resource, to promote understanding of dynamic reactions. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 52(4), 426-435.
- Jangi, S. R. H., Akhond, M. (2022). "Introducing a covalent thiol-based protected immobilized acetylcholinesterase with enhanced enzymatic performances for biosynthesis of esters", *Process Biochemistry*, 120, 138-155.
- Jeyapragasam, T., Saraswathi, R. (2014). "Electrochemical biosensing of carbofuran based on acetylcholinesterase immobilized onto iron oxide–chitosan nanocomposite", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 191, 681-687.
- Jia, H., Zhu, G., Wang, P. (2003). "Catalytic Behaviors of Enzymes Attached to Nanoparticles: The Effect of Particle Mobility". *Biotechnology and Bioengineering*, 84(4), 406–414.
- Jiang, Y., Zheng, J., Wang, M., Xu, W., Wang, Y., Wen, L., & Dong, J. (2024). Pros and cons in various immobilization techniques and carriers for enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 196(9), 5633-5655.
- Jimenez-Carretero, M., Jabalera, Y., Sola-Leyva, A., Carrasco-Jimenez, M. P., Jimenez-Lopez, C. (2023). "Nanoassemblies of acetylcholinesterase and β -lactamase immobilized on magnetic nanoparticles as biosensors to detect pollutants in water", *Talanta*, 258, 124406.
- Jing, G., Pan, F., Lv, B., Zhou, Z. (2015). "Immobilization of carbonic anhydrase on epoxy-functionalized magnetic polymer microspheres for CO₂ capture". *Process Biochemistry*, 50(12), 2234–2241.
- Karaağaç, Ö. (2011). "Nanoparçacıkların Sentezi, Karakterizasyonu ve Enzim Optimum Doyum Manyetizasyonlu Süperparamanyetik İmmobilizasyon Uygulaması". Balıkesir Üniversitesi.
- Karlsson, D. (2013). Biomolecular screening for inhibitors of butyrylcholinesterase: identification and characterization using in vitro and in silico tools.
- Kaur, N., Prabhakar, N. (2017). "Current scenario in organophosphates detection using electrochemical biosensors", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 92, 62-85.
- Khan, A. A., & Alzohairy, M. A. (2010). Recent advances and applications of immobilized enzyme technologies: a review. *Res J Biol Sci*, 5(8), 565-575.

- Khan, M. R. (2021). Immobilized enzymes: a comprehensive review. *Bulletin of the National Research Centre*, 45(1), 207.
- Korram, J., Dewangan, L., Karbhal, I., Nagwanshi, R., Vaishnav, S. K., Ghosh, K. K., & Satnami, M. L. (2020). CdTe QD-based inhibition and reactivation assay of acetylcholinesterase for the detection of organophosphorus pesticides. *RSC Advances*, 10, 24190–24202. <https://doi.org/10.1039/D0RA03055D>
- Kostarelos, K., Bianco, A., & Prato, M. (2009). Promises, facts and challenges for carbon nanotubes in imaging and therapeutics. *Nature Nanotechnology*, 4(10), 627–633.
- Kotwal, N., Pathania, D., Singh, A., Sheikh, Z. U. D., & Kothari, R. (2024). Enzyme immobilization with nanomaterials for hydrolysis of lignocellulosic biomass: Challenges and future perspectives. *Carbohydrate Research*, 543, 109208. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2024.109208>
- Kumar, S., Haq, I., Prakash, J., & Raj, A. (2017). Improved enzyme properties upon glutaraldehyde cross-linking of alginate entrapped xylanase from *Bacillus licheniformis*. *International journal of biological macromolecules*, 98, 24-33.
- Kuo, C. H., Huang, C. Y., Shieh, C. J., & Dong, C. D. (2022). Enzymes and biocatalysis. *Catalysts*, 12(9), 993.
- Laurent, S., Dutz, S., Häfeli, U. O., & Mahmoudi, M. (2014). Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 166(1–2), 8–23.
- Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., & Muller, R. N. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical Reviews*, 108, 2064–2110.
- Li, Y., Zhang, Z. Y., Li, S. Y., Gong, X. Y., & Yang, W. C. (2024). Development of Cholinesterase-Activatable Fluorescent Probes for Pesticide Residue Detection. *ACS Agricultural Science & Technology*. <https://doi.org/10.1021/acsagscitech.3c00466>
- Liang, X., Liu, Y., Wen, K., Jiang, W., & Li, Q. (2021). Immobilized enzymes in inorganic hybrid nanoflowers for biocatalytic and biosensing applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 9(37), 7597-7607.

- Liu, D. M., Chen, J., & Shi, Y. P. (2018). Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 102, 332-342.
- Liu, T., Su, H., Qu, X., Ju, P., Cui, L., Ai, S. (2011). "Acetylcholinesterase biosensor based on 3-carboxyphenylboronic acid/reduced graphene oxide–gold nanocomposites modified electrode for amperometric detection of organophosphorus and carbamate pesticides", *Sensors and actuators B: Chemical*, 160(1), 1255-1261.
- Lockridge, O. (2015). Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacology & Therapeutics*, 148, 34–46.
- Lopes, P. H. S., Nelson, D. L., & Damasceno, S. M. (2025). Enzyme immobilization: Advancements, techniques, and industrial applications. *Recent Patents on Biotechnology*.
- Luo, R., Feng, Z., Shen, G., Xiu, Y., Zhou, Y., Niu, X., & Wang, H. (2018). Acetylcholinesterase biosensor based on mesoporous hollow carbon spheres/core-shell magnetic nanoparticles-modified electrode for the detection of organophosphorus pesticides. *Sensors*, 18(12), 4429.
- Luque, F. J., & Muñoz-Torrero, D. (2024). Acetylcholinesterase: a versatile template to coin potent modulators of multiple therapeutic targets. *Accounts of Chemical Research*, 57(4), 450-467.
- Ma, M., Xie, J., Zhang, Y., Chen, Z., & Gu, N. (2013). Fe₃O₄@ Pt nanoparticles with enhanced peroxidase-like catalytic activity. *Materials Letters*, 105, 36-39.
- Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R. M., Ibrahim, A. H., & Azzazy, H. M. E. S. (2023). Enzyme immobilization technologies and industrial applications. *ACS omega*, 8(6), 5184-5196.
- Marcherya, A. (2020). Acetylcholinesterase dan butyrylcholinesterase sebagai penanda keracunan pestisida. *Jurnal Agromedicine Unila*, 7(1), 19–22.
- Martins, M. M., et al. (2023). Enhancing the therapeutic effect in Alzheimer's disease drugs: The role of polypharmacology and cholinesterase inhibitors. *ChemistrySelect*, 8, e202300461. <https://doi.org/10.1002/slct.202300461>

- Martins, P. M., Lima, A. C., Ribeiro, S., Lanceros-Mendez, S., & Martins, P. (2021). Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications: From the Soul of the Earth to the Deep History of Ourselves. *ACS Applied Bio Materials*, 4(8), 5839-5870. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00440>
- Masson, P., Carletti, E., & Nachon, F. (2009). Structure, activities and biomedical applications of human butyrylcholinesterase. *Protein & Peptide Letters*, 16(10), 1215–1224.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1451–1463. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>
- McDonald, A. G., & Tipton, K. F. (2021). Enzyme nomenclature and classification: The state of the art. *FEBS Journal*, 288(3), 862–875. <https://doi.org/10.1111/febs.15413>
- McDonald, A. G., & Tipton, K. F. (2023). Enzyme nomenclature and classification: the state of the art. *The FEBS journal*, 290(9), 2214-2231.
- McKee, T., & McKee, J. R. (2020). *Biochemistry: The Molecular Basis of Life* (7th ed.). Oxford University Press.
- Mehta, J., Vinayak, P., Tuteja, S. K., Chhabra, V. A., Bhardwaj, N., Paul, A. K., Deep, A. (2016). “Graphene modified screen printed immunosensor for highly sensitive detection of parathion”, *Biosensors and Bioelectronics*, 83, 339-346.
- Mendes, A. A., De Castro, H. F., Andrade, G. S. S., Tardioli, P. W., Giordano, R. D. L. C. (2013). "Preparation and application of epoxy-chitosan/alginate support in the immobilization of microbial lipases by covalent attachment". *Reactive and Functional Polymers*, 73(1), 160–167.
- Michaud, M., Nonglaton, G., & Anxionnaz-Minvielle, Z. (2024). Wall-immobilized biocatalyst vs. packed bed in miniaturized continuous reactors: performances and scale-up. *ChemBioChem*, 25(11), e202400086.
- Mitrić, S., Sunulahpašić, A., Šunjka, D., Vuković, S., Žabić, M., Hamidović, S., & Kelečević, B. (2024). Dissipation dynamic of nicosulfuron in different types of agricultural soils. *Plant Soil Environ*, 70, 245-251.

- Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., & Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(2), 205-220.
- Mohidem, N. A., Mohamad, M., Rashid, M. U., Norizan, M. N., Hamzah, F., & Mat, H. B. (2023). Recent advances in enzyme immobilisation strategies: An overview of techniques and composite carriers. *Journal of Composites Science*, 7(12), 488.
- Monier, M., Ayad, D. M., Wei, Y., & Sarhan, A. A. (2010). Immobilization of horseradish peroxidase on modified chitosan beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46(3), 324-330.
- Monthieux, M., & Kuznetsov, V. L. (2006). Who should be given the credit for the discovery of carbon nanotubes? *Carbon*, 44(9), 1621–1623.
- Moradzadegan, A., Ranaei-Siadat, S. O., Ebrahim-Habibi, A., Barshan-Tashnizi, M., Jalili, R., Torabi, S. F., & Khajeh, K. (2010). Immobilization of acetylcholinesterase in nanofibrous PVA/BSA membranes by electrospinning. *Engineering in Life Sciences*, 10(1), 57-64.
- Murray, A. P., Biscussi, B., Cavallaro, V., Donozo, M., & Rodriguez, S. A. (2024). Naturally occurring cholinesterase inhibitors from plants, fungi, algae, and animals: A review of the most effective inhibitors reported in 2012–2022. *Current Drug Targets*, 22.
- Naryzhny, S. N., Mogilnaya, O. A., Reshetilov, A. N., & Taranenko, I. A. (2018). Stabilization of Butyrylcholinesterase by the Entrapment into the Natural Polymer-Based Gels. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 73(2), 73–77. <https://doi.org/10.1134/S1607672918020126>
- Necip, A. (2025). Immobilization of butyrylcholinesterase on chitosan/chitosan–TiO₂ via glutaraldehyde cross-linking: enzyme stability, reusability and characterization. *Chemical Papers*, 79(9), 6365-6373.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2022). *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Artmed Editora.
- Nicolet, Y., Lockridge, O., Masson, P., Fontecilla-Camps, J. C., & Nachon, F. (2003). Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 41141–41147.

- Njoki, P. N., Lim, I. I. S., Mott, D., Park, H. Y., Khan, B., Mishra, S., Sujakumar, R., Luo, J., & Zhong, C. J. (2007). Size correlation of optical and spectroscopic properties for gold nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(40), 14664–14669.
- Novoselov, K. S., Geim, A. K., Morozov, S. V., et al. (2004). Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*, 306(5696), 666–669.
- Öz, Y., Sürmeli, Y., & Şanlı-Mohamed, G. (2022). Enhanced thermostability of the immobilized thermoalkalophilic esterase onto magnetic-cornstarch nanoparticle. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(4), 1418-1427.
- Özel, F. (2015). "Süperparamanyetik Demir Oksit Nanoparçacıklar: Sentezi, Yüzey Modifikasyonu, Yapısal ve Manyetik Karakterizasyonu ile Toksik Etkinin İncelenmesi". Balıkesir Üniversitesi.
- Palanivelu, J. ve Chidambaram, R. (2019). "Acetylcholinesterase With Mesoporous Silica: Covalent Immobilization, Physiochemical Characterization, And Its Application In Food For Pesticide Detection", *Journal Of Cellular Biochemistry*, 120(6), 10777-10786.
- Pankhurst, Q. A., Connolly, J., Jones, S. K., & Dobson, J. (2013). Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36(13), R167–R181.
- Patti, S., Magrini Alunno, I., Pedroni, S., Riva, S., Ferrandi, E. E., & Monti, D. (2025). Advances and challenges in the development of immobilized enzymes for batch and flow biocatalyzed processes. *ChemSusChem*, 18(8), e202402007.
- Periasamy, A. P., Umasankar, Y., & Chen, S. M. (2009). Nanomaterials-acetylcholinesterase enzyme matrices for organophosphorus pesticides electrochemical sensors: A review. *Sensors*, 9(6), 4034–4055.
- Petrović, D., Risso, V. A., Kamerlin, S. C. L., & Sanchez-Ruiz, J. M. (2018). Conformational dynamics and enzyme evolution. *Journal of the Royal Society Interface*, 15(144), 20180330.
- Piotrowska-Długosz, A. (2019). Significance of enzymes and their application in agriculture. In *Biocatalysis: Enzymatic basics and applications* (pp. 277-308). Cham: Springer International Publishing.

- Pohanka, M. (2012). Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers*, 156, 13–20.
- Pohanka, M., Skládal, P., et al. (2011). Biosensors based on cholinesterase inhibition for pesticide detection. *Sensors*.
- Polizzi, K. M., Bommarius, A. S., Broering, J. M., & Chaparro-Riggers, J. F. (2007). Stability of biocatalysts. *Current opinion in chemical biology*, 11(2), 220-225.
- Pollard, D. J., & Woodley, J. M. (2007). Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *TRENDS in Biotechnology*, 25(2), 66-73.
- Prabhakar, T., Giaretta, J., Zulli, R., Rath, R. J., Farajikhah, S., Talebian, S., & Dehghani, F. (2025). Covalent immobilization: A review from an enzyme perspective. *Chemical Engineering Journal*, 503, 158054.
- Pumera, M. (2011). Graphene in biosensing. *Materials Today*, 14(7–8), 308–315.
- Pundir, C. S., Chauhan, N. (2012). “Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review”, *Analytical biochemistry*, 429(1), 19-31.
- Punekar, N. S. (2018). *Enzymes: catalysis, kinetics and mechanisms*. Springer.
- Robescu, M. S., & Bavaro, T. (2025). A comprehensive guide to enzyme immobilization: All you need to know. *Molecules*, 30(4), 939.
- Rodrigues de Melo, R., Alnoch, R. C., Vilela, A. F. L., Maltempi de Souza, E., Krieger, N., Ruller, R., Mateo, C. (2017). “New heterofunctional supports based on glutaraldehyde-activation: a tool for enzyme immobilization at neutral Ph”, *Molecules*, 22(7), 1088.
- Rodriguez-Abetxuko, A., Sánchez-deAlcázar, D., Muñumer, P., & Beloqui, A. (2020). Tunable polymeric scaffolds for enzyme immobilization. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 830. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00830>
- Rodríguez-Restrepo, Y. A., & Orrego, C. E. (2020). Immobilization of enzymes and cells on lignocellulosic materials. *Environmental Chemistry Letters*, 18(3), 787-806.
- Sahoo, P. C., Jang, Y. N., Lee, S. W. 2012. "Immobilization of carbonic anhydrase and an artificial Zn(II) complex on a magnetic support for biomimetic carbon dioxide sequestration". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 82, 37–45.

- Salvatore, M. (2026). Computational Investigation of Structure-Activity Relationships in Organophosphorus-Inhibited Butyrylcholinesterase: Insights from Molecular Docking and Molecular Mechanics (Master's thesis, The Ohio State University).
- Sheldon, R. A. (2007). Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349, 1289–1307.
- Sheldon, R. A., & Brady, D. (2018). The limits to biocatalysis: Pushing the envelope. *Chemical Communications*, 54(48), 6088–6104.
- Sheldon, R. A., & Brady, D. (2022). The limits to biocatalysis: Pushing the envelope. *Chemical Communications*, 58(43), 6086–6104.
- Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical society reviews*, 42(15), 6223-6235.
- Sheldon, R. A., & Woodley, J. M. (2018). Role of biocatalysis in sustainable chemistry. *Chemical reviews*, 118(2), 801-838.
- Sheldon, R. A., Schoevaart, R., & Van Langen, L. M. (2005). Çapraz bağlı enzim agregaları (CLEA'lar): Enzim immobilizasyonu için yeni ve çok yönlü bir yöntem (bir inceleme). *Biyokataliz ve Biyodönüşüm*, 23(3-4), 141-147.
- Siebert, D. A., Caon, N. B., Alberton, M. D., Vitali, L., Parize, A. L., & Micke, G. A. (2023). Immobilized acetylcholinesterase in magnetic nanoparticles for in-line inhibition studies using a capillary electrophoresis system. *Analytica Chimica Acta*, 1275, 341566.
- Silva Almeida, C., Simão Neto, F., da Silva Sousa, P., da Silva Aires, F. I., de Matos Filho, J. R., Gama Cavalcante, A. L., ... & S. dos Santos, J. C. (2024). Enhancing lipase immobilization via physical adsorption: Advancements in stability, reusability, and industrial applications for sustainable biotechnological processes. *ACS omega*, 9(47), 46698-46732.
- Silva Lopes, P. H., Nelson, D. L., & Damasceno, S. M. (2025). Enzyme Immobilization: Advancements, Techniques, and Industrial Applications. *Current Enzyme Inhibition*.
- Silva, L. C., et al. (2025). Revisiting the Association of Pesticide Exposure and Parkinson's Disease: Systematic Review and Meta-Analysis. *Environmental Toxicology*.

- Singh, A. P., Balayan, S., Hooda, V., Sarin, R. K., & Chauhan, N. (2020). Nano-interface driven electrochemical sensor for pesticides detection based on the acetylcholinesterase enzyme inhibition. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 3943–3952. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.215>
- Singh, R. S., Singh, T., & Pandey, A. (2019). Microbial enzymes—an overview. *Advances in enzyme technology*, 1-40.
- Singh, T., Verma, A. K. (2024). “In-silico toxicity analysis for interaction between Organophosphates and Acetyl cholinesterase through molecular level simulation”, <https://orcid.org/0000-0002-1497-6210>.
- Sirisha, V. L., Jain, A., & Jain, A. (2016). Enzyme immobilization: an overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes. *Advances in food and nutrition research*, 79, 179-211.
- Skendrović, D., Švarc, A., Rezić, T., Chernev, A., Rađenović, A., & Presečki, A. V. (2024). Improvement of DERA activity and stability in the synthesis of statin precursors by immobilization on magnetic nanoparticles. *Reaction chemistry & engineering*, 9(1), 82-90.
- Smyrska-Wieleba, N., & Mroczek, T. (2023). Natural inhibitors of cholinesterases: Chemistry, structure–activity and methods of their analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2722. <https://doi.org/10.3390/ijms24032722>
- Soldatkin, O. O., Dzyadevych, S. V., Kucherenko, I. S., et al. (2024). Application of butyrylcholinesterase-based biosensor for simultaneous determination of different toxicants using inhibition and reactivation steps. *Electroanalysis*, 36, e202300400.
- Soldatkin, O. O., Pyeshkova, V. M., Kucherenko, I. S., Velychko, T. P., Bakhmat, V. A., Arkhypova, V. M., ... & Dzyadevych, S. V. (2024). Application of butyrylcholinesterase-based biosensor for simultaneous determination of different toxicants using inhibition and reactivation steps. *Electroanalysis*, 36(6), e202300400.
- Song, Z., Zhang, Q., Wu, W., Pu, Z., & Yu, H. (2023). Rational design of enzyme activity and enantioselectivity. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 11, 1129149.

- Songa, E. A., Okonkwo, J. O. (2016). “Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: A review”, *Talanta*, 155, 289-304.
- Sousa, R. R. D., dos Santos, M. M., Medeiros, M. W., Manoel, E. A., Berenguer-Murcia, Á., Freire, D. M. G., ... & Ferreira-Leitão, V. S. (2025). Immobilized lipases in the synthesis of short-chain esters: an overview of constraints and perspectives. *Catalysts*, 15(4), 375.
- Sörensen, M. H., Ng, J. B., Bergström, L., & Alberius, P. C. (2010). Improved enzymatic activity of *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in a hydrophobic particulate mesoporous carrier. *Journal of colloid and interface science*, 343(1), 359-365.
- Srinivasan, B. (2022). A guide to the Michaelis–Menten equation: Steady state and beyond. *The FEBS Journal*, 289(20), 6083–6104. <https://doi.org/10.1111/febs.16124>
- Sujitha, P., & Shanthi, C. (2023). Importance of enzyme specificity and stability for the application of proteases in greener industrial processing-a review. *Journal of Cleaner Production*, 425, 138915.
- Sun, T., Zhen, T., Harakandi, C. H., et al. (2024). New insights into butyrylcholinesterase: Pharmaceutical applications, selective inhibitors and multitarget-directed ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 275, 116569.
- Şahin, F., Demirel, G., Tümtürk, H. (2005). “A novel matrix for the immobilization of acetylcholinesterase”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 37(3), 148-153.
- T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı. (t.y.). Bitki Koruma Ürünleri Veri Tabanı: Nicosülfuron aktif madde kayıt bilgileri. Erişim tarihi: 13 Temmuz 2026, <https://bku.tarimorman.gov.tr/AktifMadde/Details/783>.
- T.sriwong, K., & Matsuda, T. (2022). Recent Advances in Enzyme Immobilization Utilizing Nanotechnology for Biocatalysis. *Organic Process Research & Development*, 26(7), 1857–1877. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.1c00404>
- Tasis, D., Tagmatarchis, N., Bianco, A., & Prato, M. (2006). Chemistry of carbon nanotubes. *Chemical Reviews*, 106(3), 1105–1136.
- Taylor, P., & Radic, Z. (2021). The cholinesterases: From genes to proteins and their biological roles. *Handbook of Experimental Pharmacology*.

- Tipton, K. F., & McDonald, A. G. (2025). A Brief Guide to Enzyme Nomenclature and Classification. International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB).
- Tural, B., Tarhan, T., Tural, S. (2014). "Covalent immobilization of benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* on magnetic epoxy support and its carboligation reactivity". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 102(April), 188–194.
- Ünlüer, Ö. (2015). "Karbondiyoksit Tutucu ve Dönüştürücü Biyomimik Nanoenzim Sistemlerinin Geliştirilmesi ve Uygulamaları". Anadolu Üniversitesi.
- Verma, N., Bhardwaj, A. (2015). Biosensor technology for pesticides—A review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175, 3093–3119.
- Villa, S., Riani, P., Locardi, F., & Canepa, F. (2016). Functionalization of Fe₃O₄ NPs by silanization: use of amine (APTES) and thiol (MPTMS) silanes and their physical characterization. *Materials*, 9(10), 826.
- Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2016). *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level* (5th ed.). Wiley.
- Wahab, R. A., Elias, N., Abdullah, F., & Ghoshal, S. K. (2020). On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview. *Reactive and Functional Polymers*, 152, 104613. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104613>
- Wang, J., Sugawara-Narutaki, A., Fukao, M., Yokoi, T., Shimojima, A., Okubo, T. (2011). "Two-phase synthesis of monodisperse silica nanospheres with amines or ammonia catalyst and their controlled self-assembly". *ACS Applied Materials and Interfaces*, 3(5), 1538–1544.
- Wang, Y., Liu, X., Zhang, W., et al. (2018). Cholinesterases and engineered mutants for detection of organophosphorus pesticide residues. *Sensors*, 18, 4281.
- Wei, H., & Wang, E. (2008). Fe₃O₄ magnetic nanoparticles as peroxidase mimetics and their applications in H₂O₂ and glucose detection. *Analytical chemistry*, 80(6), 2250-2254.
- Wei, M., Wang, J. (2015). "A novel acetylcholinesterase biosensor based on ionic liquids-AuNPs-porous carbon composite matrix for detection of organophosphate pesticides", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 211, 290-296.

- Wong, J. X., Ogura, K., Chen, S., & Rehm, B. H. A. (2020). Bioengineered polyhydroxyalkanoates as immobilized enzyme scaffolds for industrial applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 156. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00156>
- Xiao, T., Yang, L., He, X., Wang, L., Zhang, D., Cui, T., ... & Zhang, X. (2025). A green and efficient method for detecting nicosulfuron residues in field maize using hyperspectral imaging and deep learning. *Journal of Hazardous Materials*, 484, 136724.
- Xiao, T., Yang, L., Zhang, D., Cui, T., Zhang, X., Deng, Y., ... & Wang, H. (2024). Early detection of nicosulfuron toxicity and physiological prediction in maize using multi-branch deep learning models and hyperspectral imaging. *Journal of Hazardous Materials*, 474, 134723.
- Xing, S., Li, Q., Xiong, B., Chen, Y., Feng, F., Liu, W., & Sun, H. (2021). Structure and therapeutic uses of butyrylcholinesterase: Application in detoxification, Alzheimer's disease, and fat metabolism. *Medicinal Research Reviews*, 41(2), 858–901. <https://doi.org/10.1002/med.21745>
- Xu, J., Sun, J., Wang, Y., Sheng, J., Wang, F., Sun, M. (2014). "Application of iron magnetic nanoparticles in protein immobilization". *Molecules*, 19(8), 11465–11486.
- Xu, K., Chen, X., Zheng, R., & Zheng, Y. (2020). Immobilization of Multi-Enzymes on Support Materials for Efficient Biocatalysis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 660.
- Xu, Y. L., Li, F. Y., Ndikuryayo, F., Yang, W. C., Wang, H. M. (2018). “Cholinesterases and engineered mutants for the detection of organophosphorus pesticide residues”, *Sensors*, 18(12), 4281.
- Yadav, R., Joshi, M., Wanjari, S., Prabhu, C., Kotwal, S., Satyanarayanan, T., Rayalu, S. (2012). "Immobilization of carbonic anhydrase on chitosan stabilized Iron nanoparticles for the carbonation reaction". *Water, Air, and Soil Pollution*, 223(8), 5345–5356.
- Yamaguchi, H., & Miyazaki, M. (2024). Bioremediation of hazardous pollutants using enzyme-immobilized reactors. *Molecules*, 29(9), 2021.

- Yıldırım, E. R., & Ulusoy Güzeldemirci, N. (2023). Recent advances of cholinesterase inhibitors playing a critical role in the treatment of Alzheimer's disease (2020–2022). *Journal of Academic Research in Health Sciences*, 6(2), 197–209.
- Yoon, H. C., Hong, M. Y., Kim, H. S. (2000). "Functionalization of a poly(amidoamine) dendrimer with ferrocenyls and its application to the construction of a reagentless enzyme electrode". *Analytical Chemistry*, 72(18), 4420–4427.
- Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., & Pinelo, M. (2018). A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. *Catalysts*, 8, 92.
- Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., & Pinelo, M. (2018). A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. *Catalysts*, 8(2), 92. <https://doi.org/10.3390/catal8020092>
- Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., & Pinelo, M. (2021). Highly effective enzymes immobilization on ceramics: Requirements for supports and enzymes. *Science of the Total Environment*, 801, 149647. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149647>
- Zhang, F., Li, S., Liu, C., Fang, K., Jiang, Y., Zhang, J., ... & Wang, G. (2022). Rapid screening for acetylcholinesterase inhibitors in *Selaginella doederleinii* Hieron by using functionalized magnetic Fe₃O₄ nanoparticles. *Talanta*, 243, 123284.
- Zhang, Q., Yu, J., Wei, Y., et al. (2025). Advances in acetylcholinesterase-based biosensing technologies for organophosphorus pesticide detection: A comprehensive review (2020–2024). *Food Chemistry*, 496, 146769.
- Zhang, Q., Yu, J., Wei, Y., Yang, R., Liu, J., Su, Y., Gao, D., & Zeng, J. (2025). Advances in acetylcholinesterase-based biosensing technologies for organophosphorus pesticide detection: A comprehensive review (2020–2024). *Food Chemistry*, 496, 146769. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.146769>
- Zhang, Y., Ali, S. F., Dervishi, E., Xu, Y., Li, Z., Casciano, D., & Biris, A. S. (2010). Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural cells. *ACS Nano*, 4(6), 3181–3186.
- Zhang, Y., vd. (2024). Development of cholinesterase-activatable fluorescent probes for pesticide residue detection. *ACS Agricultural Science & Technology*.

- Zhang, Y., Xu, C., He, Y., Li, Z., & Wang, X. (2020). Recent advances in magnetic nanoparticle-based enzyme immobilization and their applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 3370–3384.
- Zhao, L., Zhang, Y., Yang, Y., & Yu, C. (2022). Silica-based Nanoparticles for Enzyme Immobilization and Delivery. *Chemistry – An Asian Journal*, 17(17), e202200573. <https://doi.org/10.1002/asia.202200573>
- Zhao, X., Xie, Q., Song, B., Riaz, M., Lal, M. K., Wang, L., ... & Huo, J. (2024). Research on phytotoxicity assessment and photosynthetic characteristics of nicosulfuron residues on *Beta vulgaris* L. *Journal of Environmental Management*, 353, 120159.
- Zhu, Y. T., Ren, X. Y., Liu, Y. M., Wei, Y., Qing, L. S., & Liao, X. (2014). Covalent immobilization of porcine pancreatic lipase on carboxyl-activated magnetic nanoparticles: characterization and application for enzymatic inhibition assays. *Materials Science and Engineering: C*, 38, 278-285.
- Zucca, P., & Sanjust, E. (2014). Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms. *Molecules*, 19(9), 14139-14194.