

Pestisit Analizlerinde Asetilkolinesteraz İnhibisyonuna Dayalı İletken Polimer Esaslı Biyosensörler

Songül Şen Gürsoy¹ , Oğuz Gürsoy² ¹Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Burdur²Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Burdur

Geliş Tarihi (Received): 07.03.2017, Kabul Tarihi (Accepted): 08.08.2017

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): ssen@mehmetakif.edu.tr (S. Şen Gürsoy)

☎ 0 248 213 30 30 📠 0 248 213 30 99

ÖZ

Dünyada yaygın olarak kullanılan pestisitler, tarımsal, endüstriyel, evsel ve savaş malzemeleri olarak kullanılan kimyasallardır. Pestisitler pek çok sağlık sorunu ile ilgili olmasına rağmen, bu kirleticilerin izlenmesi ve tanımlanmasında ciddi bir eksiklik bulunmaktadır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, kapiler elektroforez ve kütle spektrometresi gibi klasik kromatografik yöntemler gıdalardaki pestisit analizlerinde etkili yöntemlerdir. Bununla birlikte, bu yöntemlerin karmaşık süreçler, zaman alıcı hazırlık adımları, pahalı ekipman ve uzman personel gereksinimleri açısından önemli sınırlamaları vardır. Biyosensörler, basitlik, yüksek hassasiyet, kısa analiz süresi ve düşük analiz maliyeti ve aynı zamanda gerçek zamanlı ölçümlere uygulanabilirliği nedeniyle pestisitlerin tayini için tercih edilen cihazlardır. Onbeş yıldan fazla bir süredir, gıda kontrolü ve güvenliği için pestisit kalıntılarını izlemek için enzim inhibisyonuna dayalı biyosensörler geliştirilmiştir. İletken polimerler bu pestisit biyosensörlerinin yapımında kullanılmaktadır. Bu çalışmada pestisit tayini için kullanılan biyosensörler ile ilgili bilgi verildikten sonra asetilkolin esteraz enziminin inhibisyonuna dayalı iletken polimer temelli biyosensörler ile ilgili çalışmalar derlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Pestisit, İletken Polimer, Biyosensör, Enzim, Gıda, Su

Acetylcholinesterase Inhibition Based Biosensors Developed by Using Conducting Polymers for Pesticide Analyses

ABSTRACT

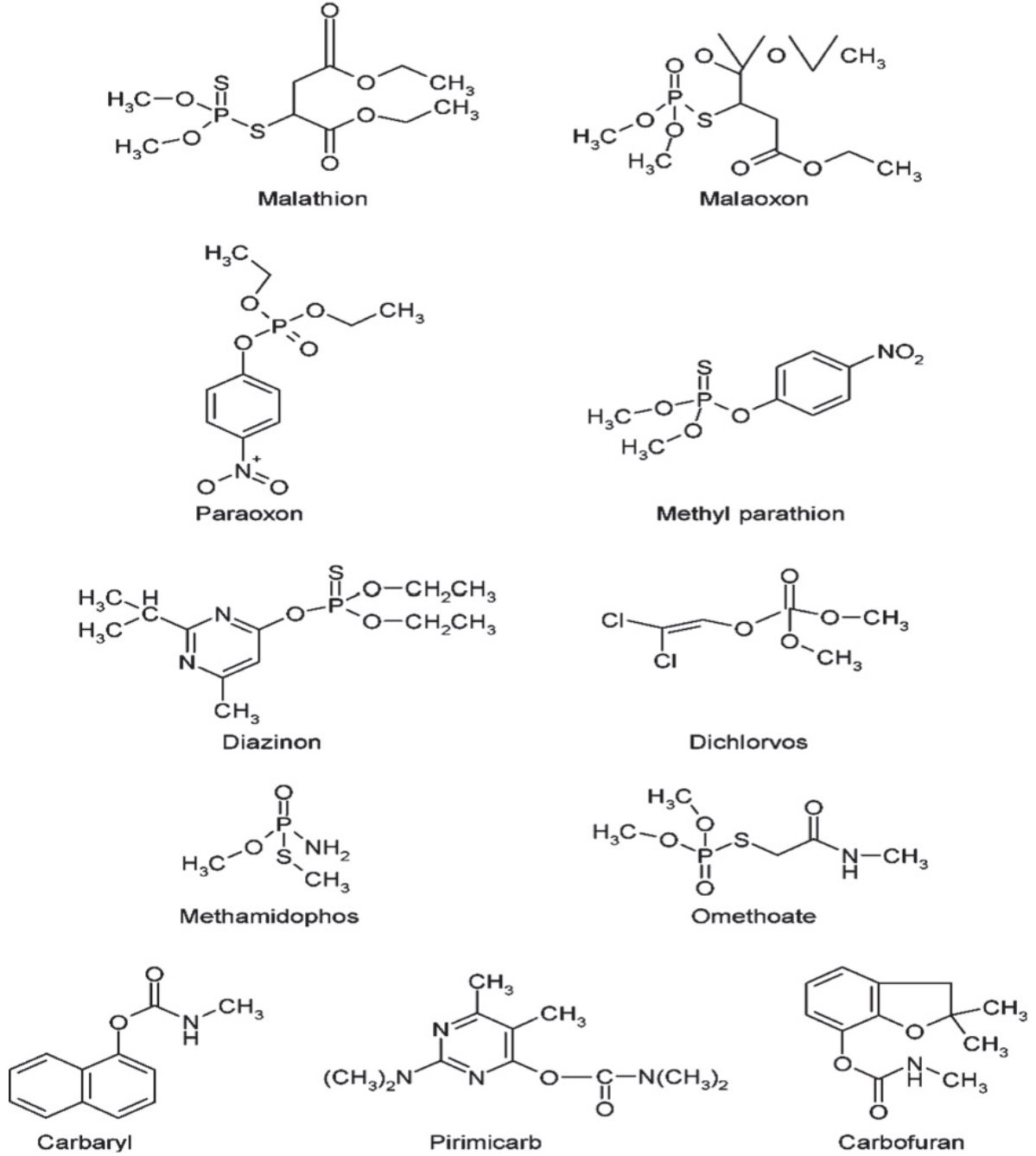
Pesticides commonly used worldwide are chemicals used as agricultural, industrial, domestic and war materials. Although pesticides are very strongly associated with many health problems, there is a serious lack of monitoring and identification of these pollutants. Conventional chromatographic methods such as high performance liquid chromatography, capillary electrophoresis and mass spectrometry are effective methods for pesticide analysis in foods. However, these methods have considerable limitations in terms of complex processes, time-consuming preparatory steps, expensive equipment and expert staff requirements. Biosensors are preferred devices for the determination of pesticides because of their simplicity, high sensitivity, short analysis time and low analysis cost, as well as their applicability to real time measurements. For more than fifteen years, biosensors based on enzyme inhibition have been developed to monitor pesticide residues for food control and safety. Conductive polymers have been used during constructions of these pesticide biosensors. In this study, studies on biosensors used for pesticide analyses were summarized and then researches on acetylcholinesterase inhibition based biosensors developed by using conducting polymers for pesticide analyses were reviewed.

Keywords: Pesticide, Conducting polymer, Biosensor, Enzyme, Food, Water

GİRİŞ

Dünya genelinde yaygın olarak kullanılan pestisitler, tarım, endüstri, evsel ve savaş malzemesi olarak kullanılan kimyasallardır. Tarım ve endüstride kullanılmasındaki artıştan dolayı, pestisitler en önemli çevresel kirlenmeler arasında yer almaktadır. Bu bileşiklere uzun süreli maruz kalma nedeniyle çok ciddi çevre sorunları ortaya çıkmaktadır. Organofosforlu ve karbamatlı insektisitlerin yoğun olarak kullanımları, gıdaların ve yer altı sularının kirlenmesine neden

olmaktadır. Pestisitlerin (Şekil 1) hava, su, toprak ve organizmalarda dağılımları çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik değişikliklere yol açmaktadır. Aynı zamanda, pestisitler çok kolaylıkla oral, dermal ve solunum yoluyla adsorbe edilerek vücutta dokulara hızlıca dağılabilmektedirler. Organofosforlu ve karbamatlı pestisitlerin toksisitesi pestisit kimyasal yapısına göre değişiklik göstermektedir [1, 2]. Bu pestisitlerden bazılarının moleküler yapıları Şekil 1'de verilmektedir [3].



Şekil 1. Bazı organofosforlu ve karbamatlı pestisitlerin moleküler yapıları [3]

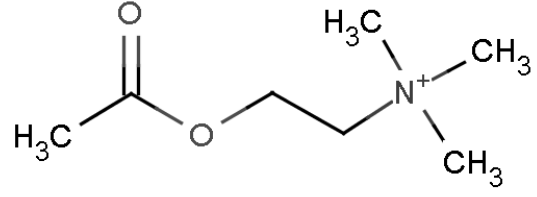
Pestisitler çevreye kasıtlı olarak salınırlar ve çeşitli prosesler sonucu da kirlilik yaratırlar. Pestisitlerin birçok sağlık problemi ile çok kuvvetli ilişkisi olmasına rağmen,

bu kirlenmelerin izlenmesinde ve tayininde ciddi eksiklik bulunmaktadır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, kapiler elektroforez ve kütle spektrometresi gibi

geleneksel kromatografik metotlar gıdalarda pestisit analizi için etkili yöntemlerdir. Ancak kompleks prosesleri, zaman alıcı ön hazırlık aşamaları, pahalı cihazlara ihtiyaç duyulması ve uzman personel gerektirmesi açısından oldukça fazla kısıtlamaları vardır. On beş yıldan fazla bir süredir gıda kontrol ve güvenliği açısından pestisit kalıntılarının izlenmesi için basit, hızlı ve ultra hassas cihazlar olan asetilkolinesteraz inhibisyonuna dayalı biyosensörler geliştirilmektedir. Bu biyosensörler, numune hazırlamayı basitleştirerek veya ortadan kaldırarak işlem başına maliyette önemli düşüşle birlikte yerinde ve gerçek zamanlı yapılması gereken testleri daha kolay ve hızlı bir hale getirerek klasik analitik yöntemlerin yerini alma potansiyeline sahiptir. Ayrıca bu cihazlar kolaylıkla minyatürize edilebilirler ve kompleks matrislerde diğer bileşiklerin yapabileceği girişimlere karşı da duyarlıdır. Enzimatik biyosensörler, pestisitlerin, fosforlu ve karbamatlı sınıflarını izlemede asetilkolinesteraz (AChE) ve onun substratı asetilkolin (ACh) arasındaki enzimatik reaksiyonu inhibe ederek izlenmesine imkân sağlar. Bu bileşikler, enzimin aktif estearik bölgesine bağlanarak fosforilasyon ve karbomilasyon yoluyla AChE'nin katalitik üçlüsündeki (histidin, serin ve aspartik asit) serin kalıntısını bloke ederek biyokatalitik aktivitesini inhibe eder [4].

ASETİLKOLINESTERAZ (AChE)

Asetilkolin sinir ve kasların çakıştığı kavşaklarda, iç organ motor sistemlerindeki lenf bezlerinde ve merkezi sinir sisteminin çeşitli bölgelerinde bulunan sinir hücresi iletilicisidir [5] (Şekil 2). Kolinerjik iletimin işlevi hakkında çok şey bilinmesine karşın, merkezi sinir sisteminde ACh'nin etkileri iyi anlaşılammıştır. Asetilkolin, nöronlarda kolinasetiltransferaz ile kolin ve asetilesteraz'dan sentezlenir. Yapılan çalışmalar asetilkolinin bireysel nöronların hızını etkilediğini göstermektedir. Asetilkolin, asetilkolinesteraz enzimi ile kolin ve asetik asite hızlıca hidroliz olur. AChE tipik olarak sinir, kas ve bazı kan ile ilgili hücrelerde sentezlenir. Enzim, uyarılabilen dokularda, hem sinir hem de kasların hücre dışında lokalize olmuştur. AChE inhibitörleri, Alzheimer hastalığı, glokom, düz kas zaafiyeti ve otonom sinir sistemi fonksiyonlarının çeşitli bozukluklarının tedavisinde kullanılır [6]. AChE'nin katalitik aktivitesi çok yüksek olmakla birlikte saniyede 25.000 ACh molekülünü kolin ve asetik asite dönüştürür. Oluşan kolin, yeni ACh molekülünü oluşturmak üzere tekrar sinir merkezlerine aktarılır [7].

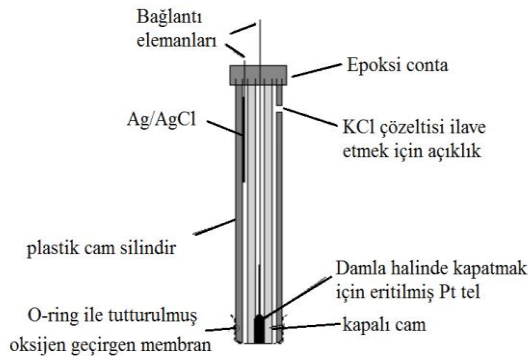


Şekil 2. Asetilkolinin moleküler yapısı

AChE aktif bölgesini katalitik olarak koordine olmuş üç önemli amino asitin (histidin, serin ve aspartik asit) karakterize ettiği hidrolaz ailesine ait bir enzimdir [8, 9]. Enzim katalizi, üçlünün anyonik bağlanma tarafının, ACh'nin pozitif yüklü amonyum grubunu çekmesiyle meydana gelir. Serin hidroksil grubu, üçlüdeki komşu histidin grubu tarafından deprotonasyonundan sonra estere saldırır [10]. Pestisitler gibi inhibitörler varlığında aktif bölgede bulunan nükleofilik serin hidroksil grubu, pestisitte bulunan fosfor atomuna kovalent bağla bağlanır. Benzer durum karbamatların karbonil karbonu ile de yaşanır [11, 12]. Dolayısıyla, organofosfat ve karbamatların tayini için asetilkolinesterazın inhibisyonu prensibi çok sık kullanılmaktadır [13-16].

ENZİM İNHİBİSYONU TEMELLİ BİYOSENSÖRLERİN GELİŞİMİ

Biyosensör, fizikokimyasal bir transduser (enerji aktarımı yapan sistem) içine entegre edilmiş biyolojik bir materyal veya biyolojik olarak türetilmiş bir algılama elemanı içeren kompakt bir analitik cihaz olarak tanımlanabilir. Bu şekilde geliştirilen bir cihazın amacı, bir veya birden fazla analitle orantılı olan sürekli bir elektronik sinyal üretmektir [17]. Biyosensör kavramı ilk kez Profesör Leland C. Clark Jr. tarafından 1956 yılında oksijen elektrodu ile tanımlanmıştır (Şekil 3) [18]. Clark bu çalışmayı temel alarak vücutta ölçülebilen analit aralığını arttırmak amacıyla, 1962'de New York Bilim Akademisi sempozyumunda membran içerisine sandviç edilen enzim iletim mekanizmaları ile elektrokimyasal sensörlerin (pH, polarografik, potansiyometrik veya iletkenlik) nasıl daha akıllı yapılabileceği konusundaki çalışmasını sunmuştur. Clark, oksijen elektroduna, diyaliz membran kullanarak glukoz oksidazı tutturarak hazırladığı sistem ile oksijen derişimindeki azalmanın glukoz derişimi ile orantılı olduğunu göstermiştir. Clark ve Lyons yayınladıkları bu makalede, birçok yazarın yanlışlıkla, Updike ve Hicks [19]'e atıfta bulunduğu "enzim elektrodu" terimini ilk kez kullanmışlardır [20].



Şekil 3. Clark oksijen elektrodunun sembolik gösterimi [18]

Literatürde, glukoz tayini için glukoz oksidaz enziminin kullanıldığı biyosensörler gibi, enzimlerin substratlarını tayin etmeye yönelik birçok çalışma mevcuttur. Son zamanlarda enzim inhibisyonu yoluyla bileşiklerin biyosensörlerle ilgili tayini konusunda yapılan çalışmaların da sayısı artmaya başlamıştır. Bu tip biyosensörlerin çalışma prensibi inhibitör varlığında ve yokluğunda enzim aktivitenin ölçülmesine dayanır. Klinik anlamda enzim inhibisyonu oldukça önem taşımaktadır. Çünkü biyolojik birçok reaksiyonun katalizlenmesi enzimler üzerinden gerçekleşmektedir. Kullanılan ilaçların uygun dozda alınmaması, pestisitlerde olduğu gibi toksik etki yaratmaktadır.

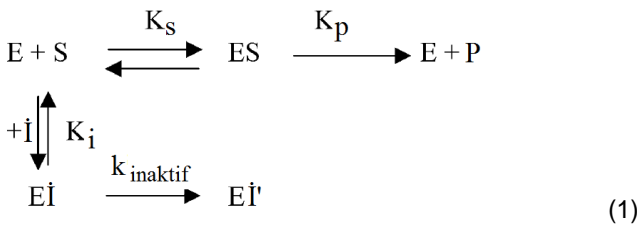
Enzim inhibisyonuna dayanan biyosensörler ile ilgili ilk çalışma, Guilbault ve arkadaşları tarafından yapılmış ve 1962'de Analytical Chemistry dergisinde yayınlanmıştır [21]. Bu çalışmada elde edilen ve biyolojik olarak hassas olan cihaz, kolinesteraz enzimi kullanılarak organofosforlu bileşiklerin tayini için kullanılmıştır. Bu tarihten sonra da enzim inhibisyonu temelli birçok çalışma literatüre girmiştir.

ENZİM İNHİBİSYONU

Enzim ve inhibitör arasındaki etkileşim genellikle kompleks bir yapıdadır. Yüksek hassasiyete sahip, inhibisyona dayalı bir enzim sensörü için enzim ve substrat derişimi ve inkübasyon süresi gibi bazı anahtar parametrelerin optimizasyonunun yapılması gerekmektedir. Bunun yanında enzim ve toksik bileşik arasındaki etkileşim sonucu olarak ortaya çıkan inhibisyonun tipi de önem arz etmektedir. İnhibisyon çeşitleri, geri dönüşümsüz (irreversible) ve tekrarlanabilir (reversible) inhibisyon olarak sınıflandırılabilir. Bu inhibisyon türlerinin mekanizmaları aşağıda tanımlanmaya çalışılmıştır.

Geri Dönüşümsüz (Irreversible) İnhibisyon

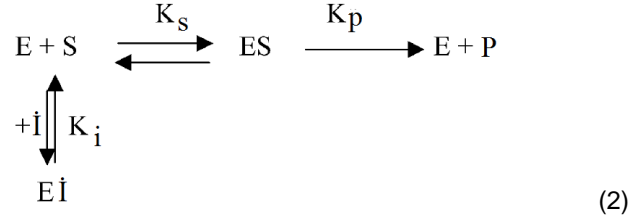
Geri dönüşümsüz inhibisyon inhibitör ve enzimin aktif merkezi arasında oluşan kovalent bağın varlığı ile belirlenebilir (1). Kovalent bağlanma sonucunda enzim inaktif hale gelmektedir [22]. Geri dönüşümsüz terimi, enzim-inhibitör kompleksinin ayrışmasının ancak enzimin yok edilmesiyle, hidrolizle ya da oksidasyonu ile sonuçlandığını ifade etmektedir. Bu işlem genellikle aşağıdaki eşitlikte olduğu gibi kademeli olarak devam eder;



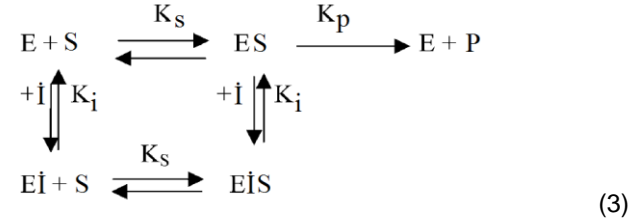
Tekrarlanabilir İnhibisyon

Tekrarlanabilir inhibisyonda, geri dönüşümsüz inhibisyonun aksine inhibe edilen enzim, tampon ya da suyla basit bir yıkama ile orijinal etkinliğini geri

kazanabilir. Bu tip inhibisyonlarda substrat konsantrasyonunun ya da inhibitöre oranla enzim konsantrasyonunun artırılması ile enzim inhibitör ilişkisi tersine çevrilebilmektedir. Literatürde çeşitli tekrarlanabilir inhibisyon türlerine rastlanmaktadır. Bunlardan ilki, inhibitörün (I) enzimin aktif bölgesine substratla (S) yarışarak bağlandığı yarışmalı (kompetitif) inhibisyon (2).

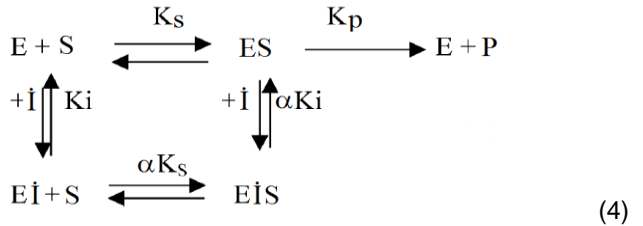


İkincisi, substratla yapısal benzerliği olmayan inhibitörün, substratla aynı bölgeye bağlanmadığı, ya serbest enzime ya da ES kompleksine bağlanarak reaksiyonu yavaşlattığı yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon (3). Yani substrat ve inhibitör birbirleri ile hiç yarışmazlar.

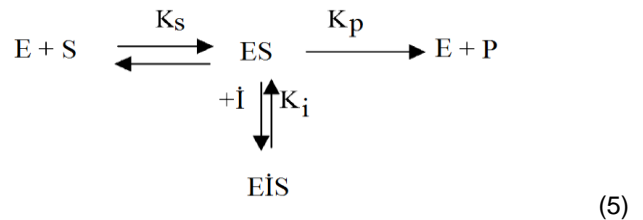


Yarışmalı ve yarışmasız inhibisyonlar enzim kinetiğini farklı şekillerde etkilerler [23]. Yarışmalı inhibisyon maksimum hızı (V_{max})'ı değiştirmez fakat Michaelis-Menten sabitini (K_M) yi artırır, bununla birlikte yarışmasız inhibisyonda K_M değişmez ancak V_{max} düşer.

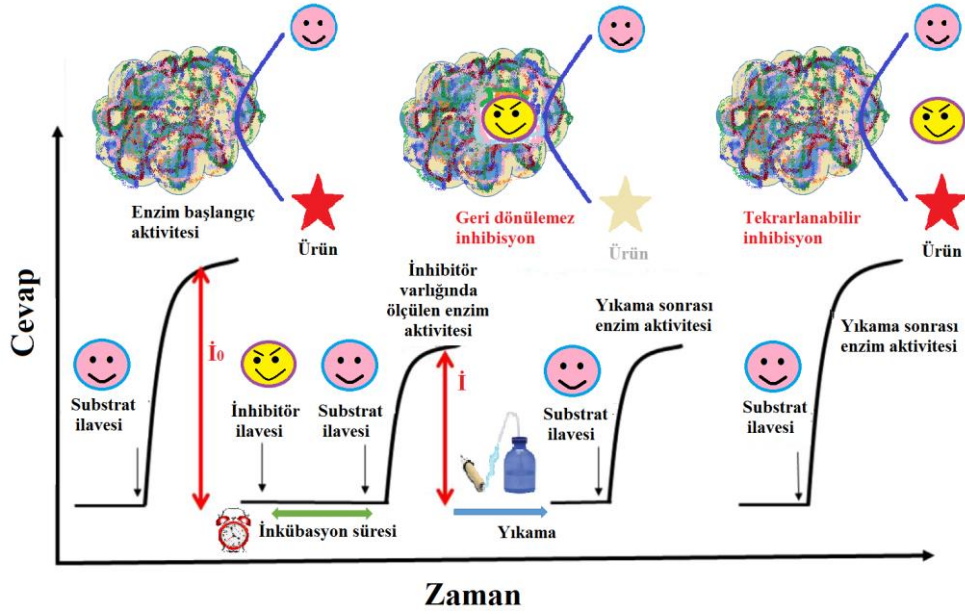
Karışık (mix) inhibisyon olması durumunda, inhibitör enzim ve enzim-substrat kompleksine farklı bir ilişki ile bağlanır (4).



Yarışmasız (unkompetitif) inhibisyonda ise inhibitör sadece enzim-substrat kompleksi oluştuğu zaman ES kompleksine bağlanarak ürün oluşumunu sonlandırır (5).



Şekil 4. yukarıda anlatılan geri dönüşümsüz ve tekrarlanabilir inhibisyon türlerini şematize ederek özetlemektedir [24].



Şekil 4. Enzim inhibisyonuna dayalı biyosensör kullanılarak geri dönüşümsüz ve tekrarlanabilir inhibitör tespiti için farklı protokoller (Amine ve ark. [24]'dan adapte edilmiştir)

İLETKEN POLİMERLER

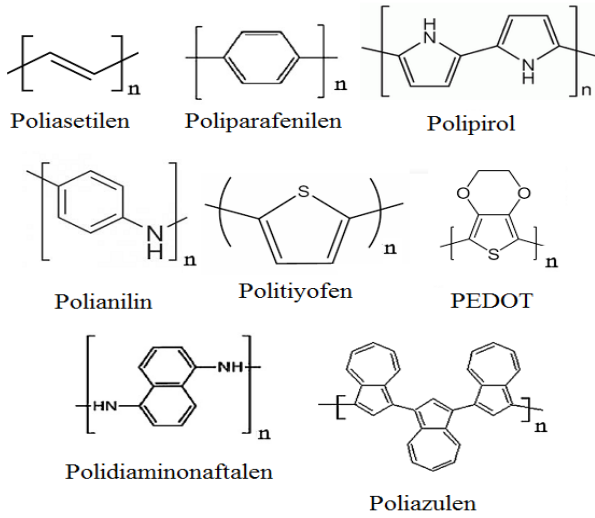
İletken polimerler, son yıllarda en sık çalışılan materyaller arasında yer almaktadır (Şekil 5). Şarj edilebilir piller, optik cihazlar, elektrolitik kapasitörler, güneş pilleri, sensör ve biyosensör çalışmaları bu materyallerin uygulama alanları arasında en iyi bilinenleridir [25-28]. Ayrıca, iletken polimerlerin elektrokimyasal olarak biriktirilmeleri kolay olduğu için elektrot yüzeyinde duyarlı bir tabakanın oluşmasını sağlamaktadırlar. Bu özellikleri, iletken polimerleri biyosensörlerde elektron iletim mekanizması (transducer) olarak kullanılmalarını tercih edilir hale getirmektedir. Moleküler olarak elektronik olan bu materyaller polimer tabakanın kalınlığı, elektriksel özellikler ve biyoaktif moleküllerin yapıya tutturulabilmesi gibi farklı parametrelerin kontrolünü mümkün kılmaktadır. Dahası, iletken polimer temelli biyosensörler biyoyumumluluk, hücre içi uygulanabilme, ilaç ya da metabolitlerinin salınımlarını kontrol altında tutabilme ve minyatürize edilebilir gibi özellikleri nedeniyle ideal bir biyosensör için ihtiyaç duyulan özellikleri karşılamaktadır. Bu amaçla en sık çalışılan iletken polimerler polianilin, politiyofen, polipirol (PPy) ve bunların türevleridir.

İletken polimerler konusundaki çalışmalar ilk kez College of London Hastanesinde profesör olan Dr H. Letheby'nin 1862'de iletken polimerlerin kimyasal reaksiyon davranışlarını analiz etmesiyle başlamıştır. Anilin sülfatın elektropolimerizasyonu konulu Journal of the Chemical Society dergisinde yayınlanan çalışma, anilin sülfatın elektropolimerizasyon ile platin elektrot üzerine mavimsi bir katı tabaka haline geldiğini göstermiştir [29]. Sonrasında, Natta ve arkadaşları 1958'de $Al(Et)_3/Ti(OPr)_4$ başlatıcısı kullanarak asetileni ilk kez polimerleştirmişlerdir. Elde edilen polimer yüksek kristallığe ve yüksek molekül ağırlığına sahiptir. Kullanılan bu yöntem ile elde edilen bileşiğin havaya karşı duyarlı olması, ufalanması ve çözünmez olmasından

dolayı çok fazla dikkat çekmemiştir [30]. Bu bileşik 1967'ye kadar bilimsel bir merak olarak kalmıştır. Tokyo Teknoloji Enstitüsü öğrencisi olan Hideki Shirakawa, deneysel bir hata sonucu poliasetileni gümüş renkli bir film olarak sentezlemiştir. Bu sentezde Ziegler Natta katalizörünün olması gerekenden 1000 kat daha fazla kullanıldığı farkedilmiştir. Shirakawa, MacDiarmid ve Heeger, 1977 yılında yaptıkları çalışmalarında Ziegler-Natta katalizörü kullanılarak metalik görüntüde olmasına rağmen yeterince iletken olmayan, gümüş renkli poliasetilen filmlerin klor, brom ve iyot buharlarıyla muamelesi sonucu mekanik özelliklerinin iyileştiğini ve ilk hallerinden 10^9 kat daha fazla iletken olabildiklerini görmüşlerdir [31]. Kullandıkları bu yöntemle dop edilmiş poliasetilenin iletkenliği 10^5 S/m'ye kadar çıkmıştır. Elde edilen bu iletkenlik değeri bilinen en iyi yalıtkan materyallerden biri olan teflonun iletkenliği (10^{-16} S/m)'den çok çok yüksektir ve metallerin iletkenlik değerine yakındır. Bu gelişmeler sonucunda "İletken Polimer" terimi ortaya atılmıştır [32]. Shirakawa, MacDiarmid ve Heeger ise iletken polimerler konusunda yaptıkları çalışmalardan dolayı 2000 yılında Kimya Nobel Ödülünü kazanmışlardır.

İLETKEN POLİMER TEMELLİ ASETİLKOLİNESTERAZ İNHİBİSYONUNA DAYALI PESTİSİT BİYOSENSÖRLERİ

Gıda ve sulardaki düşük pestisit seviyelerinin sürekli olarak izlenmesi, insanlık açısından önemli bir faaliyet haline gelmiştir. Pestisit seviyelerinin izlenmesi sıklıkla yerinde ölçüm sağlayabilecek, gerçek zamanlı, çok hızlı ve çok düşük konsantrasyon düzeylerinde tepki verebilecek yeni analitik teknikler gerektirmektedir. Bu alandaki en umut verici araştırma alanlarından biri de enzim sensörleridir. Enzim sensörlerinde transducer olarak kullanılan iletken polimerler ise yukarıda anlatılan özelliklerin sağlanması açısından eşi bulunmaz materyallerdir.



Şekil 5. Sık çalışılan bazı iletken polimerlerin moleküler yapıları

Bu konu ile ilgili yapılan ilk çalışmalardan birinde, işlenmiş polianilin ile modifiye edilmiş, camı karbon ve düzlemsel epoksi grafit elektrotlara dayanan kolinesteraz (asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz) sensörleri geliştirilmiş ve pestisit tayininde kullanılmaya çalışılmıştır. Elektrot yüzeyini polianilinle modifiye etmenin pestisitlere karşı yüksek operasyonel kararlılık ve hassasiyeti sağladığı belirtilmiştir. Elde edilen tespit sınırları (komafos için 0.002 mgL^{-1} , triklorfon için 0.04 mgL^{-1} , aldikarb için 0.03 mgL^{-1} , metiokarb için 0.08 mgL^{-1}), hazırlanan elektrotların sulardaki eşik seviyerdeki kirlenmeleri bile tespit edebilmelerini mümkün kılmaktadır [33].

Somerset ve ark. [34], üzeri öncelikle kendi kendine kurulmuş tek tabaka merkaptobenzotiazol daha sonrada içerisinde asetilkolinesteraz tutuklanmış polianilinle modifiye edilen altın elektrodu organofosfatlı pestisit tayini için geliştirmiş ve değerlendirmişlerdir. Voltametrik sonuçlar, %2 (v/v) 0.05 M fosfat tampon ve 0.1 M KCl (pH 7.2) çözeltisi içeren organik bir çözücü içerisinde, anaerobik şartlar altında Au/MBT/PANI/ACHe/PVAc ince-film biyosensörünün asetiltiyokolin substratı ilavesi ile formal potansiyel değerinin anodik olarak kaydığını göstermiştir. Tespit sınırları ise aseton-salin fosfat tampon çözeltisinde diazinon için 0.147 ppb ve fention için 0.172 ppb, etanol-salin fosfat tampon çözeltisinde ise diazinon için 0.180 ppb ve fention için 194 ppb olarak belirlenmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada, sebzelerde en sık kullanılan iki pestisit olan metilparatyon ve klorprifos tayini için elektrokimyasal bir biyosensör tanımlanmıştır. Altın üzerine tiyol sonlandırılmış tek iplikli oligonükleotid (ssDNA) ile kaplanmış tek duvarlı karbon nanotüplerin (SWCNT) kendi kendine kurulmuş tek tabakaları (SAMs), asetilkolinesteraz immobilizasyonu için nano boyutta polianilin hazırlamak üzere kullanılmıştır. Bu biyosensör için anahtar basamak, elektrot yüzeyi civarında pH'daki küçük değişikliklere neden olan AChE-asetilkolin enzimatik reaksiyonudur. Pestisitler enzim reaksiyonunun inhibe olması üzerinden tayin edilmektedir. Metilparatyon ve klorprifos tayini için

dinamik aralık 1.0×10^{-11} ve $1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ ($0.6 < SD < 3.5$) arasında iyi bir tekrarlanabilirlik ve kararlılık göstermiştir. Hazırlanan biyosensör nehir suyuna metilparatyon ve klorprifos katkı yapılarak, bu pestisitlerin tayinini yapmak üzere kullanılmıştır. Metilparatyon ve klorprifos için $1.0 \times 10^{-12} \text{ M}$ olarak bulunan tespit sınırları Avrupa Çevresel Şubesi ve diğer çevre koruma örgütleri tarafından tavsiye edilen maksimum kirlilik seviyesinin de altındadır [35].

Chauhan ve ark. [36] altın (Au) elektrot üzerine çinkosülfür (ZnS) nanopartikülleri (ZnSNPs) ve poli(indol-5-karboksilik asit)'in elektrokimyasal olarak biriktirilmiş nanokompozitinin üzerine fare beyinden izole edilmiş asetilkolinesteraz immobilize edilerek hazırlanmış organofosforlu bileşiklerin tayini için yüksek hassasiyete sahip amperometrik yeni bir biyosensör dizayn etmişlerdir. Asetilkolin klorür varlığında, ZnSNPs düşük potansiyellerde elektron transfer reaksiyonlarını hızlandırır ve enzimatik olarak oluşan tiyokolinin elektrokimyasal oksidasyonunu katalizler. Böylece tespit hassasiyeti artmaktadır. Optimum koşullar altında (fosfat tamponu, pH 7.5 ve 30°C), asetilkolinesterazın malatyon ve klorprifos ile inhibisyonu bu pestisitlerin, sırasıyla, 0.1-50 nM ve 1.5-40 nM derişim aralıklarında orantılıdır. Geliştirilen biyosensör katkılanmış musluk suyu numunelerinde kabul edilebilir bir doğrulukla (%95-100) malatyon ve klorprifosu tayin edebilmiştir. Enzim elektrodun uzun bir depolama kararlılığı (4°C 'de depolandığında, 2 ay içerisinde başlangıç aktivitesinin %50'si kalır) vardır.

Konu ile ilgili göze çarpan çalışmalardan biri de Ekiz Kanik ve ark. [37] tarafından asetilkolinesteraz ve kolinesterazın iletken polimer poli (SNS-NH₂) filmler üzerine kovalent bağlanma tekniğiyle birlikte immobilize edilerek pestisit tayini için kullanıldıkları çalışmadır. Elektrokimyasal polimerizasyon, üç elektrotlu hücrede dönüşümlü voltametri tekniğiyle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen asetilkolin biyosensörünün karakterizasyonu pH, enzim yüklemesi, lineer cevap aralığı ve raf ömrü optimize edilerek yapılmıştır. Lineer aralık 0.12-10 mM arası ve raf ömrü 4 hafta olarak belirlenmiştir. Hassasiyet $2.19 \mu\text{AmM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ 'dir. Dizayn edilen biyosensör katkılanmış musluk suyunda paraokson etil tayini için test edilmiştir. Sonuçlar ticari kantitatif bir yöntem olan HPLC-DAD ile karşılaştırılmıştır. Her iki yöntemle elde edilen sonuçların lineer korelasyonu ($R^2 = 0.998$) olarak elde edilmiştir.

Aynı çalışma grubunun yeni bazı araştırmacılarla yapmış olduğu bir diğer çalışmada organofosforlu pestisitlerin tayini için çok duvarlı karbon nanotüp kullanarak sentezledikleri iletken polimer esaslı yeni bir amperometrik biyosensör geliştirilmiştir [38]. Asetilkolinesteraz, modifiye edilmiş grafit elektroda kovalent bağlanma ile immobilize edilmiştir. Karbonnanotüpler elektrokimyasal uygulama ile fonksiyonelleştirilmiştir. Poli(4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)benzenamin) (poli(SNS-NH₂)) iletken polimeri biyomolekül immobilizasyonu için matris özelliği incelenmek üzere elektropolimerizasyon yoluyla sentezlenmiştir. Seçilen bu yöntem, elektron transfer hızını daha düşük potansiyellerde (+100 mV, Ag referans

elektroduna karşı) arttırmış ve asetiltiyokolinin elektrokimyasal oksidasyonunu çok etkili bir biçimde katalizlemiştir. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM), X-ray fotoelektron spektroskopisi (XPS), temas açısı ölçümleri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), dönüşümlü voltametri (CV) teknikleri, yüzey morfolojileri ve elektrokimyasal karakterizasyonlarında meydana gelen değişiklikleri izlemek üzere kullanılmıştır. Önerilen biyosensör hızlı cevap süresi (6s), geniş bir lineer aralık (0.05 mM and 8.00 mM) ve asetiltiyokolin için yüksek hassasiyetle ($24.16 \mu\text{A mM}^{-1}\text{cm}^{-2}$) beraber düşük tespit sınırı (0.09 mM) vadedmektedir. AChE'in enzimatik aktivitesi üzerine paraokson, paratyon ve klorfenvinfosun etkisi tayin edilmiştir. Biyosensör daha sonra pestisit katkılanmış musluk suyunda pestisit tayini için test edilmiştir. Sonuçların, HPLC/DAD tekniği ile elde edilen sonuçlar ile uyumlu olduğu anlaşılmıştır.

Bir başka çalışmada [39] ise; çekirdek kabuk nanoyapılı, iğne benzeri polianilin ile kaplanmış oyuk karbon kürelerle (HCS@PANI) hazırlanmış kompozitler üzerine asetilkolinesterazın immobilize edilmesi yoluyla yeni bir elektrokimyasal biyosensör dizaynedilmiştir. Hazırlanan biyosensör asetilkolinesterazın

kemisorpsiyon/desorpsiyon prosesinin indikatör olarak kullanılmasını temel olarak malatyonun hızlı tayini için kullanılmıştır. Nanokompozit, yüksek spesifik yüzey alanı ve kimyasal işlevsellik göstermenin yanında güçlü elektrokimyasal aktiviteye de sahiptir. HCS@PANI nanokompoziti üzerine AChE'in adsorbe edildikten sonra AChE/HCS@PANI biyosensörünün asetiltiyokolin klorüre karşı elektrokimyasal katalizi malatyon varlığında inhibe edilmiştir. Malatyon tayini için geliştirilen biyosensör, $1.0 \text{ ngmL}^{-1} - 10 \mu\text{gmL}^{-1}$ malatyon lineer derişim aralığında 0.16 ngmL^{-1} ile düşük tespit sınırı göstermiştir. Bununla birlikte, geliştirilen biyosensörün yüksek seçicilik ve iyi tekrarlanabilirliğe sahip olduğu ve malatyon tayini için kullanılabilir olduğu gösterilmiştir. AChE immobilizasyonu ve asetiltiyokolin katalizi için hassas bir tabaka olan HCS@PANI nanokompoziti kullanılarak önerilen metodun, yüksek hassasiyete sahip pestisit tayinleri konusunda potansiyel olduğu gösterilmiştir.

Asetilkolinesteraz inhibisyonuna dayalı pestisit tayini ile ilgili geliştirilen iletken polimer esaslı diğer bazı biyosensör çalışmalarına ait gerekli bazı bilgiler Tablo 1'de özetlenmektedir.

Tablo 1. Pestisit tayini için geliştirilen iletken polimer esaslı AChE inhibisyonuna dayalı biyosensörler

Elektrot Materyali	Analiz Tekniği	Immobilizasyon metodu	Tespit Sınırı	Lineer Aralık	Analit/İnhibitör	İnkübasyon Süresi (dakika)	Kararlılık (gün)	Kaynak
Karbon nanotübe enkapsüle edilmiş polipirol ve polianilin kopolimeri	Amperometrik	Adsorpsiyon	1.0 ng/mL	0.01-0.5 $\mu\text{g/mL}$ ve 1-25 $\mu\text{g/mL}$	Malatyon	15	30	[40]
Polipirol	Amperometrik	Çapraz bağlama ve Tutuklama	1.1 ppb (paraokson) 0.12 ppb (karbofuran)	0.1-12.5ppb ve 12.5-150ppb karbofuran 0.025-2 ppb ve 5-60 ppb	Paraokson, Karbofuran	60	120	[41]
Altın-polipirol/camsı karbon elektrot (Au-PPy/GCE)	Dönüşümlü Voltametri	Adsorpsiyon	2 ngmL ⁻¹	0.005-0.12 ve 0.5-4.5 $\mu\text{g/mL}$	Metil paratyon	12	30	[42]
Camsı karbon/çok duvarlı karbon nanotüp/polianilin (GC/MWCNT/PANI)	Kronoamperometrik	Adsorpsiyon	1.4 $\mu\text{mol/L}$ (karbaril) 0.95 $\mu\text{mol/L}$ (metomil)	karbaril 9.9-49.6 $\mu\text{mol/L}$ metomil 4.9 ve 29.2 $\mu\text{mol/L}$	Metomil, karbaril	10	60	[43]
Poli(3,4-etilendioksitiyofen) polistirensülfonat (PEDOT:PSS)	Dönüşümlü Voltametri	Fiziksel tutuklama	4.4×10^{-9} M	$3.3 \times 10^{-9} - 7.6 \times 10^{-7}$ M	Klorpirifos-okson	10	10	[44]

SONUÇ

Biyosensörlerin basit kullanım özellikleri, yüksek duyarlılık, kısa analiz süresi, düşük analiz maliyeti ve gerçek zamanlı ölçümlere uygulanma potansiyelleri gibi özellikleri nedeniyle gıda işleme endüstrisinin de içinde bulunduğu birçok alanda geniş uygulama alanları bulunmaktadır. Gıda endüstrisinde gıdalarda bulunabilecek kalıntı pestisit miktarlarının rutin olarak belirlenmesi insan sağlığı açısından son derece önemlidir. Pestisit tayini için kullanılan yöntemlerin bir bölümü zaman alıcı, nitelikli iş gücü gerektiren ve pahalı yöntemlerdir. Pestisit tayininde biyosensörlerin kullanımı önemli bir alternatif olarak görülmektedir. Pestisitlerin fosforlu ve karbamatlı sınıfları, enzimin aktif esterik bölgesine bağlanarak fosforilasyon ve karbomilasyon yoluyla AChE'in katalitik üçlüsündeki ((histidin, serin ve aspartik asit) serin kalıntısını bloke ederek biyokatalitik aktivitesini inhibe etmektedirler. Asetilkolinesteraz inhibisyonuna dayalı pestisit biyosensörü geliştirilmesi ile ilgili çalışmalarda enzim immobilizasyonu için

adsorbsiyon, çapraz bağlama ve polimer matriks içerisine tutuklama gibi farklı yöntemler kullanılmıştır. Son yıllarda asetilkolinesteraz inhibisyonuna dayalı iletken polimer esaslı pestisit biyosensörü geliştirilmesi ile ilgili çalışmalarda artış dikkati çekmektedir. Bu çalışmalarda asetilkolinesteraz inhibisyonuna dayalı biyosensörler kullanılarak farklı pestisitlerin yüksek hassasiyetle tespit edilebildiği ve sonuçların referans metotlarla uyumlu olduğu gösterilmiştir. Yine de yapılan çalışma sayısı yeterli olarak görülmemektedir. İletken polimerlerin, bunların türevlerinin, kopolimerlerinin ve kompozitlerinin asetilkolinesteraz inhibisyonuna dayalı biyosensörlerde transducer olarak kullanımları yaygınlaştırılmalıdır. Konu ile ilgili olarak yapılacak yeni çalışmalarla hızlı, kullanım kolaylığı olan, ekonomik, kararlı ve düşük tayin sınırlarına sahip ideal pestisit biyosensörlerinin geliştirilmesi gelecek vadedmesi açısından önemli görülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Chapalamadugu, S., Chaudhry, G.R., 1992. Microbiological and biotechnological aspects of metabolism of carbamates and organophosphates. *Critical Reviews in Biotechnology* 12: 357–389.
- [2] Dikshith, T.S.S., 1991. Pesticides. In: Dikshith, T.S.S. (Ed.), *Toxicology of Pesticides in Animals*, CRC Press, Boston, pp. 1–39.
- [3] Pundir, C.K., Chauhan, N., 2012. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. *Analytical Chemistry* 429: 19-31.
- [4] Singh, D.K., Agarwal, R.A., 1983. Inhibition kinetics of certain organophosphorus and carbamate pesticides on acetylcholinesterase from the snail *Lymnaea acuminata*. *Toxicology Letters* 19: 313–319.
- [5] Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.-S., McNamara, J.O., Williams, S.M., 2001. *Neuroscience*. The 2nd Edition. Sinauer Associates, Sunderland (MA), USA.
- [6] Taylor, P., Camp, S., Radić, Z., 2009. *Encyclopedia of Neuroscience* (Squire, L.R., Editor-in-Chief). Academic Press, Elsevier Inc., pp. 5–7.
- [7] Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., LaMantia, A.S., McNamara, J.O., White, L.E., 2008. *Neuroscience*. The 4th Edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- [8] Krasinski, A., Radic, Z., Manetsch, R., Raushel, J., Taylor, P., Sharpless, K.B., Kolb, H.C., 2005. In situ selection of lead compounds by click chemistry: target-guided optimization of acetylcholinesterase inhibitors. *Journal of American Chemical Society* 127: 6686–6692.
- [9] Manetsch, R., Krasinski, A., Radic, Z., Raushel, J., Taylor, P., Sharpless, K.B., Kolb, H.C., 2004. In situ click chemistry: enzyme inhibitors made to their own specifications. *Journal of American Chemical Society* 126: 12809–12818.
- [10] Woster, P.M., 2001. *Pharmaceutical Biochemistry*, HarperCollins, New York, USA.
- [11] Lin, G., Lee, Y.R., Liu, Y.C., Wu, Y.G., 2005. Ortho effect for inhibition mechanisms of butyrylcholinesterase by o-substitute phenyl L-butyl carbamates and comparison with acetylcholinesterase, cholesterol esterase, and phenol. *Chemical Research in Toxicology* 18: 1124–1131.
- [12] Schulze, H., Muench, S.B., Villatte, F., Schmid, R.D., Bachmann, T.T., 2005. Insecticide detection through protein engineering of *Nippostrongylus brasiliensis* acetylcholinesterase B. *Analytical Chemistry* 77: 5823–5830.
- [13] Andreescu, S., Avramescu, A., Bala, C., Magearu, V., Marty, J.-L., 2002. Detection of organophosphorus insecticides with immobilized acetylcholinesterase: comparative study between two enzyme sensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 374: 39–45.
- [14] Montesinos, T. Pérez-Munguia, S. Valdez, F. Marty, J.L., 2001. Disposable cholinesterase biosensor for the detection of pesticides in water miscible–organic solvents. *Analytica Chimica Acta* 431: 231–237.
- [15] Pogacnik, L., Franko, M., 2003. Detection of organophosphate and carbamate pesticides in vegetable samples by a photothermal biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 18: 1–9.
- [16] Prodromidis, M.I. Karayannis, M.I., 2002. Enzyme based amperometric biosensors for food analysis. *Electroanalysis* 14: 241–261.
- [17] Turner, A.P.F., Karube, I., Wilson, G.S., 1987. *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, Oxford, p. 770.
- [18] Clark, L.C.Jr., 1956. Monitor and control of blood tissue O₂ tensions. *Transactions American Society for Artificial Internal Organs* 2: 41–48.
- [19] Updike, S.J., Hicks, J.P., 1967. The enzyme electrode. *Nature* 214: 986–988.
- [20] Clark, L.C., Jr., Lyons, C., 1962. Electrode system for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences* 102: 29–45.
- [21] Guilbault, G.G., Kramer, D.N., Cannon, P.L.Jr., 1962. Electrochemical determination of organophosphorous compounds. *Analytical Chemistry* 34(11): 1437-1439.
- [22] Kitz, R., Wilson, I.B., 1962. Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase. *Journal of Biological Chemistry* 237: 3245–3249.
- [23] Segel, I.H., 1976. How to solve mathematical problems in general biochemistry? In *Biochemical Calculation*. 2nd Edition. Wiley, New York, pp. 208–223.
- [24] Amine, A., Arduini, F., Moscone, D., Paleschi, G., 2016. Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition. *Biosensors and Bioelectronics* 76: 180-194.
- [25] Diaz, A.F., Kanazawa, K.K., Gardini, G.P., 1979. Electrochemical polymerization of pyrrole. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 635-636.
- [26] Saraswathi, R., Gerard, M., Malhotra, B.D., 1999. Characteristics of aqueous polycarbazole batteries. *Journal of Applied Polymer Science* 74: 145-150.
- [27] Kawai, T., Kuwabara, T., Wang, S., Yoshino, K., 1990. Secondary battery characteristics of poly(3-alkylthiophene). *Japanese Journal of Applied Physics* 29: 602-605.
- [28] Weetall, H.H., Druzko, A.B., de Lera, A., Alvarez, R., Robertson, B., 2000. Measurement of proton release and uptake by analogs of bacteriorhodopsin. *Bioelectrochemistry* 51: 27-23.
- [29] Letheby, H., 1862. On the production of a blue substance by the electrolysis of sulphate of aniline. *J. Chem. Soc.* 15: 161-163.
- [30] Natta, G., Mazzanti, G., Corradini P., 1958. *Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti Lincei* 25(8): 3.
- [31] Shirakawa, H., Louis, E.J., MacDiarmid, A.G., Chiang, C.K., Heeger, A.J., 1977. Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH)_x. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 578-580.

- [32] Heinze J., 1991. Electrochemistry of conducting polymers. *Synthetic Metals* 41-43: 2805-2823.
- [33] Ivanov, A.N., Lukachova, L.V., Evtugyn, G.A., Karyakina, E.E., Kiseleva, S.G., Budnikov, H.C., Orlov, A.V., Karpacheva, G.P., Karyakin, A.A., 2002. Polyaniline-modified cholinesterase sensor for pesticide determination. *Bioelectrochemistry* 55: 75–77.
- [34] Somerset, V.S., Klink, M.J., Baker, P.G.L., Iwuoha, E.I., 2007. Acetylcholinesterase-polyaniline biosensor investigation of organophosphate pesticides in selected organic solvents. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 42: 297–304.
- [35] Viswanathan, S., Radecka, H., Radecki, J., 2009. Electrochemical biosensor for pesticides based on acetylcholinesterase immobilized on polyaniline deposited on vertically assembled carbon nanotubes wrapped with ssDNA. *Biosensors and Bioelectronics* 24: 2772–2777.
- [36] Chauhan, N., Narang, J., Pundir, C.S., 2011. Immobilization of rat brain acetylcholinesterase on ZnS and poly(indole-5-carboxylic acid) modified Au electrode for detection of organophosphorus insecticides. *Biosensors and Bioelectronics* 29: 82–88.
- [37] Ekiz Kanik, F., Kolb, M., Timur, S., Bahadir, M., Toppare, L., 2013. An amperometric acetylcholine biosensor based on a conducting polymer. *International Journal of Biological Macromolecules* 59: 111–118.
- [38] Kesik, M., Ekiz Kanik, F., Turan, J., Kolb, M., Timur, S., Bahadir, M., Toppare, L., 2014. An acetylcholinesterase biosensor based on a conducting polymer using multiwalled carbon nanotubes for amperometric detection of organophosphorous pesticides. *Sensors and Actuators B* 205: 39–49.
- [39] He, L., Cui, B., Liu, J., Song, Y., Wang, M., Peng, D., Zhang, Z., 2017. Novel electrochemical biosensor based on core-shell nanostructured composite of hollow carbon spheres and polyaniline for sensitively detecting malathion. *Sensors and Actuators B: Chemical* <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.11.161>.
- [40] Du, D., Ye, X., Cai, J., Liu, J., Zhang, A., 2010. Acetylcholinesterase biosensor design based on carbon nanotube-encapsulated polypyrrole and polyaniline copolymer for amperometric detection of organophosphates. *Biosensors and Bioelectronics* 25: 2503–2508.
- [41] Dutta, R.R., Puzari, P., 2014. Amperometric biosensing of organophosphate and organocarbamate pesticides utilizing polypyrrole entrapped acetylcholinesterase electrode. *Biosensors and Bioelectronics* 52: 166–172.
- [42] Gong, J., Wang, L., Zhang, L., 2009. Electrochemical biosensing of methyl parathion pesticide based on acetylcholinesterase immobilized onto Au-polypyrrole interlaced network-like nanocomposite. *Biosensors and Bioelectronics* 24: 2285–2288.
- [43] Cesarino, I., Moraes, F.C., Lanza, M.R.V., Machado, S.A.S., 2012. Electrochemical detection of carbamate pesticides in fruit and vegetables with a biosensor based on acetylcholinesterase immobilised on a composite of polyaniline-carbon nanotubes. *Food Chemistry* 135: 873–879.
- [44] Istamboulie, G., Sikora, T., Jubete, E., Ochoteco, E., Marty, J.-L., Noguera, T., 2010. Screen-printed poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT): A new electrochemical mediator for acetylcholinesterase-based biosensors. *Talanta* 82: 957–961.